



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

FACULTAD DE CIENCIAS



TRABAJO FIN DE MÁSTER EN BIOLOGÍA MOLECULAR,
CELULAR Y GENÉTICA

**Efecto del resveratrol en la modulación de la respuesta
inflamatoria en artritis reumatoide a través de la actividad
inflammasoma**

Efecto do resveratrol na modulación da resposta inflamatoria en
artritis reumatoide a través da actividade inflammasoma

Effect of resveratrol on the modulation of the inflammatory
response in rheumatoid arthritis through inflammasome activity

Autora: Rayma Suárez De Peña

Tutora: Dra. María José López Armada

A Coruña, 24 de Julio de 2019



TRABAJO DE FIN DE MÁSTER EN BIOLOGÍA MOLECULAR, CELULAR Y GENÉTICA

**EFECTO DEL RESVERATROL EN LA MODULACIÓN DE LA
RESPUESTA INFLAMATORIA EN ARTRITIS REUMATOIDE A TRAVÉS
DE LA ACTIVIDAD INFLAMASOMA**

Autor

Director

Fdo. Rayma Suárez De Peña

Fdo. María José López Armada

En A Coruña, a 24 de Julio de 2019

AGRADECIMIENTOS:

Ha sido un largo recorrido de sueños logrados y metas alcanzadas, donde hubo tropiezos y alegrías. Esto no habría sido posible sin la participación en mi vida de un gran grupo de seres humanos, por eso quiero agradecer:

A Dios por guiarme y acompañarme siempre por el camino correcto y darme fuerzas para seguir adelante a pesar de las dificultades que se presentaron, no hubo un día que no sintiera tu presencia cuidándome y apoyándome hasta llegar a esta meta.

Al Ministerio Educación Superior Ciencia y Tecnología (**MESCyT**) muchas gracias a la institución por confiar en mí, por otorgarme la beca para poder realizar este Master en España, gracias por darme la oportunidad de vivir esta gran experiencia de vida, sin su apoyo y confianza esto no hubiera sido posible.

A mis padres Mayra Altagracia De Peña y Jesús María Suárez gracias por respaldarme en todo momento, por el gran esfuerzo que hacen para darme el apoyo necesario para lograr mis objetivos. A mi hermano Bryan Jesús Suárez De Peña por siempre apoyarme, por sus oraciones y bendiciones que guiaron mi camino. Fueron una pieza clave para atreverme a venir hasta aquí. Los quiero un mundo.

Muchas gracias a la Dra. María José López Armada por confiar en mí y por su paciencia y apoyo continuo. Gracias por permitirme indagar en este nuevo campo de investigación para mí. A Olalla y sobre todo a Jenni gracias por enseñarme tanto y por su infinita paciencia al instruirme en esta nueva área para mí. Gracias a ustedes he podido ampliar mis conocimientos, se los agradezco profundamente.

A mis roommates y amigas Rosalía Sánchez, Diana Diaz y sobre todo a Raquel Peña, gracias por tantas risas, gracias por enseñarme tanto. Sin ustedes no habría sido realidad. Gracias por hacer esta experiencia única e inolvidable.

A mi novio Yusel Feliz, mi bonito, por tu gran apoyo incondicional, por siempre estar ahí para mí en los momentos buenos y malos.

A Michelle Pacheco y Naolli Barradas por todos los momentos maravillosos que vivimos y el apoyo que me dieron como buenas amigas, logramos esta meta.

Índice

ÍNDICE DE FIGURAS.....	I
ÍNDICE DE TABLAS	I
ÍNDICE DE ABREVIATURAS.....	II
RESUMEN:.....	IV
RESUMO	IV
SUMMARY	V
INTRODUCCIÓN.....	1
1. INFLAMACIÓN.....	1
2. INFLAMASOMA	2
3. MITOCONDRIA	2
3.1 El estrés oxidativo	4
4. ARTRITIS REUMATOIDE	6
5. SINOVIOCITOS E INFLAMACIÓN.....	7
6. ESTRATEGIAS ANTIOXIDANTES: EL RESVERATROL.....	9
JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS:.....	11
MATERIALES Y MÉTODOS.....	12
1. CULTIVO CELULAR	12
1.1 Obtención de muestras de cultivo celular	12
1.2 Estimulación celular	14
2. ESTUDIOS DE EXPRESION DE ARN	15
2.1 Lisis celular.....	15
2.2 Extracción de ARN	16
2.3 Cuantificación	17
2.4 Retrotranscripción de ARN a ADN complementario.	17
2.5 PCR a tiempo real.....	18
3. Análisis estadístico.....	20
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	21
1. Efecto del TNF- α sobre la expresión de IL-1 β , Caspasa-1 y NLRP3 en sinoviocitos de rata. ..	21
2. Efecto del TNF- α y su combinación con disfunción mitocondrial sobre la expresión de IL-1 β	21
3. Efecto del TNF- α y su combinación con disfunción mitocondrial sobre la expresión de Caspasa-1.	23
4. Efecto del RSV sobre la expresión de IL-1 β y Caspasa-1.....	25

5. Efecto del TNF- α y su combinación con disfunción mitocondrial sobre la expresión de NLRP3. Modulación por RSV.	27
CONCLUSIONES.....	31
REFERENCIAS	32

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Estructura y compartimentalización de la mitocondria.....	4
Figura 2: Enfermedades relacionadas con el estrés.	6
Figura 3: Evolución de la artritis reumatoide.	9
Figura 4: Estructura química del resveratrol.	9
Figura 5. Inmovilización del animal para realizar la extracción de las extremidades delanteras.	12
Figura 6: Tejido Sinovial. Extremidad de rata Wistar a la que se le ha retirado la fascia superficial quedando al descubierto el tejido sinovial.	12
Figura 7: Placa Petri rayada donde se sembraron las muestras de tejido.	13
Figura 8: Imágenes de sinoviocitos en cultivo.	13
Figura 9: Variaciones producidas en la expresión génica de IL-1 β en respuesta a la acción de TNF- α y PQ.....	23
Figura 10:Esquema general de la activación de NF- κ B.	24
Figura 11:Variaciones producidas en la expresión génica de Caspasa-1 en respuesta a la acción de TNF- α y PQ.....	25
Figura 12: Variaciones producidas en la expresión génica de IL-1Beta en respuesta a la acción de diversos estímulos celulares..	26
Figura 13: Efecto del resveratrol en la expresión génica de Caspasa-1 en respuesta a la acción de TNF- α y PQ.	27
Figura 14: Variaciones producidas en la expresión génica de NLRP3 en respuesta a la acción de diversos estímulos celulares..	28
Figura 15: Posible vía de amplificación de la respuesta inflamatoria en sinoviocitos con disfunción mitocondrial mediante la activación del inflamasoma	29

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Lista de estímulos y concentraciones empleadas.....	15
Tabla 2. Reactivos utilizados para amplificar DNAc.....	19
Tabla 3: Programación del termociclador LightCycler® 480 II.....	20

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

A

ADN. Ácido Desoxirribonucleico
ADNmt. ADN Mitocondrial
ADP. Adenosín Difosfato
AIM-2. Ausente en melanoma 2
ALR. Receptor tipo AIM-2 o ausente en melanoma 2
AMPc. Adenosín monofosfato cíclico
AMPK. AMP quinasa
AP-1. Proteína activadora 1
AR. Artritis Reumatoide
ARN. Ácido Ribonucleico
ASC. Proteína que contiene un Dominio de reclutamiento y activación de caspasas: CARD
ATP. Trifosfato de Adenosina

C

CARD. Dominio de reclutamiento de caspasa
CAT. Catalasa
CATERPILLER. Dominio de Reclutamiento de Caspasa (CARD), unión a R (purina), pyrin, muchas repeticiones de Leucina
CLR. Receptores tipo Lectina C
COX-2. Ciclooxygenasa 2
CRM. Cadena Respiratoria Mitocondrial

D

DAMPs. Patrones Moleculares asociados a Daño
DD. Dominio de Muerte
DNAc. DNA complementario

G

GM-CSF. Factor de estimulación de colonias de granulocitos-macrófagos
GPx. Glutación Peroxidasa
GSH. Glutación

H

H⁺. Hidrón
H₂O. Agua
HIF-1. Factor 1 inducible por hipoxia

I

IFN. Interferón
IKKs. Quinasa IκB

IL. Interleuquina
IL-1R. Receptor de Interleucina-1
IL-1Ra. Antagonista del Receptor de IL-1
iNOS. Enzima Sintasa de Óxido Nítrico Inducible
IRF. Factor Regulador del Interferón

K

kDa. Kilodalton

L

LRR. Dominio Rico en Repeticiones de Leucina

M

MCP-1. Proteína Quimioatrayente de Monocitos
MMP-9. Matrix metaloproteinasas 9

N

NACHT. Proteína inhibidora de la apoptosis neuronal
NADH. Nicotinamida Adenina Dinucleótido
NALP. Receptores Similares a Dominios de Oligomerización de unión a nucleótidos, o Receptores similares a NOD
NF-κB. Factor Nuclear κB
NLR. Receptores similares a NOD
NOD. Proteínas con Dominio de Oligomerización y Unión a Nucleótidos.
Los inflamosomas forman parte de la familia de receptores tipo NOD que está formada de 3 subfamilias: NOD (nucleotide-binding oligomerization domain), NLRC (NOD-like receptor CARD domain containing) y NLRP (NOD-like receptor Pyrin domain containing),
NLRPs. Receptores NLR que contienen el dominio PYD
NLRcs. Receptores NLR que contienen el dominio CARD

O

O₂. Oxígeno Molecular
OA. Osteoartritis

P

PAMPs. Patrones Moleculares asociados a Patógenos
PCR. Reacción en cadena de la polimerasa
PGC-1α. Coactivador gamma del receptor activado por proliferador de peroxisoma 1-alfa

PGE₂. Prostaglandina
Pi. Grupo Fosfato
PPAR. Receptores activados por el proliferador de peroxisomas
PQ. Paraquat

R

Redox. Reacción de Oxidación-Reducción
RIG-I. Proteína inducible por Ácido Retinóico
RLRs. Receptores parecidos a RIG-I
ROS. Especies Reactivas de Oxígeno
RPMI. Medio Roswell Park Memorial Institute
RSV. Resveratrol
RT. Transcriptasa Reversa
RT-qPCR. Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa

S

SOD. Superóxido Dismutasa

Pro-IL-1 β . Prointerleuquina 1 Beta
PRRs. Receptores de Reconocimiento de Patógeno
PYD. Dominio Pirina
PYPAF. Dominios de Pirina

T

TBP1. Proteína de unión a la caja TATA
TFM. Trabajo Fin de Máster
TGF- β . Factor de Crecimiento Transformante β
TLR. Receptores tipo Toll
TNF α . Factor de Necrosis Tumoral alfa

V

VEGF. Factor de Crecimiento Endotelial Vascular

Z

Z-VAD-FMK. Carbobenzoxi-valil-alanil-aspartil-[O-metil] - fluorometilcetona

RESUMEN:

En la AR, caracterizada por la inflamación en el tejido sinovial, se han encontrado alteraciones mitocondriales que pueden participar en el curso de la enfermedad. En este trabajo se ha evaluado la hipótesis de que la disfunción mitocondrial que acompaña a la AR puede inducir la respuesta inflamatoria a través de la inducción del inflamasoma y que el antioxidante natural RSV es capaz de modular esta respuesta inflamatoria. Para ello, se analizó la expresión génica de IL-1 β , Caspasa-1 y NLRP3 en sinoviocitos humanos en cultivo inducida por TNF- α y por su combinación con disfunción mitocondrial. Nuestros resultados muestran que la expresión de IL-1 β , Caspasa-1 y NLRP3 es inducida por TNF- α , y que la disfunción mitocondrial en los sinoviocitos participa en su respuesta inflamatoria al amplificar el efecto de TNF- α sobre la expresión de IL-1 β . Sin embargo, nuestros resultados sugieren que la activación del inflamasoma por disfunción mitocondrial en el sinoviocito parece no estar implicada, al menos a nivel de expresión génica de Caspasa-1 y NLRP3. Además, es posible que el uso de compuestos antioxidantes naturales como el RSV proporcione efectos beneficiosos en pacientes con AR.

RESUMO

Na AR, caracterizada pola inflamación no tecido sinovial, atopáronse alteracións mitocondriales que poden participar no curso da enfermidade. Neste traballo hase evaluado a hipótese de que a disfunción mitocondrial que acompaña á AR pode inducir a resposta inflamatoria a través da inducción do inflamasoma e que o antioxidante natural RSV é capaz de modular esta resposta inflamatoria. Para iso, analizouse a expresión génica de IL-1 β , caspasa-1 e NLRP3 en sinoviocitos humanos en cultivo inducida por TNF- α e pola súa combinación con disfunción mitocondrial. Os nosos resultados mostran que a expresión de IL-1 β , caspasa-1 e NLRP3 é inducida por TNF- α , e que a disfunción mitocondrial nos sinoviocitos participa na súa resposta inflamatoria ao amplificar o efecto de TNF- α sobre a expresión de IL-1 β . Con todo, os nosos resultados suxiren que a activación do inflamasoma por disfunción mitocondrial no sinoviocito parece non estar implicada, polo menos a nivel de expresión génica da caspasa-1 e NLRP3. Ademais, é posible que o uso de compostos antioxidantes naturais como o RSV proporcione efectos beneficiosos en pacientes con AR.

SUMMARY

In AR, characterized by inflammation in the synovial tissue, mitochondrial alterations have been found that may be involved in the course of the disease. In this work, the hypothesis that the mitochondrial dysfunction that accompanies AR can be induced to induce inflammatory response through inflammation induction and that the natural antioxidant RSV is able to modulate this inflammatory response. For this purpose, the gene expression of IL-1 β , Caspase-1 and NLRP3 in human synoviocytes in culture induced by TNF- α and its combination with mitochondrial dysfunction was analyzed. Our results show that the expression of IL-1 β , Caspase-1 and NLRP3 is induced by TNF- α , and that mitochondrial dysfunction in the

synoviocytes participates in its inflammatory response by amplifying the effect of TNF- α on the expression of IL-1 β . However, our results suggest that the activation of inflammasome due to mitochondrial dysfunction in the synoviocyte seems not to be involved, at least at the level of gene expression of Caspase-1 and NLRP3. In addition, it is possible that the use of natural antioxidant compounds such as RSV provide beneficial effects in patients with AR.

INTRODUCCIÓN

1. INFLAMACIÓN

La inflamación es una respuesta inmediata del sistema inmune presente en los tejidos vasculares, destinada a eliminar aquellos estímulos capaces de producir daño y a iniciar los procesos de reparación y curación de los tejidos (1). Los signos clínicos clásicos de la inflamación descritos por Celsus son: dolor, calor, rubor y tumor, y son el resultado de la acción conjunta de factores solubles tales como citoquinas, quimioquinas, especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés), nitrógeno, péptidos antimicrobianos, complemento, coagulación, fibrinólisis, ect (2). Como es sabido la inflamación aguda constituye una reacción de defensa sin embargo, si se cronifica la inflamación crónica puede contribuir a la patogenia de una gran variedad de enfermedades (1).

Los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) y los patrones moleculares asociados a daño (DAMPs) se unen a los receptores de reconocimiento de patógenos (PRRs), lo cual conduce a la activación de diversas vías de señalización y una gran variedad de factores de transcripción, uno de los más importantes en el ámbito de la inflamación es el Factor Nuclear- κ B y la familia del interferón (IFN), los cuales regulan la expresión de genes inflamatorios, lo que conlleva finalmente al desarrollo de la inflamación y la inmunidad del individuo (3-5).

Se han descrito cuatro familias de PRRs que reconocen estructuras moleculares de patógenos altamente conservados y que pueden producir respuesta intracelular: Receptores de membrana tipo Toll (TLR), los receptores tipo RIG-1 (proteína inducible por ácido retinóico), los receptores tipo NOD (proteínas con dominio de oligomerización y unión a nucleótidos) (NLR) y los receptores tipo lectina C (CLR) (6). Estas moléculas son unas piezas claves en la inmunidad innata y están expresadas en células presentadores de antígenos como las dendríticas y macrófagos, pero también en células que no pertenecen al sistema inmunitario como las neuronales o sinoviocitos. Los TLRs son una familia de diez receptores en el humano, cuya localización es membranal y endosomal, son los encargados de reconocer e iniciar la respuesta inmune inmediata, debido a su capacidad de reconocer los PAMPs (7). Estos receptores producen la respuesta inflamatoria inicial contra el patógeno, ya que conduce a la maduración de las células presentadoras de antígeno y a la producción de citoquinas inflamatorias (8, 9). También, los TLRs son receptores de DAMPs. Entre los ligandos que se han identificado se

encuentran el ácido desoxirribonucleico (ADN) mitocondrial (TLR-9), las histonas (TLR-4), entre otras (10).

Los RLRs forman parte de la familia de ARN helicasas, son capaces de descubrir especies de ARN (ácido ribonucleico) procedentes de virus en el citosol y dirigen la inducción de mecanismos antivirales mediante la incitación de la vía Interferón I (IFN I) (4, 5). Las NLRs, son una familia de 23 proteínas codificadas en el genoma humano, las cuales incluyen un dominio repetido rico en leucina (NALP, NOD, CATERPILLER y PYPAF) y un dominio de unión de nucleótidos, hasta el momento solamente se han identificado 8 miembros de estas 23 proteínas con capacidad para formar los inflamomas, entre los que cabe destacar a NLRP3 implicado en múltiples rutas de señalización pro inflamatorias. Muchas proteínas NLR se oligomerizan en un complejo proteico conocido como inflamosoma (11).

2. INFLAMASOMA

Tschopp y colaboradores (12), utilizaron el termino inflamosoma para describir el complejo de activación de la Caspasa-1, característica de la inmunidad inmediata contra patógenos. El complejo proteico está conformado por la proteína asociada a la apoptosis (ASC), la Caspasa-1, y un dominio de oligomerización y unión a nucleótido (NLR) o AIM2 (ausente en melanoma 2) (13). Esta plataforma proteica se activa por varios estímulos entre los que destaca, la liberación de ROS consecuencia de la disfunción mitocondrial, que conduce a la maduración proteolítica de la pro-Caspasa-1 hacia su forma madura Caspasa-1, la cual media la escisión proteolítica de la prointerleuquina 1 (pro-IL-1) y la prointerleuquina 18 (pro-IL-18) hacia sus formas activas: IL-1 e IL-18.

Como se ha descrito previamente el inflamosoma tiene como objetivo final la liberación de las interleuquinas IL-1 y IL-18, esto induce una muerte celular inflamatoria conocida como piroptosis (13-16). La piroptosis, es una muerte celular programada inflamatoria, dependiente de Caspasa-1, la cual está asociada con una respuesta durante la inflamación y tiene características tanto de la apoptosis como de la necrosis (17).

3. MITOCONDRIA

La mitocondria es un orgánulo citoplasmático presente en casi la totalidad de las células eucariotas en un número variable en función de la demanda energética de cada tejido (desde

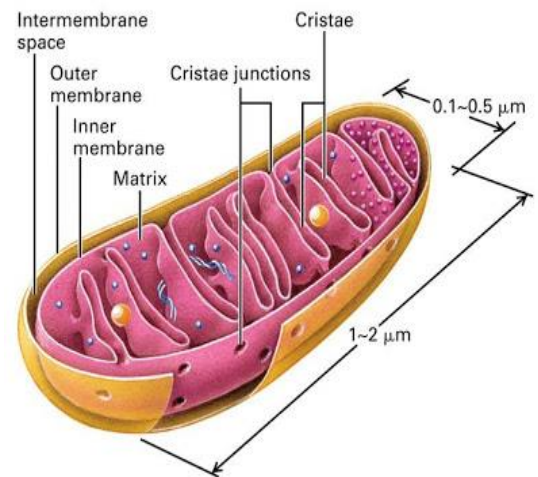
algunas decenas de mitocondrias por célula hasta varios miles en los tejidos más activos como el hígado o músculo cardíaco) (18). La mitocondria constituye la principal fuente de energía de la célula. Se caracteriza por poseer dos membranas: una membrana externa, fácilmente permeable a pequeñas moléculas e iones que se mueven libremente a través de canales transmembrana y una membrana interna impermeable a la mayoría de las moléculas pequeñas e iones, por lo que presenta transportadores específicos para las moléculas o iones que deben cruzarla. La membrana interna forma numerosas crestas que aumentan la superficie de ésta, permitiendo así albergar una mayor cantidad de los complejos respiratorios que se describirán a continuación. Delimitada por la membrana interna se encuentra la matriz mitocondrial, en donde se encuentra localizado el ADNmt y se realizan reacciones metabólicas tan importantes como la oxidación de aminoácidos, la β -oxidación de ácidos grasos o el ciclo de Krebs (19).

En la membrana interna se encuentra la cadena respiratoria mitocondrial (CRM), un conjunto de 4 complejos multiproteicos entre los que se realiza el transporte electrónico: el complejo I o NADH (nicotinamida adenina dinucleótido) deshidrogenasa, el complejo II o succinato deshidrogenasa, el complejo III o ubiquinona-citocromo c oxidoreductasa y el complejo IV o citocromo oxidasa. A continuación, se encuentra la ATP sintasa, otro complejo multiproteico (a menudo considerado como el complejo V de la CRM) que lleva a cabo la síntesis del ATP. Todos estos complejos proteicos participan en el proceso denominado fosforilación oxidativa, que culmina con la reducción de O_2 para formar H_2O y con la síntesis de ATP(19).

El proceso de fosforilación oxidativa puede consumir aproximadamente el 85% del O_2 usado por la célula y generar hasta el 90% del ATP producido por ésta (18). Este proceso comienza con la captación de electrones provenientes del NADH y de la oxidación de succinato a fumarato. Estos electrones son canalizados secuencialmente a través de los complejos I, II, III y IV hasta que se transfieren al O_2 , al tiempo que los complejos I, III y IV transportan activamente protones (H^+) hacia el espacio intermembrana. Debido a la naturaleza impermeable de la membrana mitocondrial interna, este transporte de H^+ establece un gradiente electroquímico entre el espacio intermembrana y la matriz (debido a una diferencia en la concentración de H^+ y una diferencia en la carga eléctrica a ambos lados de la membrana). La energía potencial almacenada en forma de este gradiente electroquímico, llamada fuerza protón-motriz, impulsará un flujo de retorno de H^+ hacia la matriz, a favor de gradiente, a través de la ATP sintasa. La ATP sintasa utiliza este flujo pasivo de H^+ para producir ATP mediante la adición de un grupo fosfato (Pi) a una molécula de ADP (19).

Figura 1: Estructura y compartimentalización de la mitocondria.

La mitocondria consta de una membrana externa que la recubre, de gran permeabilidad. A continuación, se encuentra la membrana interna, que forma invaginaciones llamadas crestas mitocondriales para aumentar su superficie. El espacio intermembrana juega un importante papel en la creación de gradientes a ambos lados de la membrana interna. Por último, el interior de la mitocondria, la matriz mitocondrial, es la parte soluble que alberga el ADNmt y en la que se llevan a cabo importantes rutas metabólicas. *Adaptado de:* <https://sites.google.com/site/biologiametabolismo/mitocondrias>.

**3.1 El estrés oxidativo**

La homeostasis celular se puede definir como el conjunto de procesos celulares destinados a mantener estables las condiciones necesarias para el buen funcionamiento de la célula, compensando la variabilidad de las condiciones externas al sistema. La estabilidad de las condiciones se refiere a temperatura, pH, osmolaridad, ratio entre procesos catabólicos y anabólicos, etc. Asimismo, la homeostasis implica también el mantenimiento de un delicado balance del estado redox (relación entre las formas oxidadas y reducidas de donadores y aceptores de electrones), necesario para el mantenimiento de las funciones celulares normales. Para ello, es necesario que la generación de ROS se produzca dentro de ciertos límites. La mitocondria es una de las principales fuente celulares de ROS (20). Estas son moléculas derivadas del oxígeno con uno o más electrones desapareados y que, por tanto, son altamente reactivas pudiendo provocar daños por oxidación en la célula cuando son producidas en exceso. Este daño oxidativo puede conducir a una disfunción mitocondrial, que a su vez derive en una disfunción celular e incluso llevar a la muerte celular, lo cual a su vez puede derivar en una aceleración del envejecimiento o de enfermedades asociadas al envejecimiento. Por otra parte, las ROS a niveles fisiológicos intervienen en procesos de señalización celular que regulan, entre otras, la respuesta proliferativa (21). Asimismo, las ROS constituyen el principal mecanismo de defensa frente a patógenos (22).

Para contrarrestar los potenciales efectos dañinos de ROS, la célula dispone de sistemas de defensa antioxidante, consistentes en enzimas detoxificadoras que catalizan procesos de conversión de ROS a moléculas menos reactivas, como catalasa (CAT), superóxido dismutasa

(SOD), glutatión peroxidasa (GPx), etc; o en pequenas moléculas antioxidantes que actúan como receptores del electrón desapareado, como la vitamina A, C, E o el glutatión (GSH) (19).

El balance entre la producción de ROS y la defensa antioxidante determinará el grado de estrés oxidativo. El estrés oxidativo en células y tejidos se refiere al desequilibrio entre los niveles de prooxidantes y antioxidantes, a favor de los primeros. En estas condiciones, ROS pueden modificar lípidos, proteínas y ADN provocando un daño oxidativo (19).

El estrés oxidativo está estrechamente relacionado con la inflamación, que como ya se ha comentado, es un proceso que constituye una respuesta adaptativa a cualquier condición percibida como potencialmente peligrosa y que pretende eliminar el peligro, reparar el tejido y restaurar el estado de homeostasis (19).

Así, el estrés oxidativo y la inflamación constituyen dos procesos que se retroalimentan entre ellos, estableciéndose un ciclo vicioso capaz de perpetuar y propagar la respuesta inflamatoria. De hecho, la mayoría de las enfermedades crónicas relacionadas con estrés oxidativo tienen en común que presentan un componente inflamatorio. En estos casos, el proceso de inflamación no alcanza el objetivo de recuperar la homeostasis tisular, sino que el estrés oxidativo perpetua y amplifica la respuesta inflamatoria hasta convertirse en un proceso patológico crónico. Existe una larga lista de enfermedades que han sido relacionadas con el estrés oxidativo, como son diversas enfermedades cardiovasculares o neurodegenerativas, el cáncer, el propio proceso de envejecimiento o la artritis, patología de estudio central en este TFM (23-32).

En la figura 2, se muestran algunas de las enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo, en función del órgano afectado.

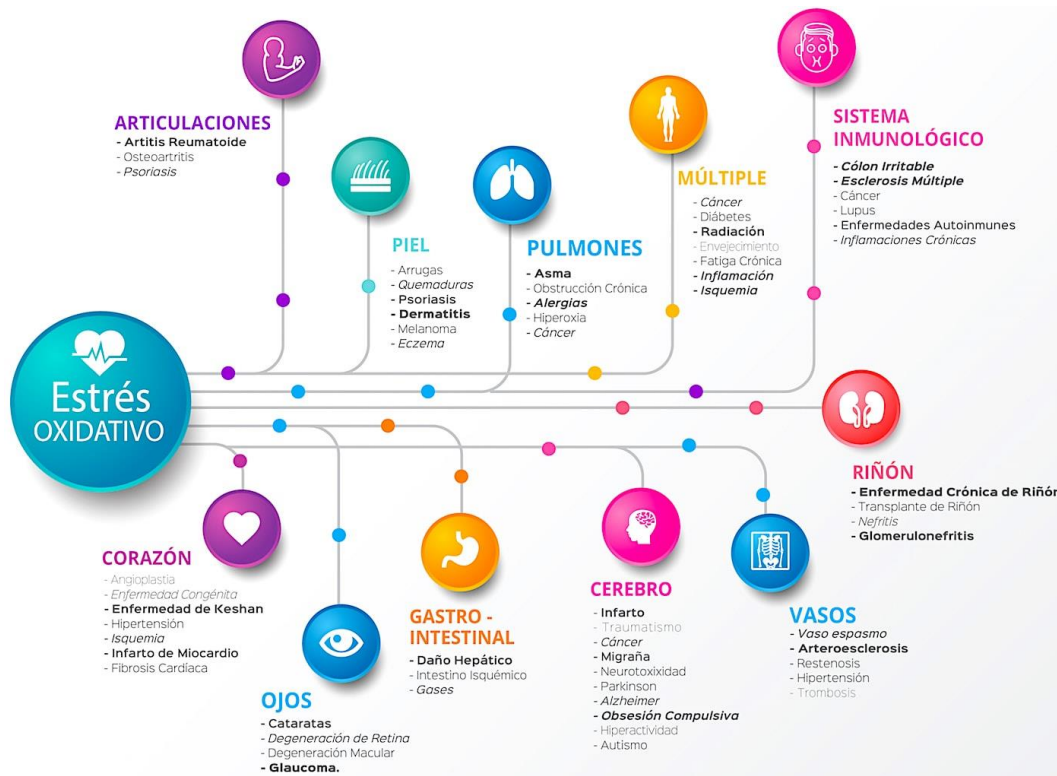


Figura 2: Enfermedades relacionadas con el estrés. Adaptado de: www.farmaciatorrent.com/blog/salud-bienestar/estres-oxidativo-como-afecta-a-la-salud/

Así, la conexión entre desequilibrio redox, inflamación y enfermedad conforma un extenso, complejo e interesante campo de estudio.

4. ARTRITIS REUMATOIDE

La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad articular autoinmune de etiología desconocida con un marcado carácter inflamatorio y asociada a un incremento en el estrés oxidativo. Se trata de una artritis poli articular de distribución simétrica, es decir, que afecta a varias articulaciones de ambos lados del cuerpo. Principalmente, afecta a las pequeñas articulaciones diartroidales de las manos y pies y a las rodillas. Presenta un curso crónico, con tendencia a una progresiva destrucción y deformidad articular (33). Las articulaciones afectadas sufren hipertrofia e hiperplasia sinovial, neoangiogénesis, lo que finalmente conduce a la destrucción de cartílago y hueso.

La epidemiología de la AR varía en gran medida en función de etnias o regiones geográficas, sin embargo se estima que afecta al 0.5 – 1 % de la población mundial adulta, siendo unas 3 veces más frecuente en mujeres, lo que sugiere un papel para las hormonas sexuales (34). Debido a la cronicidad de la enfermedad y la comorbilidad asociada, a su elevada incidencia en la población y a la grave incapacidad que provoca en los pacientes que la padecen,

la AR presenta un importante impacto socioeconómico. La Sociedad Española de Reumatología estima el gasto sanitario necesario por cada paciente (se calculan aproximadamente 200.000 personas con AR en España) entre 3.000 y 7.000 euros anuales, aunque estudios internacionales sitúan la cifra en más de 15.000 euros anuales por paciente (35). En cualquier caso, el impacto económico en la sociedad y, especialmente, la gran reducción en la calidad de vida de los pacientes refleja la importancia del estudio de esta enfermedad.

5. SINOVIOCITOS E INFLAMACIÓN

La principal manifestación clínica de la AR es la inflamación del tejido sinovial, que se corresponde con una capa delgada de tejido conjuntivo que recubre la cara interna de la capsula articular (envoltura fibrosa que encierra la articulación) en las articulaciones sinoviales.

El tipo celular predominante en la sinovial es el sinoviocito, que puede ser de dos tipos: sinoviocitos tipo A o macrófagos, y sinoviocitos tipo B o fibroblasto, y es a los que en adelante nos referiremos cuando hablemos de sinoviocitos. Los sinoviocitos secretan altos niveles de ácido hialurónico a la cavidad articular, que posee propiedades lubricantes e inmunomoduladoras, y componentes de tejido conectivo para el mantenimiento de la capsula articular (fibronectina, colageno tipo IV y tipo VI, laminina, proteoglicanos, fibrilina). También controlan el volumen de líquido sinovial en la articulación (33).

Los sinoviocitos AR sufren una transformación hacia un fenotipo agresivo inflamatorio, que resultan, al menos en parte, de mutaciones somáticas o alteraciones epigenéticas. Los sinoviocitos producen y también responden a una amplia variedad de mediadores inflamatorios como las citoquinas IL-1, IL-6, IL-15, IL-18, TNF α (Factor de Necrosis Tumoral alfa) o IFN- γ (interferón- γ), la iNOS (enzima sintasa de óxido nítrico inducible), factores de crecimiento como GM-CSF (Factor de estimulación de colonias de granulocitos-macrófagos) o TGF- β (factor de crecimiento transformante β), prostaglandinas como la PGE₂, varias quimioquinas como IL-8, etc (33, 36). TNF- α e IL-1 β , dos de las citoquinas más abundantes en la articulación AR, parecen actuar de forma sinérgica para inducir la función efectora (33, 34, 37). De hecho, los agentes biológicos más utilizados en el tratamiento de la artritis son los inhibidores del TNF- α (Adalimumab, Etanercept, Infliximab o certolizumab) o, más recientemente, el antagonista de la IL-1 β (Anakinra). Se postula que la IL-1 β es responsable de inducción de la inflamación en las fases más tempranas de la enfermedad, mientras que TNF- α ejercería su efecto en las etapas posteriores de establecimiento de la enfermedad (38).

La IL-1 β es una citoquina que se sintetiza como un precursor de 31 kDa (pro-IL-1 β) y que es escindida por la Caspasa-1 a la forma madura de 17 kDa. Como se ha comentado anteriormente, ejerce sus efectos desde la fase más temprana de la enfermedad, siendo de gran importancia en el desarrollo de ésta. En este sentido, junto con IL-6, parece ser la principal citoquina responsable del establecimiento de la inflamación en la articulación AR. Así, cuando IL-1 β se une a sus receptores (IL-1R) estimula su propia síntesis y la síntesis de una gran variedad de mediadores inflamatorios como IL-17, IL-8, IL-6, VEGF (factor de crecimiento endotelial vascular), MCP-1 (proteína quimioatrayente de monocitos), etc. Sus efectos biológicos pueden ser controlados por inhibidores naturales, como el antagonista del receptor de IL-1 (IL-1Ra), al que se une la IL-1 β sin llegar a desencadenar la ruta de señalización (39). Sin embargo, en pacientes AR parece existir un desequilibrio entre la producción de IL-1 β y de IL-1Ra, de manera que la producción de este último no es suficiente para bloquear la actividad de IL-1 β (40). Uno de los mediadores inflamatorios que se ve incrementado en respuesta a la señalización por IL-1 β es la enzima ciclooxigenasa (COX-2).

El TNF- α es una citoquina pro-inflamatoria y de defensa del huésped, cuya producción exagerada lleva a enfermedades inflamatorias crónicas. De allí que las drogas anti-TNF- α reduzcan la actividad y secuelas de las mismas, pero puedan causar tuberculosis.

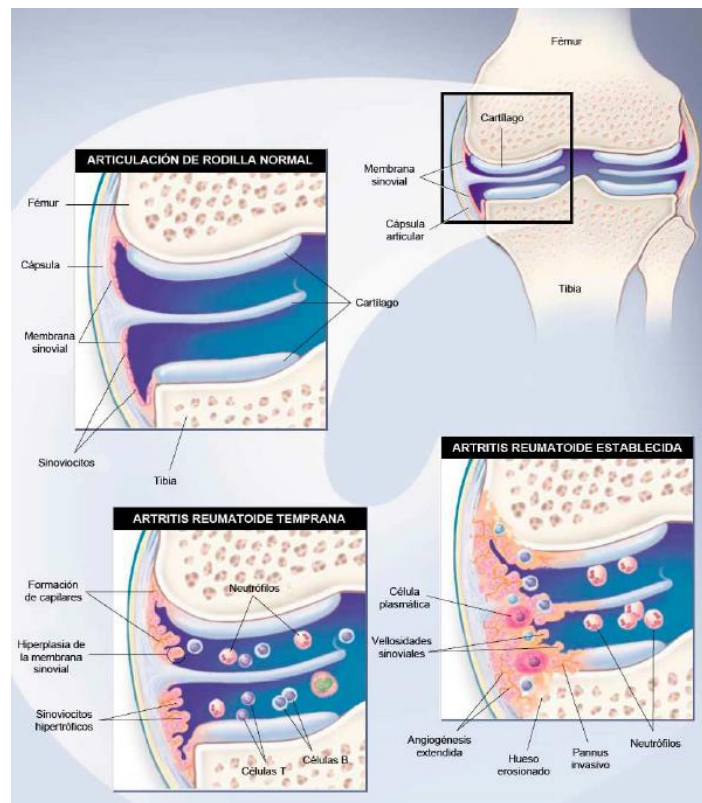


Figura 3: Evolución de la artritis reumatoide. En fases tempranas de la enfermedad se produce una congregación de células del sistema inmune (neutrófilos, linfocitos T y B), y proliferación celular en la membrana sinovial. En fases más tardías de la AR los sinoviocitos invaden otros tejidos (hueso y cartilago) erosionándolo. Imagen tomada de Riveiro Naveira RR 2015 (2) modificada de Choy EH, 2001 (41)

6. ESTRATEGIAS ANTIOXIDANTES: EL RESVERATROL

A la vista del relevante papel que juega el estrés oxidativo en diversas enfermedades, los antioxidantes naturales se han alzado como una potencial estrategia para mejorar los síntomas de la AR y de otras enfermedades inflamatorias asociadas al estrés oxidativo. Las búsquedas bibliográficas de antioxidantes provenientes de productos naturales, como el resveratrol o la curcumina, revelan el gran interés de la comunidad científica en estos compuestos. Así, durante los últimos 10 años, la base de datos PubMed registró un incremento exponencial de las publicaciones relacionadas con estas moléculas (19).

El resveratrol (RSV) es un polifenol natural derivado especialmente de las uvas tintas, y sus derivados como el vino tinto, y también de otros frutos rojos como arándanos, grosellas o granadas, así como en cacahuets. Ha demostrado poseer propiedades antioxidantes y antiinflamatorias en numerosos tipos celulares. Posiblemente, el primer uso conocido en la salud humana del extracto de uva data de hace aproximadamente 2000 años. Se trata de una preparación herbal ayurvédica originaria de la India, cuyo principal ingrediente era *Vitis vinífera* L y entre cuyos componentes se encuentra el RSV. Esta preparación, “Darakchasava”, era prescrita entre otras cosas, como cardiotónico o antipirético, y para tratar diversas enfermedades como tumores, anemia o tuberculosis (42).

En general, aunque los estudios clínicos en humanos son limitados, se ha encontrado una gran cantidad de evidencias de sus efectos beneficiosos en estudios *in vitro* y en animales. Estas propiedades beneficiosas incluyen propiedades anticancerígenas (suprime la proliferación de una gran variedad de células tumorales),

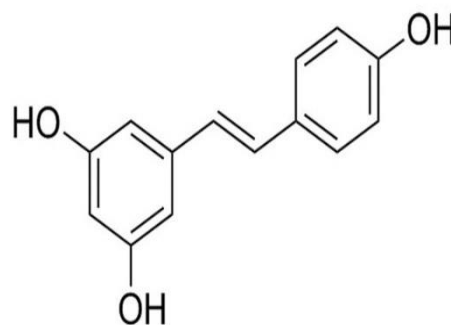


Figura 4: Estructura química del resveratrol. El resveratrol (trans-3,5,4'-trihidroxistilbeno) es una molécula aromática derivada del estilbeno, aislada por primera vez en 1940 e identificada como una fitoalexina. Imagen tomada de Lastra CA y Villegas I (17)

neuroprotectoras, cardioprotectoras, antioxidantes, antiangiogénicas y antiinflamatorias (43-45).

En particular, RSV ha demostrado la capacidad de inhibir la respuesta oxidativa y la respuesta inflamatoria a través de la inhibición de la síntesis de múltiples mediadores proinflamatorios (TNF, IL-1, IL-6, IL-8, IL-18, MMP-9, VEGF, COX-2...), la modulación de la síntesis de prostaglandinas, la inhibición de factores de transcripción como NF- κ B, AP-1, HIF-1o la inhibición de la enzima iNOS (46). En cuanto a su posible utilización en las artritis inflamatorias, modelos animales demuestran que un tratamiento con RSV, en dieta o inyección intraarticular, puede proteger la articulación del desarrollo de la enfermedad (47-49). El RSV también ha mostrado efectos interesantes respecto a la protección de la función mitocondrial. Es capaz, por ejemplo, de reducir la formación de radicales libres, así como de impedir la despolarización de la membrana mitocondrial y la depleción de ATP; o inducir autofagia, biogénesis mitocondrial y proteger de la apoptosis (50-53). Sin embargo, existen diversos estudios que muestran resultados contradictorios respecto al efecto *in vitro* o *in vivo* del RSV, por lo que todavía es necesario estudiar en mayor profundidad el mecanismo de acción y los efectos de este polifenol (54-56).

Actualmente, se cree que el RSV puede actuar directamente sobre la enzima fosfodiesterasa, que es responsable de la degradación del AMP cíclico (AMPC), e inhibirla (57). Así, el RSV induce un incremento de los niveles AMPC, que provocarían un aumento de expresión de la enzima AMP quinasa (AMPK). A su vez, se ha demostrado que la AMPK es capaz de inhibir la señalización de NF- κ B y, por tanto, la inflamación (58). AMPK también activa directamente la vía de autofagia/mitofagia y puede activar PGC-1 α ((PPAR) gamma coactivator 1), que induce biogénesis mitocondrial y activa una respuesta antioxidante mediada por sirtuína (59). La estimulación simultánea de mitofagia y biogénesis mitocondrial proporcionaría un mecanismo contra la proliferación de mitocondrias disfuncionales, un hecho que resulta prometedor con relación a enfermedades asociadas a disfunción mitocondrial, como sucede con la AR (19).

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS:

La AR se caracteriza por un aumento del estrés oxidativo asociado a disfunción mitocondrial, lo que conlleva a un alto grado de inflamación en las articulaciones afectadas. Aunque conocemos que la disfunción mitocondrial de los sinoviocitos participa en su respuesta inflamatoria al inducir la producción de mediadores inflamatorios y amplificar la respuesta inflamatoria a citoquinas a través de la vía de NF- κ B, nunca ha sido estudiada la activación del inflamasoma en este proceso. Por ello, en este estudio hemos evaluado la hipótesis de que la disfunción mitocondrial que acompaña a la AR puede contribuir a la respuesta inflamatoria a través de la inducción del inflamasoma y que el antioxidante natural RSV es capaz de modular esta respuesta inflamatoria.

Los objetivos concretos desarrollados son:

- ✓ Analizar la expresión génica de IL-1 β , Caspasa-1 y NLRP3 en sinoviocitos humanos en cultivo inducida por TNF- α .
- ✓ Evaluar el efecto de la disfunción mitocondrial sobre la expresión de IL-1 β , Caspasa-1 y NLRP3 inducida por TNF- α .
- ✓ Analizar el efecto del RSV sobre la modulación de la respuesta inflamatoria en sinoviocitos humanos en cultivo.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. CULTIVO CÉLULAR

1.1 Obtención de muestras de cultivo celular



Figura 5. Inmovilización del animal para realizar la extracción de las extremidades delanteras.

El tejido sinovial de rata se extrajo de una hembra Wistar. Todos los protocolos de manipulación de animales se ajustan a la normativa vigente en la Unión Europea (2010/63/EU) y España (53/2013), y han sido aprobados por el Comité Ético de Experimentación Animal de la Xerencia de Xestión Integrada A Coruña (XXIAC). Previamente a la extracción de las muestras, el animal fue sacrificado y transportado desde el animalario del INIBIC hasta una zona habilitada para la extracción de tejidos, en la cual se realizó la extracción de las extremidades posteriores, primero se pelan ambas rodillas (Figura 5) y a continuación se realiza un corte en la “zona pélvica” de forma que las patas queden libres. Se retira toda la piel que se encuentre rodeando las rodillas, de forma que la articulación quede totalmente expuesta y se pueda

observar con facilidad la fascia que recubre la membrana sinovial.

Finalizada la extracción de las extremidades se introdujeron en un recipiente estéril (frasco de orina) y fueron trasladadas rápidamente a la campana de cultivos donde se procedió a la extracción del tejido sinovial. Hasta este momento, el procedimiento se realizó en condiciones higiénicas, pero no estériles, aunque la articulación no llegue en condiciones de esterilidad, la membrana sinovial al estar cubierta por el resto de tejidos si que lo está. Preparamos las Placas de Petri de 8,8 cm² que necesitamos (una para cada par de membranas sinoviales) con un bisturí rayamos 4 zonas de la misma, para mejorar la adherencia de las muestras de tejido sinovial. Una vez en la campana, se procedió a realizar la extracción del tejido sinovial de las articulaciones bajo condiciones estériles. Para acceder al tejido sinovial fue necesario retirar la fascia, capa membranosa de color blanquecino que recubría externamente la



Figura 6: Tejido Sinovial. Extremidad de rata Wistar a la que se le ha retirado la fascia superficial quedando al descubierto el tejido sinovial.



Figura 7: Placa Petri rayada donde se sembraron las muestras de tejido.

articulación. Una vez retirada quedó al descubierto un pequeño orificio en la parte superior de la articulación (Figura 6) a partir del cual, y con la articulación flexionada para facilitar el trabajo, se realizaron cortes a ambos lados de la membrana, hasta finalmente extraer una muestra de tejido sinovial. Después, para realizar el cultivo la muestra fue cortada en dos partes iguales y cada una fue depositada en una de las zonas previamente rayadas de la placa Petri (Figura 7). Se realizó el mismo procedimiento con la otra extremidad. Una vez colocadas las

muestras de tejido, añadimos a la placa 8 mL de medio de cultivo, RPMI1640 con LGlutamina (Lonza, Basel, Suiza) suplementado con un 10% de suero bovino fetal (SBF) y 100 U/ml de penicilina/100 µg/ml de estreptomicina (Gibco BRL, Paisley, UK). Una vez identificada la placa Petri, indicando los datos del animal, la fecha del cultivo y el número del pase. Se introdujo la placa a una estufa a 37°C.

Transcurridas 96 h desde su siembra se pudo comprobar que ya existía crecimiento celular en la periferia de los explantes por lo que se procedió a la extracción de las muestras de tejido sinovial en la campana de cultivos. Una semana después, renovando el medio cada 2 días, se confirmó que hubo crecimiento celular.

Para la realización de los posteriores experimentos se utilizaron muestras de pacientes artríticos (Osteoartritis, OA, es el trastorno articular más común, es una patología degenerativa de las articulaciones que se caracteriza por la degradación progresiva del cartílago articular hialino; pero también, por cambios en el resto de tejidos articulares, incluyendo entre otros, un engrosamiento del hueso subcondral y un variable grado de inflamación sinovial con formación del pannus, tejido sinovial que prolifera e invade al resto de tejidos articulares). Se utilizaron estas muestras debido a que los especímenes provenientes de las ratas no modulaban en los experimentos diseñados.

El tejido sinovial humano se obtuvo de la articulación de la rodilla proveniente de amputaciones de donantes adultos con historia de enfermedad articular (OA). La sinovial se dividió y se digirió con dispasa (Gibco BRL, Paisley, UK) a 37 °C durante 60 min. El digerido se centrifugó y las células obtenidas fueron

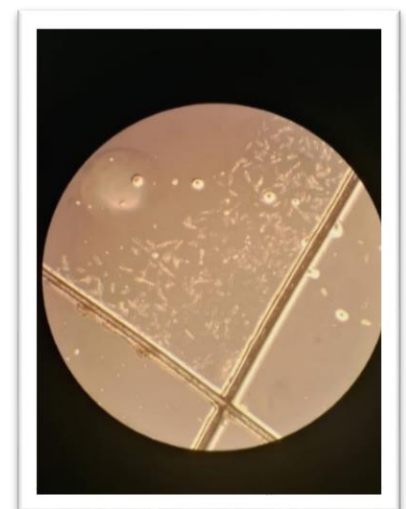


Figura 8: Imágenes de sinoviocitos en cultivo

resuspendidas y sembradas en medio de cultivo RPMI (Lonza, Basel, Suiza) suplementado con 20% de suero bovino fetal (SBF), 100 U/ml de penicilina / 100 µg/ml estreptomicina (Gibco) y 0.12 UI/ml de insulina humana (Novo Nordisk, Bagsvard, Dinamarca). Inmediatamente tras la digestión enzimática, la suspensión celular está formada por grupo heterogéneo de células, principalmente eritrocitos y sinoviocitos tipo A (macrófagos) y tipo B (sinoviocitos fibroblásticos). Las células crecieron en una monocapa en placas de Petri, cambiando el medio cada 2 días y se expandieron mediante varias tripsinizaciones. Tras el segundo pase de tripsinización, se obtiene una población homogénea de células adherentes, presentando tan solo el fenotipo de tipo fibroblasto con la típica morfología fusiforme.

El desarrollo del cultivo de sinoviocitos humanos siguió el mismo procedimiento que el sinoviocitos de rata con la excepción de que el medio de cultivo fue diferente ya que se utiliza un medio al 20% de suero bovino fetal que incluye insulina.

Todos los estudios cuentan con la aprobación del Comité Ético de Investigación de Galicia. Las muestras se codificaron para ser tratadas de manera anónima.

1.2 Estimulación celular

Antes de los experimentos, las células se deplecionaron en medio RPMI 0.5% SBF durante 24 h y, a continuación, los experimentos se realizaron también en RPMI 0.5% SBF. Este bajo porcentaje de SBF en el medio hace que las células se mantengan en un estado quiescente.

Como citoquina proinflamatoria se utilizó TNF- α . El paraquat (PQ), un tipo de sal catiónica 1,1'-dimetil-4,4'-bipiridilo, se conoce comúnmente como diguat y gramoxona, se empleó para inducir la disfunción mitocondrial. El PQ tiene un valor de aplicación extremadamente alto en la agricultura, con una tasa de utilización de más del 70% en los países predominantemente agrícolas (60). Sin embargo, con la alta tasa de aplicación de PQ, el impacto subsiguiente es uno de los problemas más difíciles en la práctica clínica, ya que es extremadamente tóxica para los humanos y los animales. Las ROS producidas por PQ en el cuerpo causan daño a los órganos a través de los macrófagos (61, 62). Además, se utilizó Resveratrol (Sigma-Aldrich), un polifenol natural, por sus propiedades antioxidantes y antiinflamatorias.

A continuación, se muestra un esquema de los estímulos empleados:

1- Basal
2- TNF-a 10 ng/ml
3- TNF-a 10 ng/ml + PQ 1 mM
4- TNF-a 10 ng/ml + PQ 1 mM + RSV 50 mM
5- TNF-a 10 ng/ml + RSV 50 mM
6- RSV 50 mM

Tabla 1. Lista de estímulos y concentraciones empleadas en las diferentes condiciones experimentales, que se realizaron a 6,12 y 24 horas.

A la hora de añadir los estímulos primero se añadió, en los pocillos con RSV(50mMol) 1 µl de este antioxidante resuspendido en etanol para tener un volumen final de 1 ml y en los pocillos con Paraquat (1Mm) 10 µl con un volumen final de 1 ml, se dejaron actuar durante 30 min a 37°C, tras lo cual se añadieron los demás estímulos, los cuales se dejaron actuar durante 6,12 y 24 h a 37°C para ver cómo se modulaba los genes de interés. Transcurrido el tiempo se eliminó el medio, se lavaron las células con suero salino y se añadieron 300 µl de la solución de lisis Trizol (Invitrogen). Tras lo que se procedió a realizar la extracción.

2. ESTUDIOS DE EXPRESION DE ARN

Para los estudios de expresión génica se extrajo ARN utilizando el método del reactivo Trizol y se retrotranscribió a ADN complementario. Posteriormente, se realizó la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real. Estos procesos son descritos en detalle a continuación.

2.1 Lisis celular

Después de realizar el proceso de estimulación, se recogió el medio de cultivo y se almacenó a -80°C, por si queremos realizar futuros experimentos. A continuación, lavamos las células con salino frío dos veces, para eliminar restos de medio de cultivo, así como de reactivos utilizados en la estimulación celular. Seguidamente, se adicionaron 300 µl de TRIzol (Molecular Research Center, Inc. Montgomery Rd Cincinnati, USA). El TRIzol es un reactivo

que se usa para aislar ARN, ADN y proteínas, de forma rápida y eficiente. Después, se procedió a agitar la placa de forma manual durante cinco minutos y se recogió el sobrenadante, el lisado celular en tubos Eppendorf, los cuales fueron almacenados a -80°C para su posterior extracción de RNA.

2.2 Extracción de ARN

Durante la extracción de ARN se mantuvieron las muestras en hielo y todas las centrifugaciones se llevaron a cabo a una temperatura de 4°C , con el propósito de impedir la degradación del ARN. En primer lugar, las muestras almacenadas a -80°C procedentes de la lisis celular se descongelaron en hielo. Una vez descongeladas, se les agregó $60\ \mu\text{l}$ de cloroformo y se voltearon los tubos Eppendorf durante 15 segundos para mezclar bien su contenido. A continuación, se incubaron 2-3 min a temperatura ambiente y se centrifugaron a $12\ 000\ \text{gs}$ durante 15 min a 4°C . Tras la centrifugación, en los tubos aparecieron tres fases bien diferenciadas. La primera de ellas, una fase acuosa y transparente, contenía el ARN. La segunda, una fina interfase blanquecina, contenía restos de ADN. Por último, la tercera fase era de color rosácea y contenía residuos de fenol y cloroformo. Se tomó la fase acuosa de cada muestra con mucho cuidado, y se introdujo en tubos Eppendorf nuevos, previamente rotulados. La interfase y la fase rosácea se descartaron. Se adicionaron $150\ \mu\text{l}$ de isopropanol con el objetivo de precipitar el ARN. Se voltearon los tubos en el voltex y se dejaron incubar durante 10 min a temperatura ambiente. Luego se centrifugaron a $12\ 000\ \text{gs}$ durante 10 min y se obtuvo un sedimento, un pellet blanquecino en el fondo de los tubos, correspondiente al ARN extraído. Se retiró el sobrenadante de los tubos y se realizó un lavado con etanol al 70%, sin resuspender el pellet. Solo se adicionó el reactivo, se voltearon los tubos manualmente dos veces y se centrifugaron a $7\ 500\ \text{gs}$ durante 5 min. Se realizó un segundo lavado, repitiendo este mismo proceso, pero utilizando etanol al 100% de pureza. El sobrenadante obtenido en esta segunda centrifugación también fue desechado y se dejó secar el pellet de los tubos, se dejan abiertos bajo una lámpara aproximadamente por una hora. Una vez secos, se les añadió agua libre de ARNasas atemperada y se incubaron durante 10 min a $55-60^{\circ}\text{C}$ en el termoblock. Finalmente, se resuspendieron las muestras y se mantuvieron en hielo hasta el momento de cuantificarlas.

2.3 Cuantificación

Se usó el Nanodrop para cuantificar la cantidad de RNA extraído, así como su calidad. Para ello, se utilizó el software Nucleic Acid. Para hacer el blanco se utilizó agua libre de RNAsas. La concentración de ARN se midió en ng/ μ l. La pureza del ARN se determinó a partir del ratio entre la absorbancia a 260 nm y 280 nm ($A_{260}/280$), que debe ser de aproximadamente 2. Ratios menores son indicativos de contaminación del ARN con proteínas, compuestos fenólicos u otros contaminantes que absorben a 280 nm. Un segundo indicador de la pureza del ARN lo constituye el ratio 260/230, que debe ser ligeramente superior al anterior (entre 2.0 y 2.2). Un ratio por debajo de estos valores indica contaminación con compuestos que absorben a 230, típicamente fenol u otros compuestos provenientes del proceso de extracción. Después, las muestras se almacenaron a -20°C .

2.4 Retrotranscripción de ARN a ADN complementario.

La retrotranscripción reversa permite la síntesis de ADN complementario (ADNc) mediante el uso de ARN monocatenario como plantilla, cuya reacción está mediada por la transcriptasa reversa (RT). Para ello, se utilizaron dos Kits: SuperScript® VILO™ MasterMix – 50rxn (ThermoFisher Scientific, Van Allen Way Carlsbad, CA, USA) y el Kit de síntesis de ADNc de primera cadena NZY (nzytech genes & enzymes) (debido a que es más económico, tienen el mismo protocolo solamente cambian en que con este se le agrega a la muestra ARNasa a los 45 minutos de la retrotranscripción)

El protocolo se basó en primer lugar en retrotranscribir a 500 ng, las cantidades de ARN de las muestras, previamente cuantificadas en el Nanodrop, luego adicionarle 10 μ l de Master Mix, 2 μ l de Enzyme Mix y completar hasta 20 μ l con H_2O libre de nucleasas a cada tubo. Finalmente, los tubos se introdujeron en un Termociclador Veriti Thermal Cycler en el cual se mantuvieron las siguientes condiciones de retrotranscripción:

- 25°C durante 10 min
- 50°C durante 30 min
- 85°C durante 5 min
- 4°C infinito

A los 45 minutos se le añadió a cada tubo 1 µl de NZY RNase H (kit NZY), la cual degrada específicamente la plantilla de ARN en los híbridos de ADNc. Este procedimiento se usa porque mejora la sensibilidad de la posterior reacción de RT-qPCR, ya que los cebadores de PCR se unirán más fácilmente al ADNc.

Luego se continuo con la opción SKIP para que el termociclador salte al siguiente paso que fue:

- 37°C durante 20 minutos

La síntesis y amplificación de ADN complementario (ADNc) a partir de las muestras de ARN, para esto primero se preparó la Vilo Master Mix (Super Script Vilo, Thermo Fisher scientific) que es una mezcla maestra de síntesis de ADNc de primera cadena para aplicaciones RT-qPCR de dos pasos. La mezcla maestra combina SuperScript III Reverse Transcriptase (RT) y otros componentes de reacción de RT en un formato de un solo tubo para permitir una síntesis confiable de la primera cadena y altos rendimientos de ADNc de un amplio rango de concentraciones de ARN de entrada. La alta eficiencia de RT de SuperScript III RT y la formulación optimizada permiten que la mezcla maestra ofrezca una alta linealidad en la síntesis de ADNc en una amplia gama de plantillas de ARN de entrada para ensayos de RT-PCR cuantitativa de dos pasos (qRT-PCR) (64). Para ello, se preparó en primer lugar la reacción añadiendo H₂O para completar 10 µl de muestra con las muestras a una concentración de 500 y se le agrego 2 µl de Vilo. A continuación, para llevar a cabo la síntesis de ADNc, se llevaron las muestras al Termociclador Veriti Thermal Cycler usando la opción de Vilo_RT 90 minutos, que consiste en 25°C durante 10 minutos, 42°C, 85°C durante 5 minutos y 4° infinito. Las muestras con ADNc se guardaron a -20 °C hasta el momento de llevar a cabo la PCR a tiempo real.

2.5 PCR a tiempo real

En este experimento se usó el kit LightCycler® 480 Probes Master (Roche, Mannheim, Germany) para llevar a cabo la amplificación de tres genes: NLRP 3 (gen diana), IL-1BETA (gen diana) y Caspasa-1 (gen diana) y del gen TBP-1 (gen de referencia) en distintas condiciones de estimulación celular. Para amplificar el gen de NLRP3 se utilizaron los primers NLRP3-F Human y NLRP3-R Human (Invitrogen, Van Allen Way Carlsbad, CA), cuyas secuencias forward y reverse se corresponden con 5'- CAC GTG TTT CGA ATC CCA CT-3'

y 5'-AAC CCA TCC ACT CCT CTT CA -3' respectivamente, así mismo para el gen IL-1Beta se usaron los primers IL-1Beta-F Human e IL-1Beta-R Human (Invitrogen, Van Allen Way Carlsbad, CA), cuyas secuencias forward y reverse se corresponden con 5'- GCT GAC AGA CCC CAA AAG AT-3' y 5'-AGC TGG ATG CTC TCA TCT GG-3' respectivamente, y para el gen Caspasa-1 se utilizaron los primers Caspasa 1-F Human y Caspasa 1-R Human (Invitrogen, Van Allen Way Carlsbad, CA) cuyas secuencias forward y reverse se corresponden con 5'-CCA GGA CAT TAA AAT AAG GAA ACT GT-3' respectivamente. Por otro lado, para amplificar el gen de referencia TBP-1 se utilizaron los primers TBP1-F Human y TBP1-R Human (Invitrogen, Van Allen Way Carlsbad, CA), cuyas secuencias forward y reverse se corresponden con 5'-GCC CAT AGT GAT CTT TGC AGT-3' y 5'-CGC TGG AAC TCG TCT CAC TA-3', respectivamente. En cuanto a las sondas utilizadas, para la amplificación del gen de NLRP3 se usó la sonda 72 (Roche. Mannheim, Germany), del gen Caspasa-1 se utilizó la sonda 4 (Roche. Mannheim, Germany), para el gen IL-1 β se empleó la sonda 117 (Roche. Mannheim, Germany), y para la amplificación del gen TBP1- se usó la sonda 67 (Roche. Mannheim, Germany), ambas pertenecientes a la Universal Probe Library. En la tabla 1 se muestran los reactivos utilizados para llevar a cabo la qPCR, así como el volumen/muestra que se tomó de cada uno de ellos.

Reactivos	Volumen
Master Mix Sondas VPL	5 μ l
Primer Forward	0.35 μ l
Primer Reverse	0.35 μ l
Sonda	0.1 μ l
Agua, PCR grade	2.2 μ l
Muestra DNAc	2 μ l

Tabla 2. Reactivos utilizados para amplificar ADN complementario. La columna de la derecha muestra el volumen de reactivo utilizado por muestra. Para amplificar cada gen se utilizaron primers específicos.

Las condiciones de amplificación se detallan en la tabla 3. Concretamente, se usó un termociclador LightCycler® 480 II de Roche. Se estableció en primer lugar un programa de preincubación, seguido de un programa de amplificación y, finalmente, uno de anillamiento. Es preciso señalar que el programa de amplificación constaba de 55 ciclos, en los cuales tuvo lugar la detección y cuantificación del producto amplificado mediante fluorescencia. El

procesamiento de datos, así como la obtención de resultados se llevó a cabo mediante el uso del Software LightCycler® 480.

Programación del termociclador LightCycler 480 II Tabla 3:

Programs

Program Name	pre-incubation		
Cycles	1	Analysis Mode	None
Target (°C)	Acquisition Mode	Hold (hh:mm:ss)	Ramp Rate (°C/s)
95	None	00:10:00	4.40

Program Name	amplification		
Cycles	55	Analysis Mode	Quantification
Target (°C)	Acquisition Mode	Hold (hh:mm:ss)	Ramp Rate (°C/s)
95	None	00:00:10	4.40
60	None	00:00:30	2.20
72	Single	00:00:01	4.40

Program Name	cooling		
Cycles	1	Analysis Mode	None
Target (°C)	Acquisition Mode	Hold (hh:mm:ss)	Ramp Rate (°C/s)
40	None	00:00:20	1.50

Tabla 3: Programación del termociclador LightCycler® 480 II. Obtenida a partir del propio Software proporcionado por la casa Roche. En ella se indica temperatura, tiempo, modo de adquisición y ratio de cambio de temperatura.

3. Análisis estadístico

Se utilizó la versión 7 del Software GraphPad Prism para llevar a cabo el análisis estadístico de los datos. Se realizó un análisis T- test (no paramétrico) de una cola. Las diferencias fueron consideradas significativas cuando $P \leq 0.05$. Los datos se expresaron como las medias \pm SEM.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este trabajo se ha estudiado la expresión génica de IL-1 β , Caspasa-1 y NLRP3 en sinoviocitos humanos en cultivo bajo la estimulación de TNF- α ; así como el efecto de la disfunción mitocondrial sobre la expresión de estos mediadores inducidos por TNF- α . Además, se ha analizado el efecto del RSV sobre la modulación de la respuesta inflamatoria en sinoviocitos humanos en cultivo.

Las células se estimularon tal y como se explicó anteriormente, y se analizó el perfil de expresión génica de los mediadores inflamatorios mencionados mediante RT-qPCR.

1. Efecto del TNF- α sobre la expresión de IL-1 β , Caspasa-1 y NLRP3 en sinoviocitos de rata.

Se hicieron unos primeros experimentos en sinoviocitos de rata, pero apenas había modulación; por este motivo, se decidió utilizar sinoviocitos humanos que como se observa en los resultados que se detallan a continuación, tienen una capacidad de respuesta adecuada y elevada, en comparación con los de rata.

2. Efecto del TNF- α y su combinación con disfunción mitocondrial sobre la expresión de IL-1 β .

En la figura 9 (A, B y C) se puede observar como la citoquina proinflamatoria TNF- α , empleada como control positivo de la respuesta inflamatoria, causó un aumento significativo en la expresión del mediador inflamatorio IL-1 β en los diferentes tiempos evaluados de 6, 12 y 24 horas, lo que indica que el procedimiento experimental se llevó a cabo correctamente. Como se puede apreciar el TNF- α indujo una respuesta tiempo dependiente, dando lugar a un aumento de expresión de IL-1 β de 129.1 ± 38.24 veces respecto al basal a las 6h, 40.42 ± 14.72 a las 12h y 33.84 ± 16.09 a las 24h.

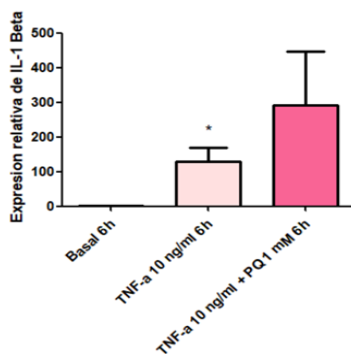
Estos resultados se pueden explicar ya que el TNF- α es una de las muchas citocinas que se han identificado en la membrana sinovial de los pacientes con AR (63). Las células sinoviales de pacientes con AR producen esta citocina de forma espontánea en cultivo (64). El TNF- α produce daño en el cartílago y reabsorción ósea (65, 66), induce liberación de prostaglandinas y colagenasa por las células sinoviales (67), desempeña un papel importante en la fibrosis (68), favorece el influjo celular sinovial facilitando la adhesión de las células inflamatorias al

endotelio de los vasos sinoviales (69, 70) e induce la producción de IL-1 (71) y GM-CSF (72). Todo esto indica que no sólo posee capacidad inflamatoria *per se*, sino que también es capaz de regular la producción de otros mediadores proinflamatorios.

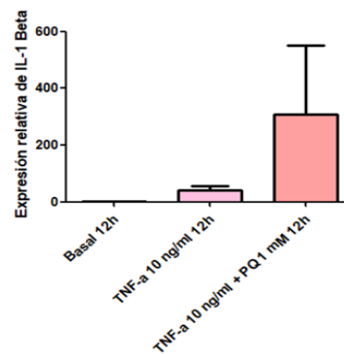
En la articulación con AR, los sinoviocitos que presentan alteraciones mitocondriales, están sometidos a un ambiente proinflamatorio, debido a la presencia de múltiples mediadores, siendo uno de los más importantes, el ya mencionado TNF- α . Por ello, el siguiente paso fue evaluar el efecto de la disfunción mitocondrial sobre la respuesta inflamatoria inducida por TNF- α en sinoviocitos humanos en cultivo. Para inducir la disfunción mitocondrial se expuso el sinoviocito a PQ, un prooxidante mitocondrial. Como se puede observar en la Figura 9 (A, B y C), la combinación de TNF- α 10 ng/ml y PQ 1 Mm produce un incremento mayor en la expresión de IL-1 β que el inducido por TNF- α sólo. Por ejemplo en la expresión relativa de IL-1 β a 12h, el incremento de IL-1 β inducido por TNF- α 10 ng/ml sola es de 40.42 ± 14.72 veces con respecto al basal, mientras que el inducido por TNF- α 10 ng/ml + PQ 1 Mm respecto a TNF- α 10 ng/ml solo es de 265.9 ± 183.0 veces. Como se observa en la figura 9C el efecto sinérgico descrito se mantiene a tiempos más largos (24h).

Estos resultados son acordes con los ya publicados por el grupo, que describieron como los sinoviocitos que sufren disfunción mitocondrial, responden a la citoquina proinflamatoria IL-1 β con mayor intensidad en cuanto a la inducción de la respuesta inflamatoria valorada en la expresión de metaloproteasas, IL-8 y PGE₂. Es decir, que la disfunción mitocondrial provoca que los sinoviocitos sean más sensibles a las citoquinas proinflamatorias presentes en su ambiente (73).

A



B



C

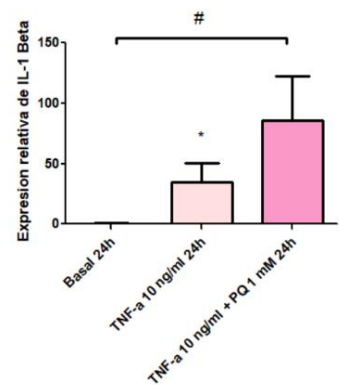


Figura 9: Variaciones producidas en la expresión génica de IL-1 β en respuesta a la acción de TNF- α y PQ. Los datos representados se corresponden con la media de los Cp obtenidos mediante q-PCR \pm SEM (n=3). A: Variación de la expresión de IL-1 β en 6 horas *P=0.0139. B: Variación de la expresión en 12 horas. C: Variación de la expresión en 24 horas *P=0.0401, #= 0.0201.

3. Efecto del TNF- α y su combinación con disfunción mitocondrial sobre la expresión de Caspasa-1.

La activación de caspasas es otro factor que podría estar involucrado en el desarrollo de la respuesta inflamatoria inducida por disfunción mitocondrial en los sinoviocitos. En este sentido, es probable que el inflammasoma, por medio de la activación de la Caspasa-1, desempeñe un papel importante en esta ruta. Así, se ha descrito una activación de la Caspasa-1 desde las fases tempranas de la AR(74).

En primer lugar, en la figura 11 (A, B y C) se puede observar como la citoquina proinflamatoria TNF- α , como control positivo causó un aumento significativo en la expresión del mediador inflamatorio Caspasa-1 en los diferentes tiempos evaluados de 6, 12 y 24 horas, lo que indica que el procedimiento experimental se realizó correctamente. Como se puede apreciar TNF- α indujo, por sí solo, un aumento de expresión de Caspasa-1 aproximadamente 0.95 ± 0.42 veces respecto al basal a las 6h, 9.53 ± 3.19 veces a las 12h y 8.35 ± 4.79 veces a las 24h.

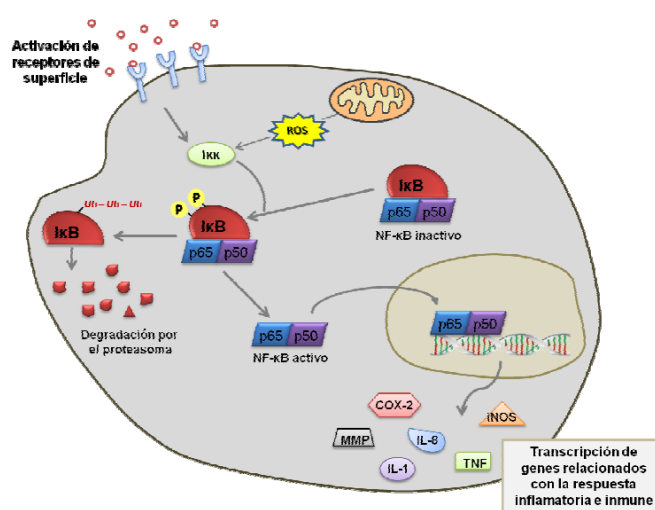
En cuanto a la producción de Caspasa-1, la combinación de la disfunción mitocondrial y la presencia de TNF- α , a diferencia de lo que sucedía con los resultados de la expresión de IL-1 β , no indujo un incremento en la respuesta inducida por TNF- α en ninguno de los tiempos evaluados de 6, 12 y 24h. Por ejemplo, en la expresión relativa de Caspasa-1 a 12h, el número de veces que incremento Caspasa-1 inducido por TNF- α 10 ng/ml solo es de 9.53 ± 3.19 veces mientras que el inducido por TNF- α 10 ng/ml + PQ 1 Mm respecto a TNF- α 10 ng/ml solo es de 8.46 ± 0.10 veces. A 24h por TNF- α 10 ng/ml solo es de 12.34 ± 4.52 veces, mientras que el inducido por TNF- α 10 ng/ml + PQ 1 Mm respecto a TNF- α 10 ng/ml sin combinar con disfunción mitocondrial, es de 13.39 ± 6.52 veces. Podemos concluir que en las condiciones experimentales evaluadas el daño mitocondrial no potencia la respuesta inflamatoria inducida por TNF- α mediado por la expresión de Caspasa-1.

El daño mitocondrial está directamente relacionado con la activación de rutas inflamatorias mediante la activación de NF- κ B y de caspasas. La activación de la “vía clásica” de NF- κ B tiene lugar en respuesta a la estimulación de los receptores de IL-1 o TNF- α , de los

TLR o los receptores de células T o B y conlleva la fosforilación, ubiquitinización y posterior degradación proteosomal de las proteínas I κ B catalizada por las quinasas de I κ B (IKKs). De esta manera, los dímeros de NF- κ B (generalmente heterodímeros p50/p65) pueden traslocarse al núcleo donde se unen a su secuencia consenso en el ADN y llevan a cabo la transcripción génica (Figura 10). Esta ruta, la más común, es esencial en el desarrollo y función del sistema inmune, y cuando está alterada participa en la iniciación y progresión de enfermedades autoinmunes. Mediante la unión al receptor IL-1R, la IL-1 β presente en el medio induciría la activación de NF- κ B y/o AP-1, un primer paso necesario (comúnmente denominado priming o cebado) que resulta en la transcripción de pro-IL-1 β y pro-IL-18. Por su parte, los ROS mitocondriales, además de inducir la activación de los factores sensibles al estado redox, también induciría (mediante mecanismos todavía desconocidos) la formación y activación del inflamasoma. Ello conduce a la maduración de la Caspasa-1, que a su vez escindiría las pro-IL-1 β y pro-IL-18 para convertirlas en sus formas activas, de manera que son liberadas para retroalimentar el ciclo de señalización y amplificar la respuesta inflamatoria(19) (Figura 15). La activación de la Caspasa-1 constituye un paso fundamental en la activación del inflamasoma y el desencadenamiento de esta ruta implicaría un aumento en la producción de las citoquinas inflamatorias (IL-1 β e IL-18).

Por todo ello, la implicación del inflamasoma en la patogénesis de la AR constituye una posibilidad que merece mayor estudio. También se ha propuesto la participación del inflamasoma en diversas enfermedades relacionadas con disfunción mitocondrial e inflamación, como en la enfermedad de Crohn, Parkinson, Alzheimer o diabetes tipo 2 (74, 75)

Figura 10: Esquema general de la activación de NF- κ B. En condiciones basales, NF- κ B se encuentra secuestrado en el citoplasma por las proteínas I κ B. Los estímulos activadores de NF- κ B convergen en la fosforilación y activación de la quinasa de I κ B (IKK). La IKK activada fosforila I κ B, marcándola para su ubiquitinización y posterior degradación por el proteasoma. Así, el dímero de NF- κ B (mayoritariamente el heterodímero p65/p50) es liberado e



importado al núcleo, en donde se une al ADN para activar la transcripción de un gran número de genes involucrados con la inflamación y la respuesta inmune.

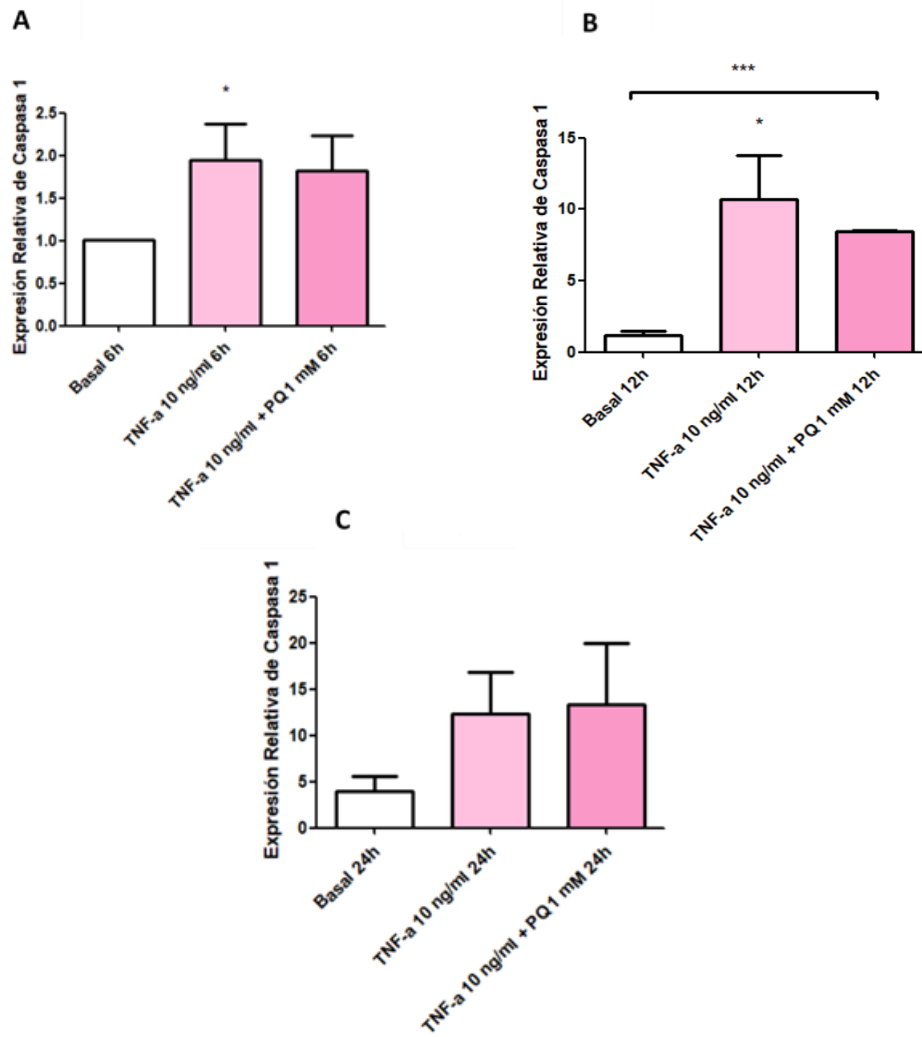


Figura 11: Variaciones producidas en la expresión génica de Caspasa-1 en respuesta a la acción de TNF- α y PQ. Los datos representados se corresponden con la media de los Cp obtenidos mediante q-PCR \pm SEM (n=3). **P A. Estímulos a 6 horas *P=0.0277. B. Estímulos a 12horas *P=0.0184***P=0.0002. C Estímulos a 24 horas.

4. Efecto del RSV sobre la expresión de IL-1 β y Caspasa-1.

Dada la importancia del estrés oxidativo en la respuesta inflamatoria y en el daño mitocondrial se evaluó la acción del RSV como tratamiento antioxidante natural en sinoviocitos humanos. En primer lugar, se realizó una preincubación de media hora con RSV, y posteriormente, se mantuvo la concentración de RSV durante todo el proceso de estimulación con los distintos estímulos, tal y como se indicó con anterioridad.

Como se observa en las figuras 12 y 13 (A y B) el resveratrol proporciona un efecto protector significativo frente a la inflamación. Es capaz de revertir la respuesta inflamatoria inducida por el TNF- α o por la combinación de disfunción mitocondrial y TNF- α sobre la expresión de IL-1 β y Caspasa-1.

El RSV ha mostrado propiedades antiinflamatorias y antioxidantes en numerosos estudios a lo largo de los últimos años. En este estudio se evaluó la capacidad de este compuesto para prevenir los efectos proinflamatorios de la disfunción mitocondrial en los sinoviocitos humanos en cultivo.

En artritis inflamatorias, como ya se ha visto, el estrés oxidativo y la inflamación juegan un papel de gran relevancia, pero los tratamientos antiinflamatorios actuales a largo plazo presentan efectos adversos importantes, especialmente gástricos y cardiovasculares. Por ello, ha surgido un gran interés en el estudio de estrategias terapéuticas ofrecidas por compuestos naturales con propiedades antiinflamatorias. El RSV es un polifenol que se encuentra en altas concentraciones en frutos rojos y especialmente en la piel de las uvas negras y el vino tinto. Este compuesto, ha sido ampliamente estudiado tanto in vitro como in vivo y en varios ensayos clínicos y se le han atribuido propiedades antiinflamatorias, inmunoreguladoras, cardioprotectoras, antioxidantes, anticancerígenas y antienvjecimiento (43, 74-78). En modelos animales, RSV protege del desarrollo de enfermedades relacionadas con el envejecimiento y mejora la función mitocondrial (44, 49).

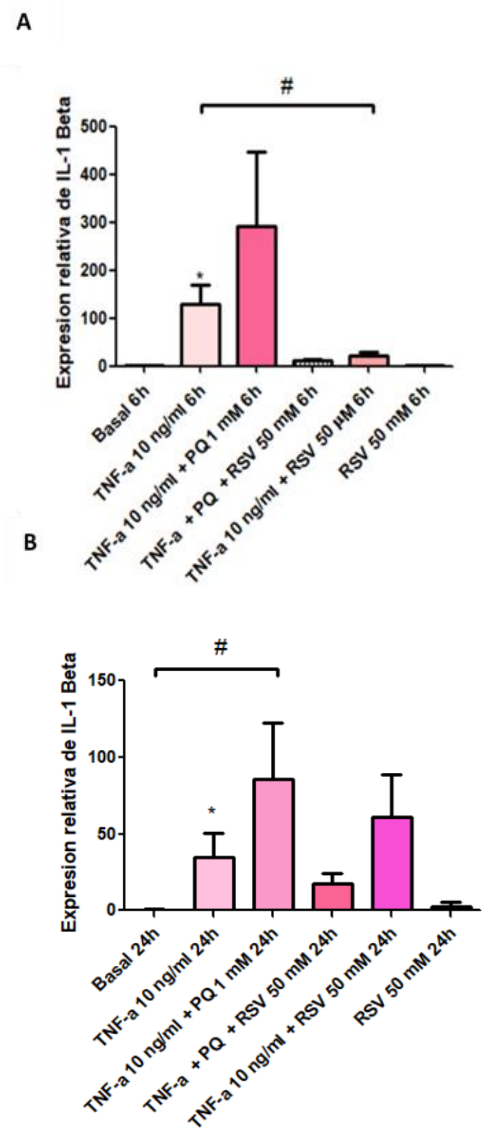


Figura 12: Variaciones producidas en la expresión génica de IL-1Beta en respuesta a la acción de diversos estímulos celulares. Los datos representados se corresponden con la media de los Cp obtenidos mediante q-PCR \pm SEM (n=3). A. Variación de la expresión de IL-1Beta en todos los casos de estimulación ensayados a 6 horas *P=0.0139, #= 0.0249. B Variación de la expresión de IL-1Beta en todos los casos de estimulación ensayados a 24 horas *P=0.0401, #= 0.0201.

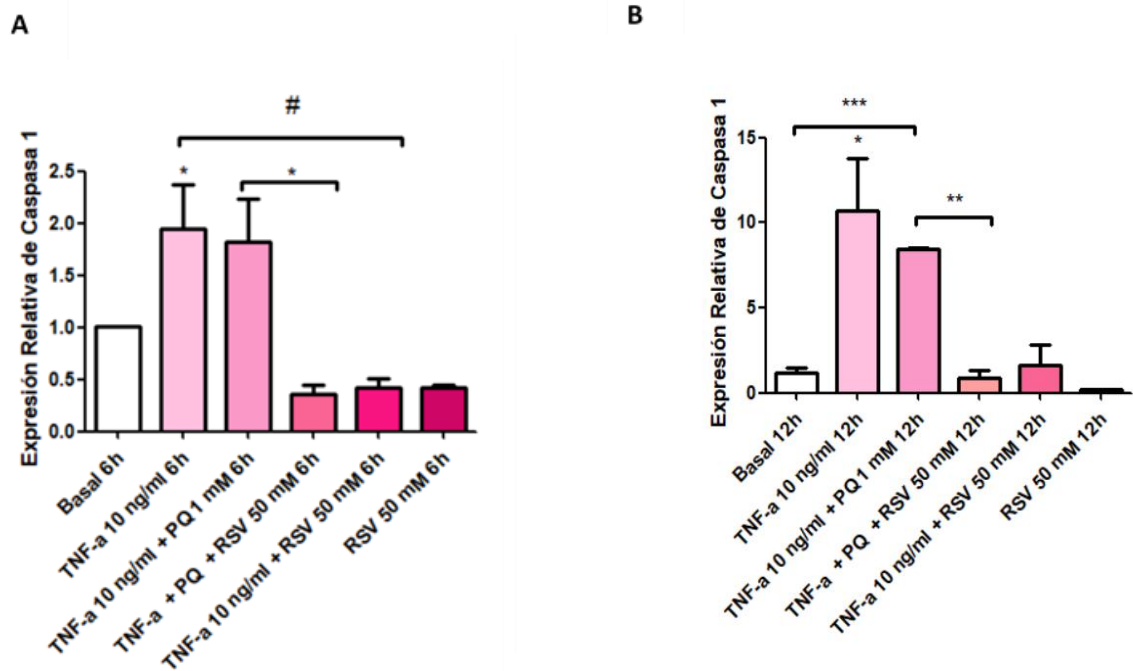


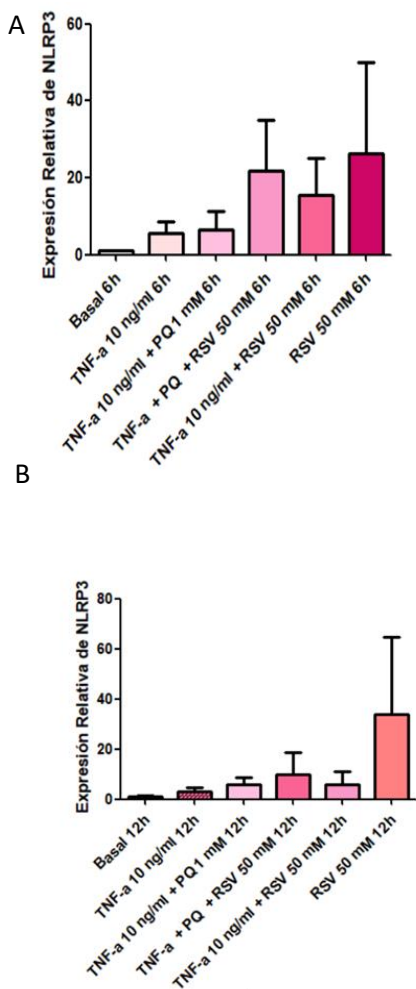
Figura 13: Efecto del resveratrol en la expresión génica de Caspasa-1 en respuesta a la acción de TNF- α y PQ. Los datos representados se corresponden con la media de los Cp obtenidos mediante q-PCR \pm SEM (n=3)., A. Variación de la expresión de Caspasa 1 en todos los casos de estimulación ensayados a 6 horas *P=0.0445,0.0130, # = 0.0121. B Variación de la expresión de Caspasa 1 en todos los casos de estimulación ensayados a 12 horas *P=0.0184, **P=0.0017, ***P=0.0002.

5. Efecto del TNF- α y su combinación con disfunción mitocondrial sobre la expresión de NLRP3. Modulación por RSV.

La proteína NLRP3 (*NOD-like receptor-related protein 3*) es un receptor citosólico que actúa como un sensor de señales de estrés (DAMPs), incluyendo proteínas oxidadas o señales de daño mitocondrial (como ADNmt o péptidos formilados). Además, se ha demostrado que la generación mitocondrial de ROS es necesaria para la activación de NLRP3 (79, 80). Así, la disfunción mitocondrial, a través de la incrementada producción de ROS, conduciría a la formación del NLRP3 inflamasoma y la activación de la Caspasa-1, que es la encargada de la escisión de la pro-IL-1 β . Las rutas de NF- κ B y NLRP3 inflamasoma pueden actuar conjuntamente activando citoquinas inflamatorias, lo que lleva a una sobreestimulación de la respuesta inflamatoria (81-83).

Como se puede apreciar en la figura 14 (A y B) los resultados obtenidos de expresión génica con el NLRP3 fueron opuestos al perfil de expresión génica de IL-1 β . Y más similar al de Caspasa 1, ya que la acción conjunta de la citoquina proinflamatoria TNF- α más PQ no produce un aumento significativo de la expresión de NLRP3, no hay efecto sinérgico, es decir, el daño mitocondrial no potencia la respuesta del TNF- α en relación a la expresión NLRP3 como sucedió en el perfil de expresión de IL-1 β . Como se puede apreciar TNF- α indujo, por sí solo, un aumento de expresión de NLRP3 de 5.45 ± 3.01 veces respecto al basal a las 6h y 9.53 ± 3.19 a las 12h.

En relación con el efecto protector del RSV, contrariamente a lo esperado, se observa



como el tratamiento RSV aumenta, aunque no de forma significativa, la expresión de NLRP3 (Fig. 14 A y B). Se determinó en primer lugar la expresión génica de NLRP3 en sinoviocitos con disfunción mitocondrial previamente tratados con RSV. Se observó que el RSV es capaz de aumentar la expresión de NLRP3 inducida por TNF- α en sinoviocitos humanos en cultivo en aproximadamente 50 veces. En este caso y en las condiciones ensayadas, la presencia de RSV tampoco ofrece protección alguna frente a la respuesta inflamatoria ocasionada por la acción sinérgica de conjunta TNF- α y PQ, ya que TNF- α 10ng/ml + PQ 1Mm + RSV 50mM produce un aumento de la expresión de NLRP3 de más de 50 veces aproximadamente, siendo cierto también que, la desviación estándar de los datos obtenidos en este caso es mayor que la del resto de casos estudiados.

Lo ideal sería ajustar al máximo la técnica y repetir el experimento al menos dos veces más, para poder descartar que se trate de un error experimental, y consolidar dicha respuesta celular como una tendencia claramente establecida.

Figura 14: Variaciones producidas en la expresión génica de NLRP3 en respuesta a la acción de diversos estímulos celulares. Los datos representados se corresponden con la media de los Cp obtenidos mediante q-PCR \pm SEM (n=3)., A. Variación de la expresión de NLRP3 en todos los casos de estimulación ensayados a 6 horas. B Variación de la expresión de NLRP3 en todos los casos de estimulación ensayados a 12 horas.

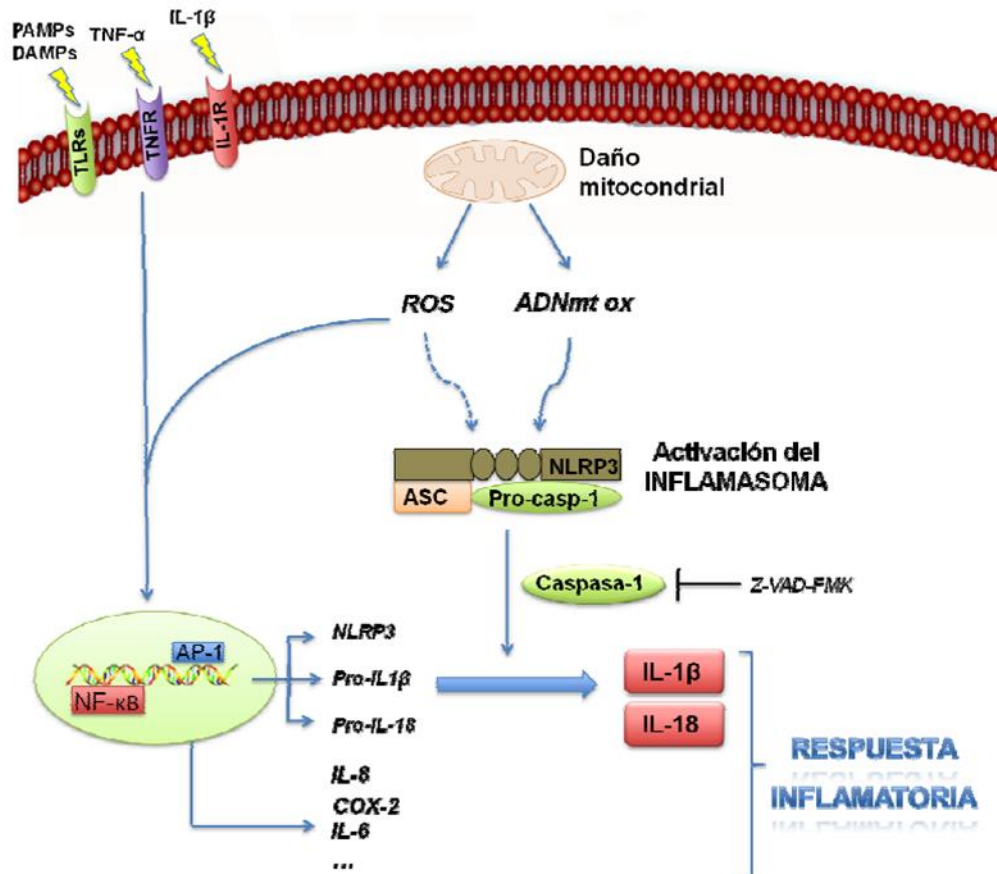


Figura 15: Posible vía de amplificación de la respuesta inflamatoria en sinoviocitos con disfunción mitocondrial mediante la activación del inflamasoma. La unión de la citoquina IL-1β a su receptor induce una cascada de señalización que culmina con la activación de NF-κB y/o AP-1 y la transcripción génica de mediadores inflamatorios como IL-8 y COX-2 y las formas inmaduras pro-IL-1 β y pro-IL-18. Estas últimas citoquinas se convierten en las formas maduras al sufrir la escisión proteolítica mediada por Caspasa-1. Por su parte, la Caspasa-1 sufre la maduración proteolítica desde la forma de pro-Caspasa-1 cuando se activa el inflamasoma. El inflamasoma se activa en respuesta a multitud de estímulos, entre los que se encuentran señales derivadas del daño mitocondrial. En sinoviocitos con disfunción mitocondrial, la liberación de ROS sería capaz de inducir la activación de inflamasoma, así como de contribuir a la activación de los factores de transcripción sensibles al estado redox NF-κB y AP-1. La maduración de la citoquina IL-1β y su secreción propiciada por la activación del inflamasoma sería responsable de la amplificación de la señal inflamatoria, induciendo también la transcripción de NLRP3 para aumentar sus niveles. El tratamiento de los sinoviocitos con un inhibidor de las caspasas, Z-VAD-FMK, interrumpiría la señalización reduciendo la respuesta inflamatoria(19).

En resumen, en este estudio se ha demostrado la participación de la disfunción mitocondrial en la respuesta inflamatoria de los sinoviocitos humanos. Esta participación

resulta de mayor relevancia fisiológica en sinoviocitos expuestos a IL-1 β , al provocar una amplificación de la señal inflamatoria. Pensamos que la activación del inflamasoma podría estar también involucrada. Sin embargo, nuestros resultados parecen sugerir que la activación del inflamasoma por disfunción mitocondrial en el sinoviocito parece no estar implicada, al menos a nivel de expresión génica de Caspasa-1. Es imprescindible realizar un estudio a nivel proteico, que confirme estos resultados. Además, es posible que el uso de compuestos antioxidantes naturales como el RSV proporcione efectos beneficiosos en pacientes con AR.

CONCLUSIONES

A partir del presente Trabajo de Fin de Máster en Biología Molecular, Celular y Genética se puede concluir qué:

1. La expresión de IL-1 β , Caspasa-1 y NLRP3 es inducida por el estímulo de TNF- α .
2. La disfunción mitocondrial hace más sensible al sinoviocito al efecto inflamatorio inducido por la citocina TNF- α , en relación a la expresión de IL-1 β .
3. La disfunción mitocondrial no sensibiliza al sinoviocito al efecto inflamatorio inducido por la citocina TNF- α , en relación a la inducción de la vía inflamatoria del inflamasoma, evaluada con los mediadores Caspasa-1 y NLRP3
4. El RSV ejerce un efecto antioxidante y antiinflamatorio, al ser capaz de revertir la respuesta inflamatoria inducida por TNF- α o la combinación de disfunción mitocondrial y TNF- α sobre la expresión de IL-1 β y Caspasa-1, más no en la expresión de NLRP3.

En resumen, los resultados de este trabajo demuestran, por una parte, que la disfunción mitocondrial en los sinoviocitos participa en su respuesta inflamatoria al amplificar el efecto de TNF- α sobre la expresión de IL-1 β . Sin embargo, nuestros resultados sugieren que la activación del inflamasoma por disfunción mitocondrial en el sinoviocito parece no estar implicada, al menos a nivel de expresión génica de Caspasa-1 y NLRP3. Es imprescindible realizar un estudio a nivel proteico, que confirme estos resultados. Por otro lado, nuestros resultados apoyan el papel antioxidante del RSV con relación a la expresión de los mediadores inflamatorios IL-1 y Caspasa-1.

REFERENCIAS

1. Suárez R, Buevas, N. El inflammasoma: mecanismos de activación.. Investigación Clínica. 2015. p. 74-99.
2. Turk JL. Inflammation: John Hunter's "A treatise on the blood, inflammation and gunshot wounds". *Int J Exp Pathol*. 1994;75(6):385-95.
3. Franchi L, Kamada N, Nakamura Y, Burberry A, Kuffa P, Suzuki S, et al. NLRC4-driven production of IL-1 β discriminates between pathogenic and commensal bacteria and promotes host intestinal defense. *Nat Immunol*. 2012;13(5):449-56.
4. Kolli D, Velayutham TS, Casola A. Host-Viral Interactions: Role of Pattern Recognition Receptors (PRRs) in Human Pneumovirus Infections. *Pathogens*. 2013;2(2).
5. Kawai T, Akira S. The roles of TLRs, RLRs and NLRs in pathogen recognition. *Int Immunol*. 2009;21(4):317-37.
6. Hardison SE, Brown GD. C-type lectin receptors orchestrate antifungal immunity. *Nat Immunol*. 2012;13(9):817-22.
7. Beutler B. Inferences, questions and possibilities in Toll-like receptor signalling. *Nature*. 2004;430(6996):257-63.
8. Bromfield JJ, Sheldon IM. Lipopolysaccharide initiates inflammation in bovine granulosa cells via the TLR4 pathway and perturbs oocyte meiotic progression in vitro. *Endocrinology*. 2011;152(12):5029-40.
9. Reynolds JM, Martinez GJ, Chung Y, Dong C. Toll-like receptor 4 signaling in T cells promotes autoimmune inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(32):13064-9.
10. Campanholle G, Mittelsteadt K, Nakagawa S, Kobayashi A, Lin SL, Gharib SA, et al. TLR-2/TLR-4 TREM-1 signaling pathway is dispensable in inflammatory myeloid cells during sterile kidney injury. *PLoS One*. 2013;8(7):e68640.
11. Ting JP, Kastner DL, Hoffman HM. CATERPILLERS, pyrin and hereditary immunological disorders. *Nat Rev Immunol*. 2006;6(3):183-95.
12. Martinon F, Burns K, Tschopp J. The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. *Mol Cell*. 2002;10(2):417-26.
13. Sakhon OS, Victor KA, Choy A, Tsuchiya T, Eulgem T, Pedra JH. NSD1 mitigates caspase-1 activation by listeriolysin O in macrophages. *PLoS One*. 2013;8(9):e75911.
14. Vajjhala PR, Mirams RE, Hill JM. Multiple binding sites on the pyrin domain of ASC protein allow self-association and interaction with NLRP3 protein. *J Biol Chem*. 2012;287(50):41732-43.
15. Halff EF, Diebolder CA, Versteeg M, Schouten A, Brondijk TH, Huizinga EG. Formation and structure of a NAIP5-NLRC4 inflammasome induced by direct interactions with conserved N- and C-terminal regions of flagellin. *J Biol Chem*. 2012;287(46):38460-72.
16. Segovia J, Sabbah A, Mgbemena V, Tsai SY, Chang TH, Berton MT, et al. TLR2/MyD88/NF- κ B pathway, reactive oxygen species, potassium efflux activates NLRP3/ASC inflammasome during respiratory syncytial virus infection. *PLoS One*. 2012;7(1):e29695.
17. Minkiewicz J, de Rivero Vaccari JP, Keane RW. Human astrocytes express a novel NLRP2 inflammasome. *Glia*. 2013;61(7):1113-21.
18. Szewczyk A, Wojtczak L. Mitochondria as a pharmacological target. *Pharmacol Rev*. 2002;54(1):101-27.
19. Varcácel Ares 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 angiogénica endotelial.: Universidade Da Coruña; 2014.

20. Dröse S, Brandt U. Molecular mechanisms of superoxide production by the mitochondrial respiratory chain. *Adv Exp Med Biol.* 2012;748:145-69.
21. Balaban RS, Nemoto S, Finkel T. Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell.* 2005;120(4):483-95.
22. Fang FC. Antimicrobial actions of reactive oxygen species. *MBio.* 2011;2(5).
23. Hitchon CA, El-Gabalawy HS. Oxidation in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther.* 2004;6(6):265-78.
24. Gavriilidis C, Miwa S, von Zglinicki T, Taylor RW, Young DA. Mitochondrial dysfunction in osteoarthritis is associated with down-regulation of superoxide dismutase 2. *Arthritis Rheum.* 2013;65(2):378-87.
25. Khan SR. Stress oxidative: nephrolithiasis and chronic kidney diseases. *Minerva Med.* 2013;104(1):23-30.
26. Rahman I. The role of oxidative stress in the pathogenesis of COPD: implications for therapy. *Treat Respir Med.* 2005;4(3):175-200.
27. Pitocco D, Tesauro M, Alessandro R, Ghirlanda G, Cardillo C. Oxidative stress in diabetes: implications for vascular and other complications. *Int J Mol Sci.* 2013;14(11):21525-50.
28. Dhalla NS, Temsah RM, Netticadan T. Role of oxidative stress in cardiovascular diseases. *J Hypertens.* 2000;18(6):655-73.
29. Klaunig JE, Kamendulis LM. The role of oxidative stress in carcinogenesis. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2004;44:239-67.
30. Lin MT, Beal MF. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature.* 2006;443(7113):787-95.
31. Williams DL. Oxidative stress and the eye. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 2008;38(1):179-92, vii.
32. Okayama Y. Oxidative stress in allergic and inflammatory skin diseases. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy.* 2005;4(4):517-9.
33. Firestein GS. Evolving concepts of rheumatoid arthritis. *Nature.* 2003;423(6937):356-61.
34. Feldmann M, Brennan FM, Maini RN. Rheumatoid arthritis. *Cell.* 1996;85(3):307-10.
35. Lundkvist J, Kastäng F, Kobelt G. The burden of rheumatoid arthritis and access to treatment: health burden and costs. *Eur J Health Econ.* 2008;8 Suppl 2:S49-60.
36. Mor A, Abramson SB, Pillinger MH. The fibroblast-like synovial cell in rheumatoid arthritis: a key player in inflammation and joint destruction. *Clin Immunol.* 2005;115(2):118-28.
37. Lee DM, Weinblatt ME. Rheumatoid arthritis. *Lancet.* 2001;358(9285):903-11.
38. Ferraccioli G, Bracci-Laudiero L, Alivernini S, Gremese E, Tolu B, De Benedetti F. Interleukin-1 β and interleukin-6 in arthritis animal models: roles in the early phase of transition from acute to chronic inflammation and relevance for human rheumatoid arthritis. *Mol Med.* 2010;16(11-12):552-7.
39. Gabay C, Lamacchia C, Palmer G. IL-1 pathways in inflammation and human diseases. *Nat Rev Rheumatol.* 2010;6(4):232-41.
40. Kay J, Calabrese L. The role of interleukin-1 in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford).* 2004;43 Suppl 3:iii2-iii9.
41. Choy EH, Panayi GS. Cytokine pathways and joint inflammation in rheumatoid arthritis. *N Engl J Med.* 2001;344(12):907-16.
42. Paul B, Masih I, Deopujari J, Charpentier C. Occurrence of resveratrol and pterostilbene in age-old darakhasava, an ayurvedic medicine from India. *J Ethnopharmacol.* 1999;68(1-3):71-6.

43. Aggarwal BB, Bhardwaj A, Aggarwal RS, Seeram NP, Shishodia S, Takada Y. Role of resveratrol in prevention and therapy of cancer: preclinical and clinical studies. *Anticancer Res.* 2004;24(5A):2783-840.
44. Ungvari Z, Bagi Z, Feher A, Recchia FA, Sonntag WE, Pearson K, et al. Resveratrol confers endothelial protection via activation of the antioxidant transcription factor Nrf2. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2010;299(1):H18-24.
45. Fukui M, Choi HJ, Zhu BT. Mechanism for the protective effect of resveratrol against oxidative stress-induced neuronal death. *Free Radic Biol Med.* 2010;49(5):800-13.
46. Shakibaei M, Harikumar KB, Aggarwal BB. Resveratrol addiction: to die or not to die. *Mol Nutr Food Res.* 2009;53(1):115-28.
47. Elmali N, Baysal O, Harma A, Esenkaya I, Mizrak B. Effects of resveratrol in inflammatory arthritis. *Inflammation.* 2007;30(1-2):1-6.
48. López-Armada MJ, Riveiro-Naveira RR, Vaamonde-García C, Valcárcel-Ares MN. Mitochondrial dysfunction and the inflammatory response. *Mitochondrion.* 2013;13(2):106-18.
49. Xuzhu G, Komai-Koma M, Leung BP, Howe HS, McSharry C, McInnes IB, et al. Resveratrol modulates murine collagen-induced arthritis by inhibiting Th17 and B-cell function. *Ann Rheum Dis.* 2012;71(1):129-35.
50. Vaamonde-García C, Riveiro-Naveira RR, Valcárcel-Ares MN, Hermida-Carballo L, Blanco FJ, López-Armada MJ. Mitochondrial dysfunction increases inflammatory responsiveness to cytokines in normal human chondrocytes. *Arthritis Rheum.* 2012;64(9):2927-36.
51. Dave M, Attur M, Palmer G, Al-Mussawir HE, Kennish L, Patel J, et al. The antioxidant resveratrol protects against chondrocyte apoptosis via effects on mitochondrial polarization and ATP production. *Arthritis Rheum.* 2008;58(9):2786-97.
52. Csiszar A, Labinskyy N, Pinto JT, Ballabh P, Zhang H, Losonczy G, et al. Resveratrol induces mitochondrial biogenesis in endothelial cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2009;297(1):H13-20.
53. Chen ML, Yi L, Jin X, Liang XY, Zhou Y, Zhang T, et al. Resveratrol attenuates vascular endothelial inflammation by inducing autophagy through the cAMP signaling pathway. *Autophagy.* 2013;9(12):2033-45.
54. Low IC, Chen ZX, Pervaiz S. Bcl-2 modulates resveratrol-induced ROS production by regulating mitochondrial respiration in tumor cells. *Antioxid Redox Signal.* 2010;13(6):807-19.
55. de la Lastra CA, Villegas I. Resveratrol as an antioxidant and pro-oxidant agent: mechanisms and clinical implications. *Biochem Soc Trans.* 2007;35(Pt 5):1156-60.
56. Zhang Q, Pi J, Woods CG, Andersen ME. A systems biology perspective on Nrf2-mediated antioxidant response. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2010;244(1):84-97.
57. Park SJ, Ahmad F, Philp A, Baar K, Williams T, Luo H, et al. Resveratrol ameliorates aging-related metabolic phenotypes by inhibiting cAMP phosphodiesterases. *Cell.* 2012;148(3):421-33.
58. Salminen A, Hyttinen JM, Kaarniranta K. AMP-activated protein kinase inhibits NF- κ B signaling and inflammation: impact on healthspan and lifespan. *J Mol Med (Berl).* 2011;89(7):667-76.
59. Komen JC, Thorburn DR. Turn up the power - pharmacological activation of mitochondrial biogenesis in mouse models. *Br J Pharmacol.* 2014;171(8):1818-36.
60. de Oliveira MR, Ferreira GC, Schuck PF. Protective effect of carnolic acid against paraquat-induced redox impairment and mitochondrial dysfunction in SH-SY5Y cells: Role for PI3K/Akt/Nrf2 pathway. *Toxicol In Vitro.* 2016;32:41-54.

61. Jaronwitchawan T, Chaicharoenaudomrung N, Namkaew J, Noisa P. Curcumin attenuates paraquat-induced cell death in human neuroblastoma cells through modulating oxidative stress and autophagy. *Neurosci Lett*. 2017;636:40-7.
62. Pourgholamhossein F, Sharififar F, Rasooli R, Pourgholi L, Nakhaeipour F, Samareh-Fekri H, et al. Thymoquinone effectively alleviates lung fibrosis induced by paraquat herbicide through down-regulation of pro-fibrotic genes and inhibition of oxidative stress. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2016;45:340-5.
63. Chu CQ, Field M, Feldmann M, Maini RN. Localization of tumor necrosis factor alpha in synovial tissues and at the cartilage-pannus junction in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 1991;34(9):1125-32.
64. Brennan FM, Chantry D, Jackson A, Maini R, Feldmann M. Inhibitory effect of TNF alpha antibodies on synovial cell interleukin-1 production in rheumatoid arthritis. *Lancet*. 1989;2(8657):244-7.
65. Bertolini DR, Nedwin GE, Bringman TS, Smith DD, Mundy GR. Stimulation of bone resorption and inhibition of bone formation in vitro by human tumour necrosis factors. *Nature*. 1986;319(6053):516-8.
66. Saklatvala J. Tumour necrosis factor alpha stimulates resorption and inhibits synthesis of proteoglycan in cartilage. *Nature*. 1986;322(6079):547-9.
67. Dayer JM, Beutler B, Cerami A. Cachectin/tumor necrosis factor stimulates collagenase and prostaglandin E2 production by human synovial cells and dermal fibroblasts. *J Exp Med*. 1985;162(6):2163-8.
68. Vilcek J, Palombella VJ, Henriksen-DeStefano D, Swenson C, Feinman R, Hirai M, et al. Fibroblast growth enhancing activity of tumor necrosis factor and its relationship to other polypeptide growth factors. *J Exp Med*. 1986;163(3):632-43.
69. Gamble JR, Harlan JM, Klebanoff SJ, Vadas MA. Stimulation of the adherence of neutrophils to umbilical vein endothelium by human recombinant tumor necrosis factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1985;82(24):8667-71.
70. Cavender D, Saegusa Y, Ziff M. Stimulation of endothelial cell binding of lymphocytes by tumor necrosis factor. *J Immunol*. 1987;139(6):1855-60.
71. Pettipher ER, Higgs GA, Henderson B. Interleukin 1 induces leukocyte infiltration and cartilage proteoglycan degradation in the synovial joint. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1986;83(22):8749-53.
72. Haworth C, Brennan FM, Chantry D, Turner M, Maini RN, Feldmann M. Expression of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in rheumatoid arthritis: regulation by tumor necrosis factor-alpha. *Eur J Immunol*. 1991;21(10):2575-9.
73. Valcárcel-Ares MN, Riveiro-Naveira RR, Vaamonde-García C, Loureiro J, Hermida-Carballo L, Blanco FJ, et al. Mitochondrial dysfunction promotes and aggravates the inflammatory response in normal human synoviocytes. *Rheumatology (Oxford)*. 2014;53(7):1332-43.
74. Movahed A, Yu L, Thandapilly SJ, Louis XL, Netticadan T. Resveratrol protects adult cardiomyocytes against oxidative stress mediated cell injury. *Arch Biochem Biophys*. 2012;527(2):74-80.
75. Magyar K, Halmosi R, Palfi A, Feher G, Czopf L, Fulop A, et al. Cardioprotection by resveratrol: A human clinical trial in patients with stable coronary artery disease. *Clin Hemorheol Microcirc*. 2012;50(3):179-87.
76. Singh NP, Hegde VL, Hofseth LJ, Nagarkatti M, Nagarkatti P. Resveratrol (trans-3,5,4'-trihydroxystilbene) ameliorates experimental allergic encephalomyelitis, primarily via induction of apoptosis in T cells involving activation of aryl hydrocarbon receptor and estrogen receptor. *Mol Pharmacol*. 2007;72(6):1508-21.

77. Bereswill S, Muñoz M, Fischer A, Plickert R, Haag LM, Otto B, et al. Anti-inflammatory effects of resveratrol, curcumin and simvastatin in acute small intestinal inflammation. *PLoS One*. 2010;5(12):e15099.
78. Csiszar A, Sosnowska D, Wang M, Lakatta EG, Sonntag WE, Ungvari Z. Age-associated proinflammatory secretory phenotype in vascular smooth muscle cells from the non-human primate *Macaca mulatta*: reversal by resveratrol treatment. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2012;67(8):811-20.
79. Zhou R, Yazdi AS, Menu P, Tschopp J. A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation. *Nature*. 2011;469(7329):221-5.
80. Tschopp J, Schroder K. NLRP3 inflammasome activation: The convergence of multiple signalling pathways on ROS production? *Nat Rev Immunol*. 2010;10(3):210-5.
81. Escames G, López LC, García JA, García-Corzo L, Ortiz F, Acuña-Castroviejo D. Mitochondrial DNA and inflammatory diseases. *Hum Genet*. 2012;131(2):161-73.
82. Kepp O, Galluzzi L, Kroemer G. Mitochondrial control of the NLRP3 inflammasome. *Nat Immunol*. 2011;12(3):199-200.
83. Zhang Q, Raouf M, Chen Y, Sumi Y, Sursal T, Junger W, et al. Circulating mitochondrial DAMPs cause inflammatory responses to injury. *Nature*. 2010;464(7285):104-7.