



UNIVERSIDADE DA CORUÑA



Máster en Biología Molecular, Celular y Genética.

Trabajo de Fin de Máster

Papel de la autofagia en el remodelado de la membrana peritoneal asociado a pacientes tratados con diálisis peritoneal.

Papel da autofaxia no remodelado da membrana peritoneal asociado a pacientes tratados con diálise peritoneal.

Autophagy's role in the peritoneal membrane remodelling associated to patients treated with peritoneal dialysis.

Mirian López Pardo

17 de Septiembre de 2020

Directora académica: María José López Armada

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

PAPEL DE LA AUTOFAGIA EN EL REMODELADO DE LA
MEMBRANA PERITONEAL ASOCIADO A PACIENTES TRATADOS
CON DIÁLISIS PERITONEAL.



Autora

Mirian López Pardo

LOPEZ
ARMADA
MARIA JOSE
- 08029604M

Firmado digitalmente
por LOPEZ ARMADA
MARIA JOSE -
08029604M
Fecha: 2020.09.15
17:10:04 +02'00'

Directora

María José López Armada

En A Coruña, a 17 de Septiembre de 2020.

ÍNDICE.

1. Resumen.....	1
2. Lista de abreviaturas.....	3
3. Antecedentes y estado actual.....	4
3.1. El envejecimiento y su relación con las enfermedades renales.	4
3.2. La diálisis peritoneal.	4
3.2.1. El estrés oxidativo y activación del inflammasoma NLRP3.	5
3.2.2. La transición epitelio-mesenquimal.....	7
3.3. La autofagia.	10
3.4. El resveratrol.....	14
4. Hipótesis.....	17
5. Objetivos.	17
6. Metodología.	18
7. Plan de trabajo.....	21
8. Cuestiones éticas.	21
9. Aplicabilidad.....	22
10. Plan para la difusión de los resultados.....	22
11. Recursos necesarios.....	22
12. Bibliografía.....	24
ANEXO: Resultados previos.....	30

1. Resumen.

La diálisis peritoneal es uno de los tratamientos a los que los pacientes con una enfermedad renal crónica pueden ser sometidos. Pese a sus beneficiosas ventajas frente a la hemodiálisis, es menos empleada, debido a las complicaciones en las que puede derivar, entre las que se puede destacar la pérdida de integridad de la membrana peritoneal, resultado de la transición epitelio-mesenquimal (TEM), lo que conlleva a que la técnica ya no sea efectiva. Se ha descrito como la mitocondria juega un papel fundamental como detonante en este proceso, produciendo un estrés oxidativo. El objetivo de este proyecto es conocer si unos niveles bajos de autofagia pueden estar implicados en ese estrés oxidativo, lo que permitiría buscar dianas terapéuticas y posibles moléculas que atenúen los daños, como puede ser el resveratrol, un conocido antioxidante y antiinflamatorio. Para ello, se analizarán los niveles de autofagia, inflamación y estrés mitocondrial, mediante estudios de ARN (RT-PCR) y proteicos (Western-Blot y citometría de flujo) de células mesoteliales procedentes del efluente peritoneal de pacientes en diálisis peritoneal, así como en la línea celular MeT5A.

Palabras clave: Diálisis peritoneal, Transición epitelio-mesenquimal, TEM, Autofagia, Mitofagia, Resveratrol.

Resumen.

A diálise peritoneal é un dos tratamentos aos que os pacientes cunha enfermidade renal crónica poden ser sometidos. Pese as súas beneficiosas vantaxes fronte á hemodiálise, é menos empregada, debido ás complicacións nas que pode derivar, entre ás que se pode destacar á perda de integridade da membrana peritoneal, resultado da transición epitelio-mesenquimal (TEM), o que fai que a técnica non sexa efectiva. Describiuse como a mitocondria ten un papel fundamental como detonante neste proceso, producindo un estrés oxidativo. O obxectivo deste proxecto é coñecer se uns niveis baixos de autofaxia poden estar implicados nese estrés oxidativo, o que permitiría buscar dianas terapéuticas e posibles moléculas que atenúen os danos, como pode ser o resveratrol, un coñecido antioxidante e antiinflamatorio. Para isto, analizaranse os niveis de autofaxia, inflamación e estrés mitocondrial, mediante estudos do ARN (RT-PCR) e

proteicos (Western Blot e citometría de flujo) de células mesoteliais procedentes do efluente peritoneal de pacientes en diálise peritoneal, así como na línea celular MeT5A.

Palabras clave: Diálise peritoneal, Transición epitelio-mesenquimal, TEM, Autofaxia, Mitofaxia, Resveratrol.

Summary.

Peritoneal dialysis is one of the treatments that patients with a chronic kidney disease can undergo. Even though it has beneficial advantages over hemodialysis, it is less used, due to the complications in which it can derive, like the loss of the peritoneal membrane's integrity, as a result of the epithelial to mesenchymal transition (EMT), which means that the technique is no longer effective. It has already been described how fundamental mitochondria is, triggering this process by producing oxidative stress. The objective of this project is to find out if low levels of autophagy may be involved in this oxidative stress, allowing the research of therapeutic targets and molecules that could attenuate the damage, such as resveratrol, a well-known antioxidant and anti-inflammatory. In order to do this, the levels of autophagy, inflammation and mitochondrial stress will be analysed through studies of the RNA (RT-PCR) and proteins (Western-Blot and flow cytometry) of peritoneal mesothelial cells from the effluent of peritoneal dialysis patients, as with the MeT5A cell line.

Key words: Peritoneal dialysis, Epithelial to mesenchymal transition, EMT, Autophagy, Mitophagy, Resveratrol.

2. Lista de abreviaturas.

α -SMA: *α -smooth muscle actin*

BMP-7: proteína morfogenética ósea 7

COX-2: ciclooxigenasa 2

DP: diálisis peritoneal

ERK: quinasa regulada por señal extracelular

FGF: factor de crecimiento fibroblástico

GDP: productos de degradación de glucosa

IFN- γ : interferón γ

IL: interleuquina

LD: líquido de diálisis

MAPK: proteín-quinasa activada por mitógenos

MMP: metaloproteinasas

mTOR: diana de rapamicina en células de mamífero

NF- κ B: factor nuclear κ B

NLRP3: *NOD-like receptor-related protein 3*

ROS: especies reactivas de oxígeno

TEM: transición epitelio-mesenquimal

TGF- β : factor de crecimiento transformante β

TME: transición mesenquimal-epitelial

TNF- α : factor de necrosis tumoral α

TRX1: tioredoxina 1

TXNIP: *thioredoxin interacting protein*

VEGF: factor de crecimiento endotelial

3. Antecedentes y estado actual.

3.1.El envejecimiento y su relación con las enfermedades renales.

En la actualidad existe un creciente envejecimiento de la población, debido a una disminución de nacimientos y una esperanza de vida cada vez mayor. Es por ello por lo que la proporción mundial de personas mayores de 60 años se espera que alcance en los próximos años el 22%. Sin embargo, no se puede determinar que las personas mayores presenten una salud mejor a la de sus padres (*OMS, 2017*). Relacionada con este envejecimiento, así como con un aumento de casos de diabetes tipo II, existe una emergente nefropatía crónica, en la cual los pacientes necesitan diálisis continuas o un trasplante para sobrevivir, debido a una deficiencia en el filtrado glomerular (*White et al, 2008*). En concreto, en España un 15% de la población sufre una enfermedad renal crónica, y centrándonos en una población mayor de 65 años, la cifra sube hasta el 37% (*Gorostidi et al., 2018*). De todas formas, los trasplantes no son realmente habituales, de tal forma que menos del 10% de los que serían necesarios se llevan a cabo. Como consecuencia, la diálisis continúa siendo uno de los principales tratamientos, pese a que se estima que supone en conjunto un mayor gasto que el paso por quirófano (*Jones & Bes, 2012*).

3.2.La diálisis peritoneal.

Un fallo renal crónico puede ser tratado por dos tipos principales de diálisis, la cual se basa en la difusión de partículas a través de una membrana semipermeable, de tal forma que elementos de desecho, como la creatina o la urea, son eliminados. En la hemodiálisis, la eliminación de residuos y agua se consigue usando un filtro externo, denominado dializador, el cual contiene dicha membrana. En este caso, el gradiente que genera la difusión es creado debido al movimiento de la sangre hacia un sentido, y el del dializador en el contrario. Mientras, la diálisis peritoneal (DP), utiliza la membrana peritoneal del propio individuo como barrera semipermeable (*Vadakedath & Kandi, 2017*), tal y como se muestra en la Figura 1.

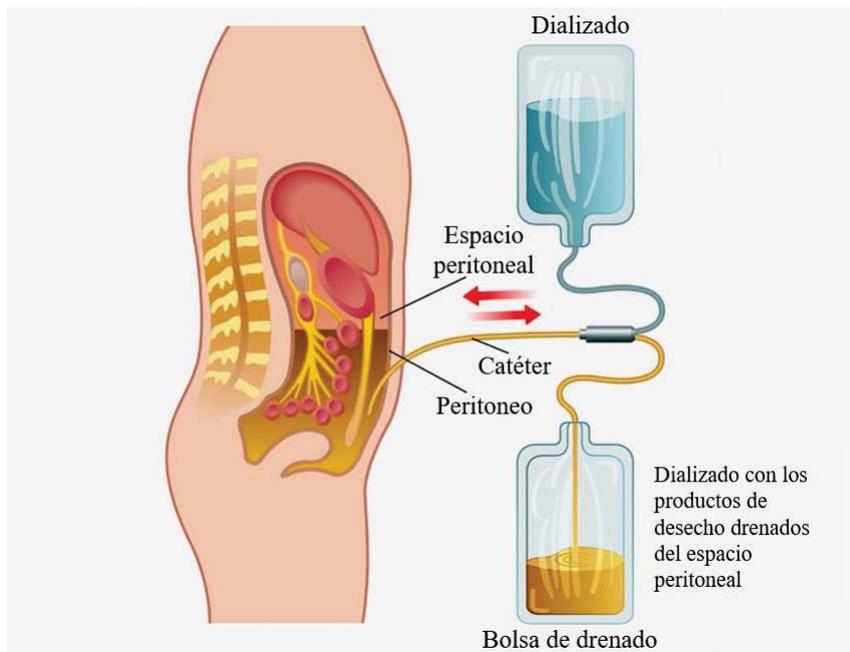


Fig. 1. Esquema de la aplicación de la diálisis peritoneal. El líquido de diálisis entra en la cavidad peritoneal a través de un catéter. Una vez realizado el intercambio gracias a la capacidad dializante de la membrana peritoneal, los productos de desecho son eliminados. *Modificado de <https://www.medscape.com/viewarticle/887404>*

El peritoneo se trata de una delicada estructura, que rodea la cavidad peritoneal, formada por una capa de células mesoteliales, debajo de la que se encuentra una capa submesotelial con vasos sanguíneos y linfáticos (Bartosova & Schmitt, 2019). Estas células mesoteliales presentan una morfología epitelial, variando esta entre alargada, aplanada o escamosa, descansando sobre una fina membrana basal (Liu et al., 2015) (Figura 3A). Gracias a esta estructura del peritoneo y al líquido de diálisis (LD) que se introduce en él, por vía de un catéter, se produce no solo una eliminación de toxinas, sino también un mantenimiento del volumen y el balance de sodio (Maharjan & Davenport, 2019).

3.2.1. El estrés oxidativo y activación del inflammasoma NLRP3.

La diálisis peritoneal se trata de una terapia en la que el paciente puede permanecer en su casa, y por lo tanto presenta grandes beneficios sociales para el mismo. Es por ello por lo que suele ser empleada especialmente en pacientes jóvenes (Schmitt & Aufricht, 2017). Pese a esta ventaja que presenta la DP, su uso no es comparable al de la hemodiálisis, lo que se puede deber a las complicaciones que pueden surgir, entre las que destacan la peritonitis, infecciones y deterioro en la capacidad de la ultrafiltración de la membrana peritoneal (Maharjan & Davenport, 2019). Esto parece estar

relacionado con las características bioincompatibles, o incluso tóxicas, del LD, el cual presenta altas concentraciones osmóticas, al tener altos niveles de glucosa, icodextrina o aminoácidos, y bajas o nulas concentraciones de solutos que deben ser eliminados, como potasio o fosfato, así como productos metabólicos de desecho. Además, esta bioincompatibilidad de los LDs también puede estar relacionada con las técnicas con las que son generados en la industria farmacéutica. Por ejemplo, debido a la esterilización por calor, la glucosa se puede caramelizar o degradar, generando los denominados productos de degradación de la glucosa (GDP del inglés, *Glucose Degradation Products*). Para que esto no suceda, se genera un pH no fisiológico de 5.5 (*Schmitt & Aufricht, 2017*). Además cabe destacar las posibles complicaciones asociadas al propio catéter (*Kang, 2020*).

En respuesta a esta alta concentración de glucosa, se ha visto como aumenta la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) por parte de la mitocondria (*Hara et al., 2017*). Molecularmente, un influjo mayor de glucosa supone un mayor catabolismo de esta a través del ciclo de Krebs, el cual generaría una enorme cantidad de donadores de electrones, como son NADH y FADH₂, colapsando la cadena de transporte de electrones, de tal forma que los electrones extra son donados a oxígeno molecular, generando ROS (*Eleftheriadis et al., 2019*). Es por ello, por lo que este orgánulo se trata de la mayor fuente de ROS, siendo, además, uno de los orgánulos más débiles a su exposición. Como consecuencia, los ROS generan un bucle de retroalimentación, induciendo un estrés oxidativo celular, que cada vez es mayor (*Kuo et al, 2009*).

Asimismo, se ha comprobado una importante relación de los ROS con el inflammasoma NLRP3 (*Wu et al., 2019*), un complejo multiproteico activador de la síntesis y secreción de la interleuquina (IL)-1 β e IL-18 (*Abderrazak et al., 2015*), que junto con otras citoquinas como IL-6, factor de necrosis tumoral α (TNF- α), interferón γ (IFN- γ) y el factor de crecimiento transformante β (TGF- β) suponen la base molecular de la inflamación (*Cem Gabay & Irving Kushner, 1999*). Bajo condiciones normales, *Thioredoxin Interacting Protein* (TXNIP) se encuentra asociado a tiorredoxina 1 (TRX1), y el inflammasoma NLRP3 permanece inactivo. Pero cuando las células se encuentran bajo un estrés oxidativo, la producción de ROS desencadena la disociación de TXNIP y TRX1, de tal forma que ahora TXNIP se puede unir al inflammasoma NLRP3, activándolo (Figura 2), y por lo tanto, se genera una inflamación en el peritoneo (*Wu et al., 2019*). Durante esta, se produce un deterioro de la membrana

peritoneal, en la denominada transición epitelio-mesenquimal (TEM), que acaba produciendo una fibrosis (Aroeira et al., 2007) y en consecuencia el fallo de la técnica de DP.

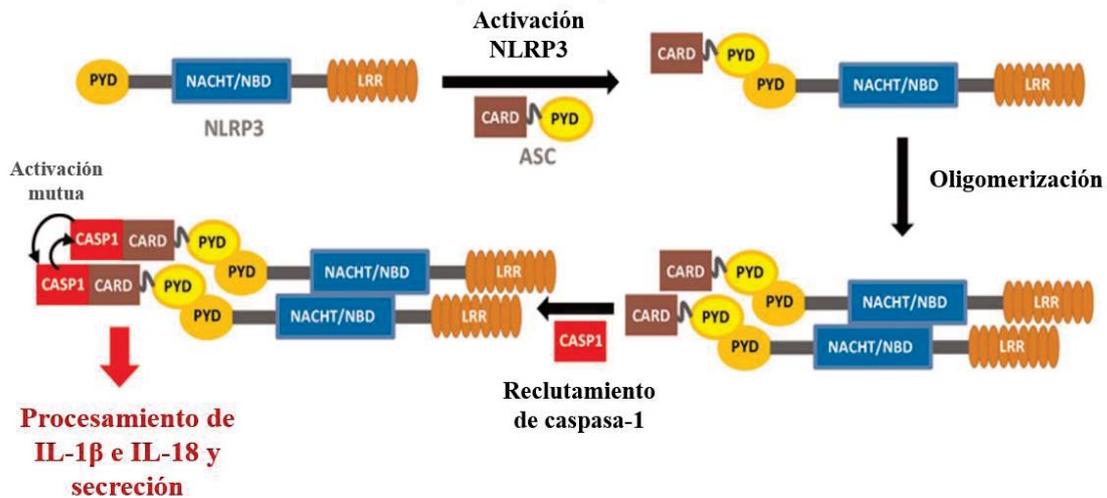


Fig. 2. Activación del inflamasoma NLRP3. La estructura básica del inflamasoma NLRP3 es una proteína con un dominio pirina (PYD), un dominio de unión a nucleótidos (NBD) y un dominio rico en repeticiones de leucina (LRR). Cuando esta es activada, se asocia a la proteína adaptadora ASC, a través del dominio PYD que ambas tienen. Esto permite una oligomerización, que tiene como consecuencia un reclutamiento de caspasa-1, gracias al dominio CARD presente en ASC, dando lugar a un inflamasoma activo, encargado de procesar y secretar IL-1 β e IL-18, citoquinas muy interrelacionadas entre sí. *Abderrazak et al., 2015.*

3.2.2. La transición epitelio-mesenquimal.

La TEM se trata de un proceso biológico de desarrollo y cicatrización de órganos, que permite a las células epiteliales adquirir un fenotipo mesenquimal a través de multitud de procesos, que les confieren una mayor capacidad de migración, invasión, renovación y producción de matriz extracelular (*Kang, 2020*). En concreto se pueden encontrar tres tipos de TEM:

- TEM de tipo 1, asociada a embriogénesis y desarrollo de órganos.
- TEM de tipo 2, que explica el paso de una célula epitelial a mesenquimal, para la reparación de un tejido y fibrosis, como es el caso de la TEM asociada a la DP.
- TEM de tipo 3, la cual ocurre en células epiteliales carcinógenas, que adquieren el fenotipo mesenquimal con la capacidad de migrar e invadir (*Liu et al., 2015*).

En este proceso se ha visto como las células mesoteliales juegan un papel fundamental, ya que es el daño de estas células quien lo desencadena (*Zhou et al, 2016*). Como se muestra en la Figura 4, la TEM comienza con una disociación de las uniones intercelulares, al suprimirse la regulación de moléculas como E-cadherina, claudinas, ocludinas, zona ocludens-I y desmoplaquina, así como una pérdida de las microvellosidades. A continuación, debido a una reorganización del citoesqueleto, la célula modifica su polaridad, comenzando también a expresar α -smooth muscle actin (α -SMA) y aumentando su capacidad migratoria. Finalmente, las células adquieren la capacidad de degradar la membrana basal e invadir el área submesotelial (*Aroeira et al., 2007*). Como consecuencia, la membrana peritoneal pierde su capa de células mesoteliales, observándose además un engrosamiento de la capa submesotelial, angiogénesis y fibrosis (Figura 3B) (*Kang, 2020*).

En el peritoneo de pacientes en DP destacan los miofibroblastos, células que presentan características intermedias entre fibroblastos y células del músculo liso, expresando α -SMA. El origen de este tipo celular es heterogéneo, ya que puede proceder de fibroblastos, de células circulantes, y especialmente, de células mesoteliales que han sufrido TEM (*Aroeira et al., 2007*). Los miofibroblastos sintetizan una matriz extracelular rica en colágeno, fibronectina, laminina, proteoglicanos y factores fibrogénicos (*Zhu et al, 2019*). Una producción excesiva de matriz extracelular, especialmente de colágeno, por parte de estas células produce una destrucción de la arquitectura normal del tejido (*Liu et al., 2015*). Debido a la pérdida de integridad que sufre la membrana peritoneal, se produce un fallo gradual de la función peritoneal, de tal forma que el tratamiento con DP deja de ser efectivo en aproximadamente un 30% de los pacientes (*Wang et al., 2016*). Cabe destacar el aumento que sufre la capa submesotelial, la cual en individuos sanos mide entorno a los 40 μm . Mientras, en pacientes que han sido sometidos a DP durante menos de dos años, 180 μm , y 600 μm si la terapia ha durado más de 8 años (*Williams et al, 2003*).

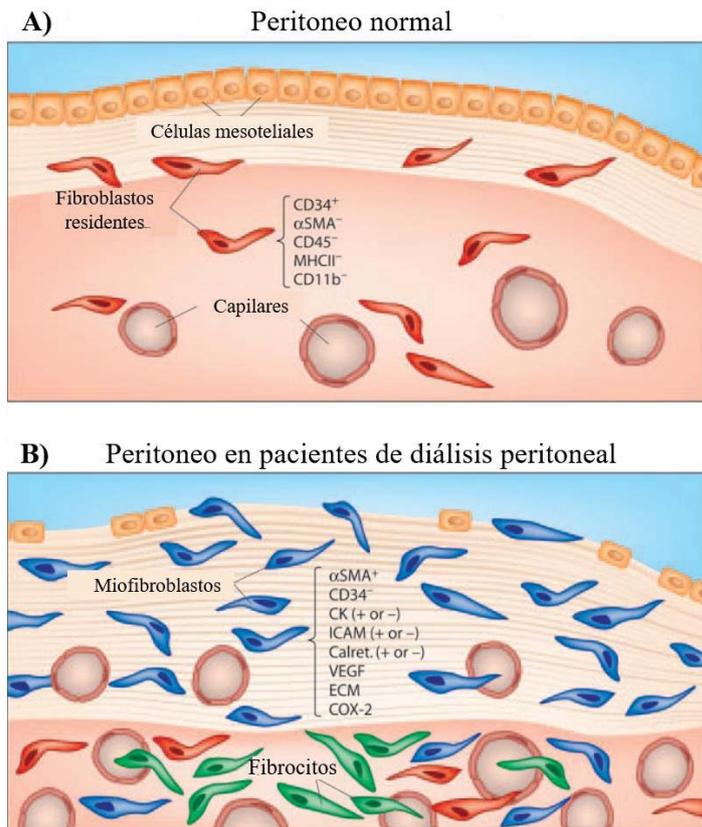


Fig. 3. Estructura del peritoneo. **(A)** La morfología del peritoneo normal se caracteriza por una monocapa de células mesoteliales, superior a una capa submesotelial de tejido conjuntivo con pocos fibroblastos. **(B)** Debido a la diálisis peritoneal, la membrana peritoneal sufre una serie de cambios morfológicos y alteraciones a medio/largo plazo, entre los que destaca una pérdida de la monocapa de células mesoteliales, un aumento de fibroblastos, pudiéndose encontrar ahora miofibroblastos, y un aumento del número de capilares sanguíneos. *Aroeira et al, 2004.*

Molecularmente, el TGF- β es considerado como el principal factor profibrótico en el peritoneo, junto con otros mediadores inflamatorios como son TNF- α , IL-1, IL-8 y el factor de crecimiento fibroblástico (FGF)-2, estimulando la proliferación de los fibroblastos residentes, y que las células mesoteliales sufran una TEM. Además, IL-8 y FGF-2, pero especialmente el factor de crecimiento endotelial (VEGF) inducirían un aumento en el número de capilares, aumentando también la permeabilidad de los vasos sanguíneos (Aroeira et al., 2007). Es importante tener en cuenta que bajo altas concentraciones de glucosa y GDP, se ha observado como existe una mayor producción de TGF- β por parte de las células mesoteliales (*Eleftheriadis et al., 2019; Zhou et al., 2016*).

Un aumento del TGF- β en las células mesoteliales produce que las proteínas Smad (Smad 2, Smad3 y Smad7) se fosforilen, de tal forma que se activa la transcripción de ciertos genes, entre los que destaca Snail, fibronectina y β -catenina. De todas formas, se ha visto como también participa en una ruta no dependiente de proteínas Smad, en la que aparecen la quinasa regulada por señal extracelular (ERK), el factor nuclear κB (NF- κB), la proteína-quinasa activada por mitógenos (MAPK), y la diana de rapamicina en células de mamífero (mTOR), entre otras (*Kang, 2020*). Aunque el TGF- β actúa a

través de las dos rutas, la mayoría de las señales profibróticas derivan de la vía dependiente de las proteínas Smad (Zhou *et al.*, 2016).

De todas formas, la TEM puede ser reversible, al menos en etapas tempranas (Figura 4), haciendo que las células obtengan de nuevo sus características epiteliales a través de la transición mesenquimal-epitelial (TME) (Kang, 2020). En concreto, se podría atrasar una fibrosis si se promueve la supervivencia de las células mesoteliales, o si se inhiben las señales de TEM (Kawka *et al.*, 2019). Esto último se podría conseguir con la proteína morfogenética ósea 7 (BMP-7), la cual es capaz de inhibir al TGF- β , pero también gracias a inhibidores de MAPK y antioxidantes (Bahl Lee & Hunjoo, 2007).

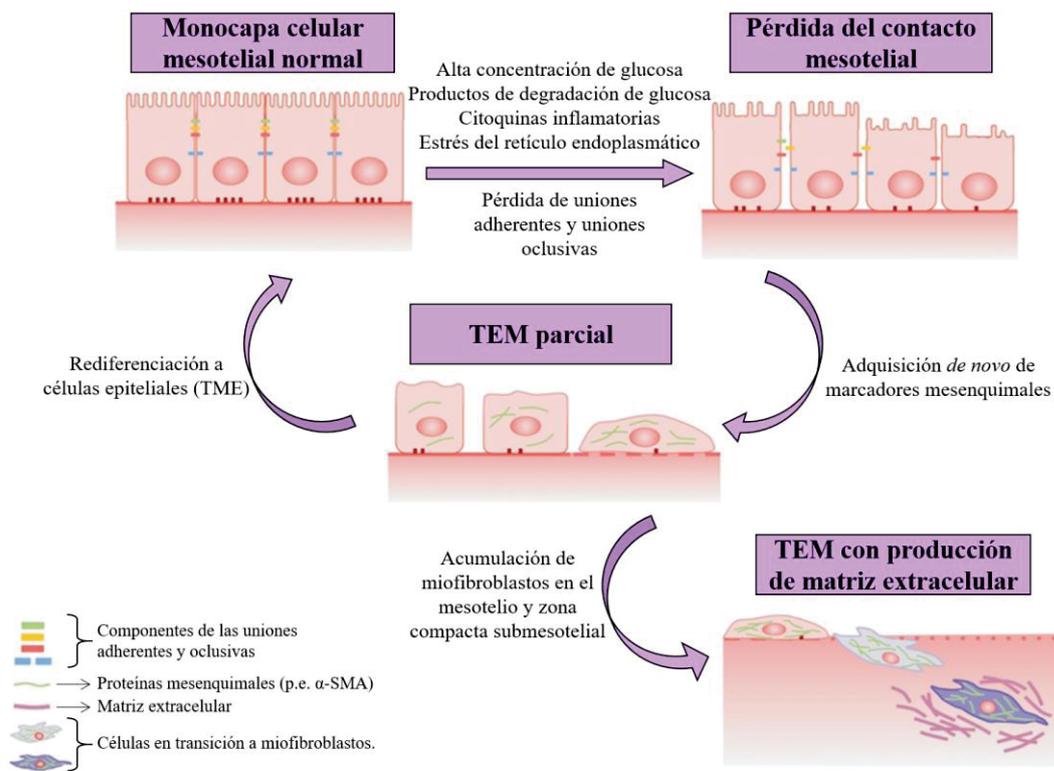


Fig. 4. Esquema de la transición epitelio-mesenquimal. La diálisis peritoneal puede producir que las células mesoteliales vean su fenotipo epitelial modificado, hacia miofibroblastos. Modificado de Kang, 2020.

3.3. La autofagia.

La autofagia es un mecanismo de reciclaje presente en todas las células eucariotas, en las que el componente citoplasmático o cargo acaba siendo degradado por el lisosoma. En los mamíferos existen tres tipos de autofagia:

- Macroautofagia, la más estudiada. Ocurre de una manera constitutiva, aunque puede ser inducida por unas condiciones de estrés. Una de sus diferencias frente a los otros tipos de autofagia es que, en este caso, las vesículas que engloban el cargo se forman *de novo*.
- Microautofagia. El lisosoma genera unas invaginaciones que toman directamente el cargo hacia su interior.
- Autofagia mediada por chaperonas. Transporta directamente proteínas mal plegadas al interior del lisosoma (Parzych & Klionsky, 2014).

La macroautofagia, también conocida simplemente como autofagia (Kroemer, 2015) se trata de la degradación de un material intracelular que había sido previamente englobado por una doble membrana, formando un autofagosoma. Este se fusionará con un lisosoma, el cual libera sus enzimas hidrolíticas, generándose un autolisosoma, cuyos productos finales ya degradados, salen al citoplasma (Figura 5) para ser reutilizados por la célula (Boya, 2017). Junto con el proteosoma, con el que esta interconectado, la autofagia es un mecanismo catabólico de supervivencia celular (Wang et al., 2016). En concreto, juega un papel fundamental en la homeostasis celular y la adaptación al estrés, aunque se ve mermada durante el envejecimiento (Kroemer, 2015). Es por ello por lo que se considera que la autofagia presenta, en la mayoría de los casos, una función citoprotectora, en vez de citocida.

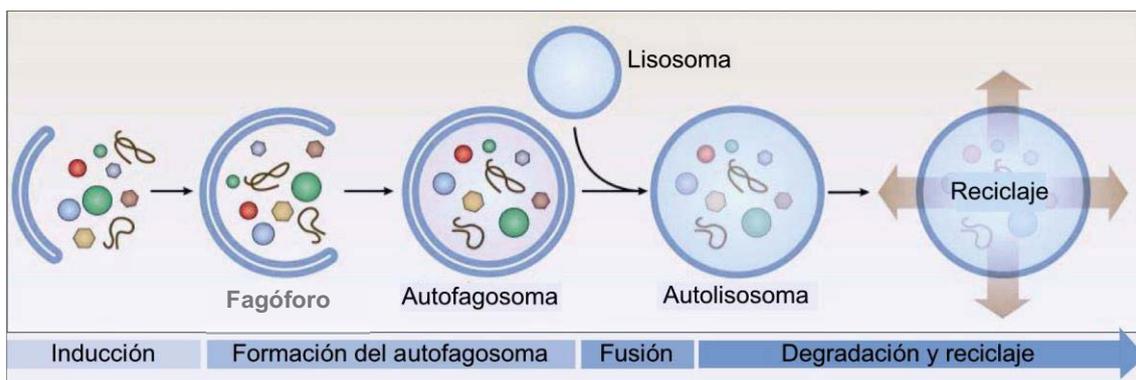


Fig. 5. Esquema con las fases de la macroautofagia. Modificado de Boya, 2017.

Existen diferentes proteínas o complejos que promueven la autofagia, como es el caso de Beclin-1, o las quinasas pro-autofágicas PIK3C3/HVPS34 y ULK, la cual se ve inhibida por mTOR (Green et al, 2011). Asimismo, existen diversos fármacos estudiados que pueden inducir la autofagia, bien por una activación de las moléculas pro-autofágicas, o por inhibición de sus reguladores negativos, como es el caso de la

rapamicina. Mientras, la cloroquina destaca como el principal fármaco inhibidor de la formación del autolisosoma (*Kroemer, 2015*).

Una vez activada la autofagia, una estructura inicial con doble membrana, denominada fagóforo, comienza a expandirse alrededor del cargo, hasta generar el autofagosoma, proceso en el que las proteínas ATG presentan un papel fundamental. El origen de este fagóforo podría proceder de los denominados omegasomas, estructuras asociadas al retículo endoplasmático, aunque también podrían proceder de la membrana plasmática, el retículo endoplasmático, el complejo de Golgi o la mitocondria.

En mamíferos, es habitual que la autofagia converja con la ruta endocítica, de tal forma que los autofagosomas se pueden unir a endosomas, formando los anfisomas, que más tarde se fusionarán con los lisosomas. Tanto los autofagosomas como los anfisomas, una vez se fusionan con los lisosomas se denominan autolisosomas, donde tendrá lugar la degradación. Los productos resultantes son devueltos al citoplasma por permeasas, pudiendo ser reciclados para otros procesos biosintéticos (*Parzych & Klionsky, 2014*).

En el caso de la DP, cabría esperar que una eliminación selectiva de las mitocondrias dañadas por el estrés oxidativo, manteniendo solo las sanas, fuera esencial para mantener una correcta homeostasis de las células mesoteliales. En concreto, esto se conseguiría gracias a la mitofagia, un tipo especial de macroautofagia, en la que se engloban en vesículas específicamente las mitocondrias (*Wu et al., 2016*), siendo un proceso muy asociado a condiciones de estrés oxidativo (*Shefa et al., 2019*).

Existen dos mecanismos de mitofagia (Figura 6), siendo una de las vías dependiente de BNI3L. Durante este proceso, BNI3L, una proteína que se encuentra en la membrana externa de la mitocondria, interacciona con LC3, permitiendo así una expansión del fagóforo (*Parzych & Klionsky, 2014*). Mientras, cuando las mitocondrias sufren un daño, la ruta es diferente. En las mitocondrias sanas, la quinasa PINK1 es importada al interior mitocondrial, donde es degradada. Pero cuando la mitocondria está dañada, siendo su potencial de membrana bajo, PINK1 se acumula en la superficie mitocondrial. Esto promueve el reclutamiento de la ubiquitin-ligasa PARKIN, que ubiquitina la membrana externa mitocondrial. Esta ubiquitina será reconocida por p62, también denominada SQSTM1 (*Green et al., 2011; Shefa et al., 2019*), un receptor de LC3, lo que permite, al igual que en caso anterior, la formación del autofagosoma (*Parzych &*

Klionsky, 2014). LC3 es una proteína asociada a los microtúbulos, siendo su forma activa LC3-II, importante para la formación del autofagosoma, recubriéndolos (*Wu et al., 2016*). Es por ello, por lo que se le considera un buen marcador de la autofagia (*Li et al., 2019*).

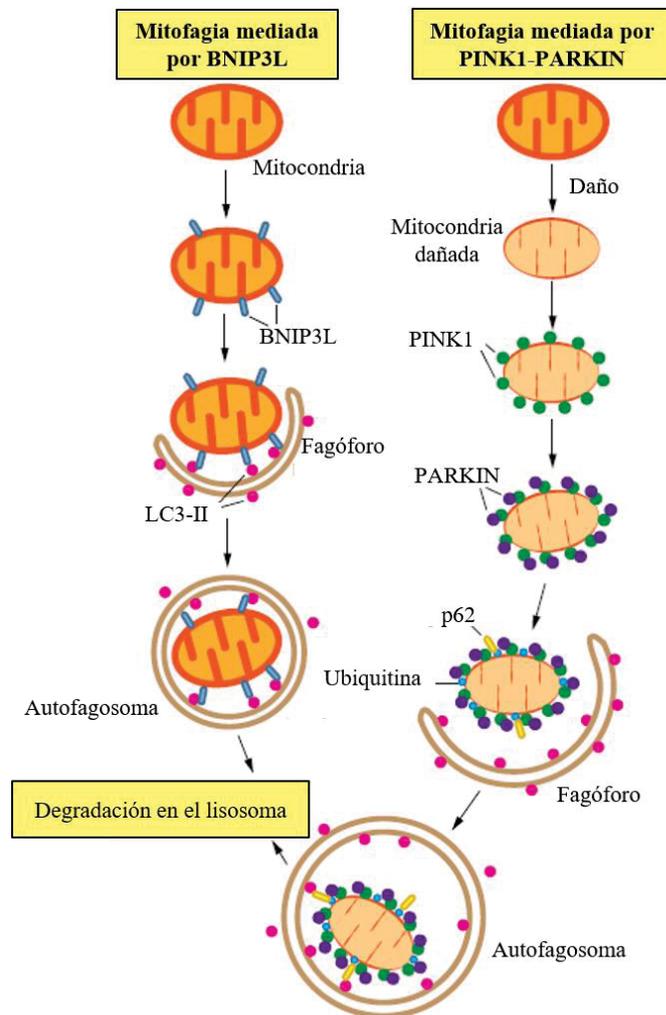


Fig. 6. Existen dos mecanismos detrás de la mitofagia. Las mitocondrias pueden ser eliminadas por una interacción entre BNIP3L y LC3-II. Pero si existe un daño en el orgánulo, la vía es diferente, ya que PARKIN se une a PINK2, ubiquitinizando la membrana mitocondrial. Esto hace que p62 se una a la mitocondria, e interaccione con LC3-II, lo que promueve la formación del autofagosoma. Modificado de *Parzych, 2014*.

De todas formas, el mecanismo completo por el que la mitofagia tiene lugar es desconocido (*Shefa et al., 2019*), y en el caso de la DP, existen diversos estudios contradictorios sobre el posible papel que pueda llevar a cabo la autofagia. Por una parte, se ha descrito como la rapamicina, inductor de la autofagia, alivia la fibrosis asociada a la DP (*Li et al., 2019*), aunque también que una inhibición de la autofagia supondría una inhibición de la TEM (*Wu et al., 2018*). Es por ello, que resulta esencial profundizar en el papel de la autofagia en el remodelado de la membrana peritoneal asociado a pacientes tratados con DP.

3.4. El resveratrol.

El resveratrol (3,5,4'-trihidroxiestilbeno) se trata de una fitoalexina sintetizada por las plantas como mecanismo de defensa frente infecciones y la radiación UV (*Shakibaei et al., 2008*). Aunque está presente en más de 70 plantas, solo unas pocas son comestibles, destacando las uvas, cacahuetes, cacao y frutas del bosque. En concreto, es especialmente abundante en la piel de las uvas, donde son producidos, y en los vinos tintos, con una concentración de hasta 100 y 7 mg/L respectivamente (*Pastor et al., 2019; Singh et al., 2019*). Una vez el resveratrol es ingerido vía oral, es rápidamente metabolizado en el hígado e intestino. En el plasma, el resveratrol no metabolizado se une a albumina y lipoproteínas, formando unos complejos que pueden ser disociados en las membranas celulares, permitiendo que el resveratrol entre en las células, por lo que esta molécula puede interactuar por tanto, dentro como fuera de la propia célula (*Pastor et al., 2019*). Aunque el resveratrol es absorbido vía oral, las concentraciones que alcanza en plasma son bajas, por lo que no siempre se alcanza el resultado esperado *in vivo* (*de Vries et al., 2018*). Es por ello por lo que es necesario un mayor estudio de la biodisponibilidad y metabolismo del resveratrol en humanos (*Den Hartogh & Tsiani, 2019*).

En cuanto a su estructura, el resveratrol presenta dos isoformas (Figura 7), siendo el trans-resveratrol biológicamente más activo que el cis (*de Vries et al., 2018*), así como más abundante y estable (*Pastor et al., 2019*).

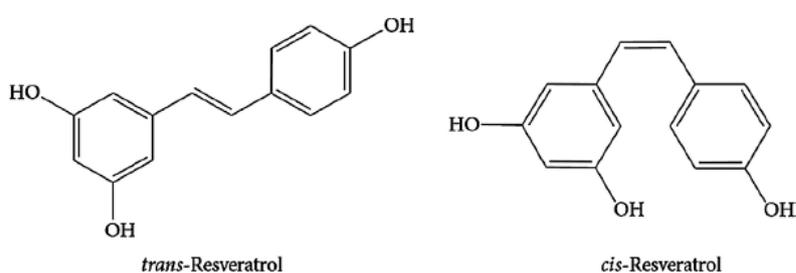


Fig. 7. Estructura del resveratrol. *Vries et al., 2018*.

En la actualidad, se han realizado más de 240 ensayos clínicos con este compuesto (*Singh et al., 2019*), el cual resulta especialmente interesante debido a sus propiedades antiinflamatorias, antioxidantes, antienvjecimiento y neuroprotectoras (*Han et al., 2020*). Algunas de estas propiedades han sido comprobadas en un modelo *in vivo*, en el que la ingesta de resveratrol reduce los principales indicadores empleados en la artritis

reumatoide (*Riveiro-Naveira et al., 2016*). Mientras, estudios recientes confirman que el resveratrol inhibe el aumento de ROS, previniendo asimismo una disfunción del potencial de membrana mitocondrial (*Giordo et al., 2020*). Al disminuir la concentración de ROS, el resveratrol está detrás de una modulación de la respuesta inflamatoria (*Valcárcel-Ares et al., 2014*). Además, también se conoce que el resveratrol es capaz de inducir la autofagia en células mesoteliales humanas (*Wu et al., 2016*).

Esta amplia y diversa actividad se puede deber a que interacciona con gran cantidad de moléculas implicadas en la señalización celular, como son las citoquinas, caspasas y NF- κ B, entre otras (*Singh et al., 2019*), tal y como se puede ver en la Figura 8. Es importante destacar el papel que presenta el resveratrol a la hora de activar SIRT1 o sirtuina 1, una desacetilasa, que una vez activa, silencia el ADN (*Pastor et al., 2019*). Las sirtuinas han sido relacionadas, directa o indirectamente, con el control de la mitofagia en cáncer, neurodegeneración, envejecimiento y diabetes, entre otras patologías (*Vermucci et al., 2019*).

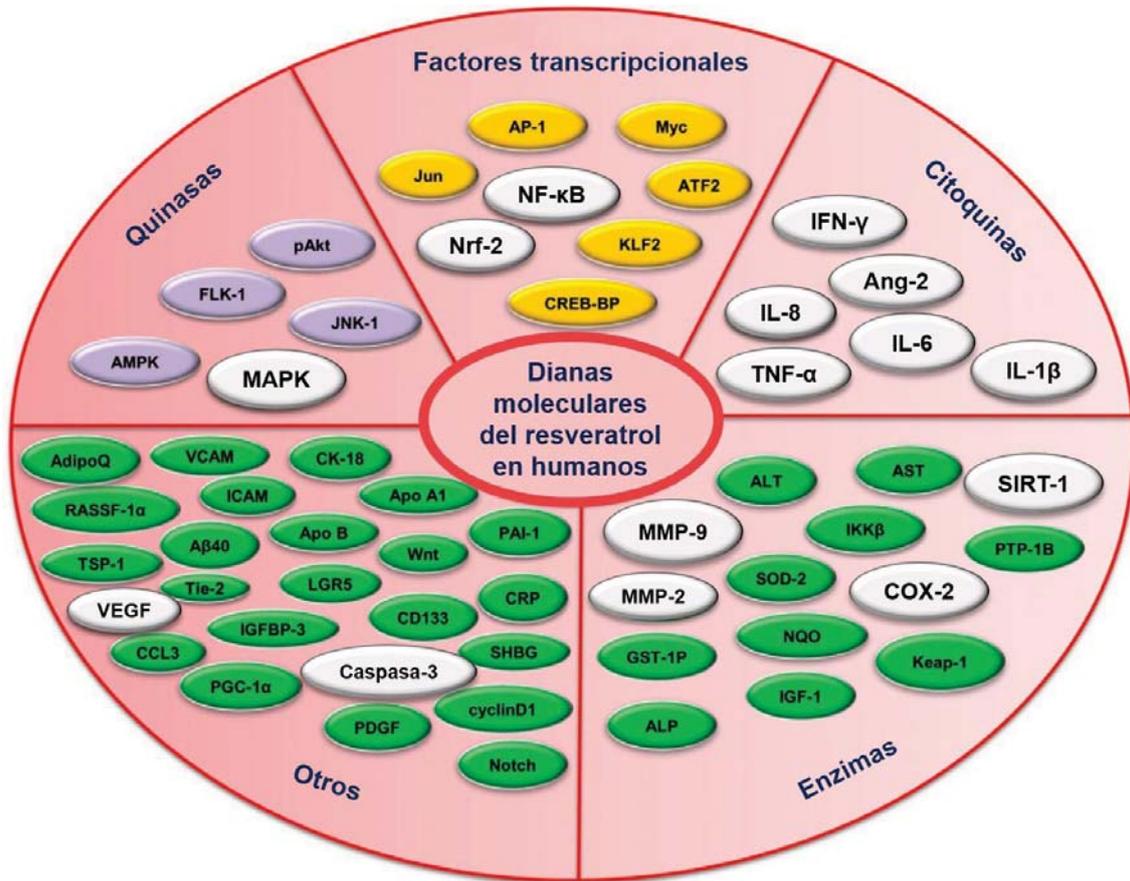


Fig. 8. Dianas moleculares del resveratrol en humanos. Se destacan en gris claro aquellas que se encuentran relacionadas con la pérdida de la integridad de la membrana peritoneal en pacientes con DP, o con la mitofagia. ADIPOQ, adiponectina con dominio C1Q y colágeno; ALP, fosfatasa alcalina; ALT, alanina aminotransferasa; AMPK, proteína-quinasa activada por AMP; **Ang-2**, angiopoyetina 2; AP-1, proteína activadora 1; ApoA-I, apolipoproteína A-I; AST, aspartato aminotransferasa; ATF2, factor de transcripción activador; A β , amiloide β ; CCL3, quimiocina ligando 3; c-Jun, jun proto-oncogen; CK-18, citoqueratina 18; **COX-2**; ciclooxigenasa 2; CREB, elemento en respuesta de AMPc; CREB-BP, proteína de unión a CREB; CRP, proteína c-reactiva; FLK-1, quinasa de hígado fetal; GST-1P, glutatión S-transferasa 1P; ICAM, molécula de adhesión intercelular; **IFN- γ** , interferón γ ; IGF-1, *insulin-like growth factor 1*; IGFBP-3, *insulin-like growth factor-binding protein 3*; IKK, quinasa I κ B; **IL**, interleuquina; JNK, quinasa c-Jun N-terminal; Keap1, *Kelch-like ECH-associated protein 1*; KLF2, *Kruppel-like factor 2*; LGR5, *leucine rich repeat-containing G-protein-coupled receptor 5*; **MAPK**, quinasa activada por mitógenos; **MMP**, metaloproteínasa de matriz; **NF- κ B**, factor nuclear- κ B; NQO, NAD(P)H: quinoneoxidoreductasa; **Nrf2**, factor relacionado con el factor nuclear eritroide 2; PAI-1, inhibidor del activador del plasminógeno-1; pAkt, Akt fosforilado; PDGF, factor de crecimiento derivado de plaquetas; PGC-1 α , *peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator 1 α* ; PTP-1B, tirosina-proteína fosfatasa no receptora tipo 1; RASSF-1 α , *ras association domain family 1 isoform A*; SHBG, globulina fijadora de hormonas sexuales.; **SIRT1**, sirtuina tipo 1; SOD-2, superóxido dismutasa 2; Tie-2, tirosina quinasa del receptor TEK; **TNF- α** , factor de necrosis tumoral α ; TSP-1, trombospondina 1; VCAM, proteína de adhesión celular vascular; **VEGF**, factor de crecimiento endotelial vascular; Wnt, *wingless*. Modificado de Singh et al, 2019.

4. Hipótesis.

En las células mesoteliales de la membrana peritoneal de los pacientes que son tratados con diálisis peritoneal existiría un defecto en la autofagia, que se relacionaría con una disfunción mitocondrial (aumento del estrés oxidativo). Como consecuencia, se produciría una activación del inflammasoma, lo que conllevaría a la fibrosis de la membrana peritoneal, y por lo tanto al fracaso de la técnica. La ingesta de antioxidantes en la dieta, como el resveratrol, podría restaurar la autofagia, y proteger al peritoneo del paciente, preservando la técnica durante un tiempo más prolongado.

5. Objetivos.

1. Evaluar *ex vivo* el nivel de autofagia en el peritoneo y células mesoteliales humanas procedentes del efluente de pacientes sometidos a diálisis peritoneal.
 - 1.1. Buscar si se establece una relación con la disfunción mitocondrial, activación del inflammasoma y el remodelado de la membrana peritoneal.
2. Estudiar *in vitro* en células mesoteliales humanas el efecto de la autofagia sobre la disfunción mitocondrial, activación del inflammasoma y fibrosis del peritoneo, y el posible efecto regulador del resveratrol.

6. Metodología.

I. Obtención de muestras de efluentes peritoneales.

Se obtendrán células mesoteliales del efluente peritoneal de pacientes en tratamiento con diálisis peritoneal en la Unidad de Diálisis del Hospital Universitario A Coruña, tras obtener el consentimiento firmado de dichos pacientes. Este efluente proporcionará una población representativa de las células mesoteliales del paciente, tras una centrifugación (*Aroeira et al., 2007; Yáñez-Mó et al., 2003*).

II. Cultivo de células mesoteliales

Además de las células mesoteliales de los efluentes, se trabajará con células MeT5A, una línea celular donada por el Dr. Manuel López Cabrera (Centro de Biología Molecular Severo Ochoa de Madrid). Las células mesoteliales se cultivarán en *medio Roswell Park Memorial Institute* (RPMI) (Sigma-Aldrich, Alemania), y la línea MeT5A en *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) (Sigma-Aldrich), suplementado con 20% y 10% respectivamente con suero bovino fetal (SBF) (Thermofisher, EEUU), y en ambos casos con 1% de penicilina-estreptomina (Sigma-Aldrich) y 0,3% de insulina (Sigma-Aldrich) (*Saito et al., 2018; Wu et al., 2016; Yáñez-Mó et al., 2003*).

III. Estimulación celular

Las células serán depleccionadas en su respectivo medio con 0,5% de SBF, y tras 48 se estimularán. Para ello, se utilizan 5 ng/mL de TGF- β 1 (*Li et al., 2019*), al ser esta la principal molécula responsable de la inducción de fibrosis, y de IL-1 β , por su estrecha relación con los procesos inflamatorios. En algunos de los experimentos se empleará la rapamicina (10 μ M) y cloroquina (30 μ M) como moduladores de la autofagia, y se comparará con los resultados obtenidos con resveratrol (5-25 μ M), escogido por sus propiedades antioxidantes y antiinflamatorias.

IV. Estudios proteicos.

a. Western-blot

A partir de los cultivos celulares, se obtendrán extractos proteicos usando un buffer de lisis (Sigma-Aldrich), cuya concentración se cuantificará posteriormente a través de

espectrofotometría. Las muestras obtenidas serán cargadas y separadas a través de una electroforesis SDS-PAGE en geles de poliacrilamida a una concentración del 8 y 12% de acrilamida (geles concentrador y de resolución, respectivamente). A continuación, las proteínas separadas se transferirán a una membrana PVDF (Millipore, EEUU), que será bloqueada usando 5% de leche o BSA (Thermofisher) durante una hora, para evitar uniones inespecíficas, antes de ser incubadas durante toda la noche con los anticuerpos (Cell Signaling, EEUU) (*Li et al., 2019*) anti-LC3 (1:1000), anti-beclin (1:1000), anti-p62 (1:1000), anti-NLRP3 (1:1000), anti-caspasa-1 (1:1000), anti-COX-2 (1:1000), anti-E-cadherina (1:1000), anti- α -SMA (1:1000), anti-fibronectina (1:1000), anti-tubulina (1:1000) y anti-GAPDH (1:1000), sirviendo estos dos últimos como control de carga. Transcurrido el tiempo, y después del correspondiente lavado para evitar el exceso de anticuerpo, se añadirán los anticuerpo secundarios anti-conejo (1:1000-1:3000), conjugados con peroxidasa de rábano, y se procederá a visualizar los resultados por quimioluminiscencia (*Wu et al., 2010*).

b. Citometría de flujo.

Se empleará para conocer el estado de la mitocondria en las diferentes muestras, con la metodología empleada por *Wu et al (2016)*. Para ello, se utilizará el fluoróforo Mitotracker (Thermofisher, 50 nM) durante 30 min a 37 °C para conocer la masa mitocondrial. Mientras, los ROS asociados a la mitocondria se medirán tiñendo las células con el fluoróforo MitoSOX (Thermofisher, 2,5 mM) durante 30 min a 37 °C. Además, se podría estudiar el potencial de membrana mitocondrial gracias al *Mitochondrial membrane Potencial and Apoptosis Kit* (Invitrogen, EEUU). Las células se lavarán en tampón fosfato salino (PBS), y se resuspenderán también en dicho tampón, conteniendo 1% de SBF para realizar un análisis por citometría de flujo (FACS, del inglés *Fluorescence activated cell sorter*).

V. Estudios de ARN

Las células mesoteliales se lavarán en PBS, y el ARN se extraerá usando TRIzol (Invitrogen), de tal forma que 1 μ g de RNA será retrotranscrito a ADNc gracias al *PrimeScriptTM 1st strand cDNA synthesis kit* (Takara, Japón) (*Wu et al., 2019*). Este producto será objeto a estudio a través de una RT-PCR a tiempo real, usándose 10 μ L de *SYBR Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems, Canada), y 1,6 μ L de cada uno de los cebadores, los cuales constan en la Figura 9. La expresión génica de cada uno de

ellos se normalizará utilizando como gen de referencia, la gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) por no verse modulada en ninguna de las condiciones de estudio (Hara *et al.*, 2017). Estos cebadores se diseñan utilizando la herramienta de Roche Diagnostics, siendo manufacturados por Sigma. Para la optimización de los cebadores, estos tendrán una longitud comprendida entre los 18 y 22 nucleótidos, con un contenido en guanina-citosina cercano al 50% y una temperatura de anillamiento de 59-60 °C. Además, el tamaño de los amplicones generados se encontrará entorno a los 100 nucleótidos.

Gen	Cebadores
GAPDH	F: GGC ATT GCT CTC AAT GAC AA R: ATG TAG GCC ATG AGG TCC AC
IL-1β	F: TAC CTG TCC TGC GTG TTG AA R: TCT TTG GGT AAT TTT TGG GAT CT
TGF-β *	F: ATG GTG GAC CGC AAC AAC GCA AT R: CAG CTC TGC ACG GGA CAG CAA T
Snail	F: GCT GCA GGA CTC TAA TCC AGA R: ATC TCC GGA GGT GGG ATG
E-Cadherina	F: TGG AGG AAT TCT TGC TTT GC R: CGC TCT CCT CCG AAG AAA C
α-SMA *	F: AGT CGC CAT CAG GAA CCT CGA GAA R: ACC AGC AAA GCC CGCC TTA CA
NRLP3	F: CAC GTG TTT CGA ATC CCA CT R: AAC CCA TCC ACT CCT CTT CA
Caspasa 1	F: CCA GGA CAT TAA AAT AAG GAA ACT GT R: CCA AAA ACC TTT ACA GAA GGA TCT C
Beclin #	F: GGC TGA GAG ACT GGA TCA GG R: CTG CGT CTG GGC ATA ACG
LC3-II #	F: GAG AAG CAG CTT CCT GTT CTG G R: GTG TCC GTT CAC CAA CAG GAA G

Fig. 9. Cebadores utilizados para la RT-PCR a tiempo real. F, *primer forward*; R, *primer reverse*. Los cebadores marcados con * proceden de Hara *et al*, 2017, mientras que aquellos con #, de Jiang *et al*, 2012.

La RT-PCR a tiempo real se realizará por duplicado, siguiendo el siguiente programa: 95 °C durante 10 min., y a continuación, 45 ciclos a 95 °C durante seg., 60 °C 35 seg. Los datos obtenidos serán analizados mediante el método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Jiang *et al*, 2012).

7. Plan de trabajo.

El proyecto se desarrollará a lo largo de nueve meses, tal y como viene recogido en la Figura 10.

TAREAS	MESES								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Metodología									
Obtención de muestras	█								
Cultivo celular	█								
Estimulación celular		█							
Western-blot		█							
Citometría de flujo			█						
RT-PCR a tiempo real				█					
Estudio de los resultados									
Análisis de los resultados obtenidos		█							
Obtención de conclusiones			█						
Difusión de los resultados									
Publicación estudio								█	
Congresos								█	

Fig. 10. Organigrama con las tareas planeadas para la realización de este proyecto.

8. Cuestiones éticas.

El procedimiento ha sido aprobado por el Comité Ético de Investigación (CEI) de A Coruña y Ferrol (Código de registro: 2014/454). Las muestras y datos clínicos a utilizar en este proyecto formarán parte de la colección de muestras “Colección para el desarrollo de la línea de investigación en enfermedades renales” autorizada por el CEI de Galicia con código de Registro 2015/205 y debidamente inscrita en el Registro Nacional de Biobancos con código C.0003424. Los pacientes que aceptan participar en esta colección firman el consentimiento informado autorizado por el Comité de Ética de Investigación de A Coruña y Ferrol. Asimismo, los pacientes, serían codificados, con el objetivo de mantener su anonimato.

9. Aplicabilidad.

La finalidad de este proyecto es estudiar si un control en los niveles de autofagia de las células mesoteliales de la membrana peritoneal en los pacientes sometidos a diálisis peritoneal puede permitir que no surjan, o se reduzcan, las complicaciones asociadas a esta técnica. Si esto es así, el resveratrol podría ayudar sobre dicho control, debido a sus posibles efectos beneficiosos como compuesto antioxidante y antiinflamatorio.

10. Plan para la difusión de los resultados.

Una vez finalizado el proyecto, se espera publicar los resultados en alguna de las mejores revistas del área de nefrología, como la revista norteamericana *Kidney International*, la cual presenta un factor de impacto (Q1) de 3,425, o en *Antioxidants & Redox Signaling*, revista con un Q1 de 6,323 especializada en el impacto del estrés oxidativo. De igual modo, se asistirán a congresos nacionales, entre los que se puede destacar el congreso de la Sociedad Española de Nefrología (Senefro) e internacionales, como la Asociación Renal Europea-Asociación Europea de Diálisis y Trasplantes (ERA-EDTA).

11. Recursos necesarios.

El proyecto se desarrollará en el Instituto de Investigación Biomédica de A Coruña (INIBIC), estimándose que los recursos necesarios, con un coste aproximado, sean lo que constan en la Figura 11.

RECURSOS	COSTE APROXIMADO (€)
Material disponible en el INIBIC	
Centrífugas	
Incubador	
Cabina de flujo laminar	
Campana de gases	
Agitador	
Vortéx	
Termoblock	
Nevera	
Citómetro de flujo	
Detector quimioluminiscencia	
Trans blotter	
Espectrofotómetro Nanodrop	
Termociclador	

Microtubos	
Micropipetas y puntas	
Bisturís	
Botes duquesa	
Cubeta electroforesis	
Agua libre de RNAsas	
Papel Parafilm	
Guantes desechables	
Material Fungible / Reactivos	
Medio RPMI	427,0
Medio DMEM	163,0
SBF inactivado	578,0
Penicilina-estreptomicina	23,7
Insulina	139,0
PBS	110,3
TGF- β 1	491,0
IL-1 β	366,0
Rapamicina	290,0
Resveratrol	173,0
TRIZOL	262,0
Placas 48 pocillos (recubrimiento colágeno I)	260,5
Placas 6 pocillos (recubrimiento colágeno I)	469,5
Cloroformo	22,7
Isopropanol	27,0
Etanol	96,7
Membranas PVDF	129,0
Anticuerpo anti-Beclin	268,0
Anticuerpo anti-NRLP3	268,0
Anticuerpo anti-caspasa-1	268,0
Anticuerpo anti-COX-2	302,0
Anticuerpo anti-E-cadherina	268,0
Anticuerpo anti- α -SMA	312,0
Anticuerpo anti-fibronectina	410,0
Anticuerpo anti-tubulina	321,0
Anticuerpo anti-GAPDH	302,0
Anticuerpo (secundario) anti-conejo	158,0
Leche en polvo	33,2
BSA	421,0
Mitotracker	443,0
MitoSOX	482,0
Kit extracción ARN	169,0
Kit SYBR Green	714,0
10 parejas de cebadores	116
Otros gastos	
Inscripción y asistencia a congresos	1500
Total	
10783,61	

Fig. 11. Estimación de los recursos y coste aproximado.

12. Bibliografía.

- Abderrazak, A., Syrovets, T., Couchie, D., El Hadri, K., Friguier, B., Simmet, T. & Rouis, M. (2015). NLRP3 inflammasome: From a danger signal sensor to a regulatory node of oxidative stress and inflammatory diseases. *Redox Biology*, 4, 296–307. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2015.01.008>
- Aroeira, L. S., Aguilera, A., Sánchez-Tomero, J. A., Bajo, M. A., Del Peso, G., Jiménez-Heffernan, J. A., Selgas, R. & López-Cabrera, M. (2007). Epithelial to mesenchymal transition and peritoneal membrane failure in peritoneal dialysis patients: Pathologic significance and potential therapeutic interventions. *Journal of the American Society of Nephrology*, 18(7), 2004–2013. <https://doi.org/10.1681/ASN.2006111292>
- Bahl Lee, H. & Hunjoo, H. (2007). Mechanisms of epithelial-mesenchymal transition of peritoneal mesothelial cells during peritoneal dialysis. *Journal of Korean Medical Science*, 22(6), 943–945. <https://doi.org/10.3346/jkms.2007.22.6.943>
- Bartosova, M. & Schmitt, C. P. (2019). Biocompatible peritoneal dialysis: The target is still way off. *Frontiers in Physiology*, 9(1853), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.01853>
- Boya, P. (2017). Autofagia: cómo nuestras células se reciclan. *Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular*, pp. 1–2. https://doi.org/http://dx.doi.org/10.18567/sebbmdiv_ANC.2017.01.2
- Cem Gabay, M. D. & Irving Kushner, M. D. (1999). Acute-Phase Proteins and Other Systemic Responses to Inflammation. *The New England Journal of Medicine*, 340(6), 448–454.
- de Vries, K., Strydom, M. & Steenkamp, V. (2018). Bioavailability of resveratrol: Possibilities for enhancement. *Journal of Herbal Medicine*, 11, 71–77. <https://doi.org/10.1016/j.hermed.2017.09.002>
- Den Hartogh, D. J. & Tsiani, E. (2019). Health benefits of resveratrol in kidney disease: Evidence from in vitro and in vivo studies. *Nutrients* 11(7), 1624–1656. <https://doi.org/10.3390/nu11071624>
- Eleftheriadis, T., Pissas, G., Antoniadis, G., Nikolaou, E., Goulinopoulos, S., Liakopoulos, V. & Stefanidis, I. (2019). Activation of general control nonderepressible-2 kinase ameliorates glucotoxicity in human peritoneal mesothelial cells, preserves their integrity, and prevents mesothelial to

- mesenchymal transition. *Biomolecules*, 9(12), 1–18.
<https://doi.org/10.3390/biom9120832>
- Giordo, R., Nasrallah, G. K., Al-Jamal, O., Paliogiannis, P. & Pintus, G. (2020). Resveratrol inhibits oxidative stress and prevents mitochondrial damage induced by zinc oxide nanoparticles in zebrafish (*Danio rerio*). *International Journal of Molecular Sciences*, 21(11), 3838–3855. <https://doi.org/10.3390/ijms21113838>
- Gorostidi, M., Sánchez-Martínez, M., Ruilope, L. M., Graciani, A., de la Cruz, J. J., Santamaría, R., del Pino, M. D., Guallar-Castillón, P., de Álvaro, F., Rodríguez-Artalejo, F & Banegas, J. R. (2018). Prevalencia de enfermedad renal crónica en España: impacto de la acumulación de factores de riesgo cardiovascular. *Nefrología*, 38(6), 606–615. <https://doi.org/10.1016/j.nefro.2018.04.004>
- Green, D. R., Galluzzi, L. & Kroemer, G. (2011). Mitochondria and the autophagy-inflammation-cell death axis in organismal aging. *Science*, 333(6046), 1109–1112. <https://doi.org/10.1126/science.1201940>
- Han, Y., Chu, X., Cui, L., Fu, S., Gao, C., Li, Y., & Sun, B. (2020). Neuronal mitochondria-targeted therapy for Alzheimer’s disease by systemic delivery of resveratrol using dual-modified novel biomimetic nanosystems. *Drug Delivery*, 27(1), 502–518. <https://doi.org/10.1080/10717544.2020.1745328>
- Hara, K., Hamada, C., Wakabayashi, K., Kanda, R., Kaneko, K., Horikoshi, S., Tomino, Y. & Suzuki, Y. (2017). Scavenging of reactive oxygen species by astaxanthin inhibits epithelial–mesenchymal transition in high glucose-stimulated mesothelial cells. *PLoS ONE*, 12(9), 1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184332>
- Jiang, Z. F., Shao, L. J., Wang, W. M., Yan, X. B. & Liu, R. Y. (2012). Decreased expression of Beclin-1 and LC3 in human lung cancer. *Molecular Biology Reports*, 39(1), 259–267. <https://doi.org/10.1007/s11033-011-0734-1>
- Jones, B., & Bes, M. (2012). Donación y trasplante de riñones. Retrieved June 15, 2020, from <https://www.who.int/bulletin/volumes/90/10/12-021012/es/>
- Kang, D. H. (2020). Loosening of the mesothelial barrier as an early therapeutic target to preserve peritoneal function in peritoneal dialysis. *Kidney Research and Clinical Practice*, 39(2), 136–144. <https://doi.org/10.23876/j.krcp.20.052>
- Kawka, E., Witowski, J., Sandoval, P., Rudolf, A., Vidal, A. R., Cabrera, M. L. & Jörres, A. (2019). Epithelial-to-mesenchymal transition and migration of human peritoneal mesothelial cells undergoing senescence. *Peritoneal Dialysis International*, 39(1), 35–41. <https://doi.org/10.3747/pdi.2017.00244>

- Kroemer, G. (2015). Autophagy: a druggable process that is deregulated in aging and human disease. *Journal of Clinical Investigation*, 125(1), 8–11. <https://doi.org/10.1172/JCI78652.oncogenesis>
- Kuo, H. T., Chen, H. W., Hsiao, H. H. & Chen, H. C. (2009). Heat shock response protects human peritoneal mesothelial cells from dialysate-induced oxidative stress and mitochondrial injury. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 24(6), 1799–1809. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfn718>
- Li, S., Peng, F., Gong, W., Wu, J., Wang, Y., Xu, Z., Liu, W., Li, H., Yin, B., Zhang, Y., Chen, S., Luo, C., Li, P., Chen, Y., Huang, Q., Zou, W. & Long, H. (2019). Dimethylaminomicheliolide ameliorates peritoneal fibrosis through the activation of autophagy. *Journal of Molecular Medicine*, 97(5), 659–674. <https://doi.org/10.1007/s00109-019-01757-1>
- Liu, Y., Dong, Z., Liu, H., Zhu, J., Liu, F. & Chen, G. (2015). Transition of mesothelial cell to fibroblast in peritoneal dialysis: EMT, stem cell or bystander? *Peritoneal Dialysis International*, 35(1), 14–25. <https://doi.org/10.3747/pdi.2014.00188>
- Maharjan, S. R. S. & Davenport, A. (2019). Comparison of sodium removal in peritoneal dialysis patients treated by continuous ambulatory and automated peritoneal dialysis. *Journal of Nephrology*, 32, 1011–1019. <https://doi.org/10.1007/s40620-019-00646-7>
- Mauthe, M., Orhon, I., Rocchi, C., Zhou, X., Luhr, M., Hijlkema, K. J., Coppes, R. P., Engedal, N., Mari, M. & Reggiori, F. (2018). Chloroquine inhibits autophagic flux by decreasing autophagosome-lysosome fusion. *Autophagy*, 14, 1435–1455. <https://doi.org/10.1080/15548627.2018.1474314>
- McKee-Muir, O. C. & Russell, R. C. (2017). *Mechanistic target of rapamycin: The alpha and omega of autophagy regulation*. In *Autophagy: Cancer, Other Pathologies, Inflammation, Immunity, Infection, and Aging Volume 12* (pp 231–250). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812146-7.00009-3>
- OMS. (2017). 10 datos sobre el envejecimiento y la salud. Retrieved June 15, 2020, from <https://www.who.int/features/factfiles/ageing/es/>
- Parzych, K. R. & Klionsky, D. J. (2014). An overview of autophagy: Morphology, mechanism, and regulation. *Antioxidants and Redox Signaling*, 20(3), 460–473. <https://doi.org/10.1089/ars.2013.5371>
- Pastor, R. F., Restani, P., Di Lorenzo, C., Orgiu, F., Teissedre, P. L., Stockley, C. Ruf, J. C., Quini, C. I., García-Tejedor, N, Gagantini, R., Aruani, C., Prieto, S., Murgu,

- M., Videla, R., Penissi, A. & Iermoli, R. H. (2019). Resveratrol, human health and winemaking perspectives. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 59(8), 1237–1255. <https://doi.org/10.1080/10408398.2017.1400517>
- Riveiro-Naveira, R. R., Valcárcel-Ares, M. N., Almonte-Becerril, M., Vaamonde-García, C., Loureiro, J., Hermida-Carballo, L., López-Peláez, E., Blanco, F. J. & López-Armada, M. J. (2016). Resveratrol lowers synovial hyperplasia, inflammatory markers and oxidative damage in an acute antigen-induced arthritis model. *Rheumatology*, 55(10), 1889–1900. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/kew255>
- Saito, H., Fushida, S., Harada, S., Miyashita, T., Oyama, K., Yamaguchi, T., Tsukada, T., Kinoshita, J., Tajima, H., Ninomiya, I. & Ohta, T. (2018). Importance of human peritoneal mesothelial cells in the progression, fibrosis, and control of gastric cancer: inhibition of growth and fibrosis by tranilast. *Gastric Cancer*, 21(1), 55–67. <https://doi.org/10.1007/s10120-017-0726-5>
- Schmitt, C. P. & Aufricht, C. (2017). Is there such a thing as biocompatible peritoneal dialysis fluid? *Pediatric Nephrology*, 32, 1835–1843. <https://doi.org/10.1007/s00467-016-3461-y>
- Shakibaei, M., Csaki, C., Nebrich, S. & Mobasheri, A. (2008). Resveratrol suppresses interleukin-1 β -induced inflammatory signaling and apoptosis in human articular chondrocytes: Potential for use as a novel nutraceutical for the treatment of osteoarthritis. *Biochemical Pharmacology*, 76(11), 1426–1439. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2008.05.029>
- Shefa, U., Jeong, N. Y., Song, I. O., Chung, H. J., Kim, D., Jung, J. & Huh, Y. (2019). Mitophagy links oxidative stress conditions and neurodegenerative diseases. *Neural Regeneration Research*, 14(5), 749–756. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.249218>
- Singh, A. P., Singh, R., Verma, S. S., Rai, V., Kaschula, C. H., Maiti, P. & Gupta, S. C. (2019). Health benefits of resveratrol: Evidence from clinical studies. *Medicinal Research Reviews*, 39(5), 1851–1891. <https://doi.org/10.1002/med.21565>
- Vadakedath, S., & Kandi, V. (2017). Dialysis: A Review of the Mechanisms Underlying Complications in the Management of Chronic Renal Failure. *Cureus*, 9(8), 1–8. <https://doi.org/10.7759/cureus.1603>
- Valcárcel-Ares, M. N., Riveiro-Naveira, R. R., Vaamonde-García, C., Loureiro, J., Hermida-Carballo, L., Blanco, F. J., & López-Armada, M. J. (2014). Mitochondrial

- dysfunction promotes and aggravates the inflammatory response in normal human synoviocytes. *Rheumatology*, 53(7), 1332–1343. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/keu016>
- Vernucci, E., Tomino, C., Molinari, F., Limongi, D., Aventaggiato, M., Sansone, L., Tafani, M. & Russo, M. A. (2019). Mitophagy and oxidative stress in cancer and aging: Focus on sirtuins and nanomaterials. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2019(4). <https://doi.org/10.1155/2019/6387357>
- Wang, H. H., Lin, C. Y., Su, S. H., Chuang, C. T., Chang, Y. L., Lee, T. Y., Lee, S. C. & Chang, C. J. (2016). Activation of salt-inducible kinase 2 promotes the viability of peritoneal mesothelial cells exposed to stress of peritoneal dialysis. *Cell Death and Disease*, 7, 1–9. <https://doi.org/10.1038/cddis.2016.79>
- White, S. L., Chadban, S. J., Jan, S., Chapman, J. R. & Cass, A. (2008). ¿Cómo lograr la equidad mundial en materia de diálisis y trasplantes renales? Retrieved June 15, 2020, from <https://www.who.int/bulletin/volumes/86/3/07-041715-ab/es/>
- Williams, J. D., Craig, K. J., Topley, N. & Williams, G. T. (2003). Peritoneal dialysis: Changes to the structure of the peritoneal membrane and potential for biocompatible solutions. *Kidney International, Supplement*, 63(84), S158–S161. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1755.63.s84.46.x>
- Wu, J., Xing, C., Zhang, L., Mao, H., Chen, X., Liang, M., Wang, F., Ren, H., Cui, H., Jiang, A., Wang, Z., Zou, M. & Ji, Y. (2018). Autophagy promotes fibrosis and apoptosis in the peritoneum during long-term peritoneal dialysis. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 22(2), 1190–1201. <https://doi.org/10.1111/jcmm.13393>
- Wu, J., Li, X., Zhu, G., Zhang, Y., He, M. & Zhang, J. (2016). The role of Resveratrol-induced mitophagy/autophagy in peritoneal mesothelial cells inflammatory injury via NLRP3 inflammasome activation triggered by mitochondrial ROS. *Experimental Cell Research*, 341(1), 42–53. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2016.01.014>
- Wu, J., Yang, X., Zhang, Y. F., Wang, Y. N., Liu, M., Dong, X. Q., Fan, J. J. & Yu, X. Q. (2010). Glucose-based peritoneal dialysis fluids downregulate toll-like receptors and trigger hyporesponsiveness to pathogen-associated molecular patterns in human peritoneal mesothelial cells. *Clinical and Vaccine Immunology*, 17(5), 757–763. <https://doi.org/10.1128/CVI.00453-09>
- Wu, J., Zhang, Y. F., Li, J. S., Zhu, G. L., Bi, Z. M. & Li, X. Y. (2019). The effect of

- high glucose-based peritoneal dialysis fluids on thioredoxin-interacting protein expression in human peritoneal mesothelial cells. *International Immunopharmacology*, 66, 198–204. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2018.11.027>
- Yáñez-Mó, M., Lara-Pezzi, E., Selgas, R., Ramírez-Huesca, M., Domínguez-Jiménez, C., Jiménez-Heffernan, J. A., Aguilera, A., Sánchez-Tomero, J. A., Bajo, M. A., Álvarez, V., Castro, M. A., del Peso, G., Cirujeda, A., Gamallo, C., Sánchez-Madrid, F. & López-Cabrera, M. (2003). Peritoneal Dialysis and Epithelial-to-Mesenchymal Transition of Mesothelial Cells. *New England Journal of Medicine*, 348(5), 403–413. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa020809>
- Zhou, Q., Bajo, M. A., del Peso, G., Yu, X. & Selgas, R. (2016). Preventing peritoneal membrane fibrosis in peritoneal dialysis patients. *Kidney International*, 90(3), 515–524. <https://doi.org/10.1016/j.kint.2016.03.040>
- Zhu, W., Zhang, X., Gao, K. & Wang, X. (2019). Effect of astragaloside IV and the role of nuclear receptor RXR α in human peritoneal mesothelial cells in high glucose-based peritoneal dialysis fluids. *Molecular Medicine Reports*, 20, 3829–3839. <https://doi.org/10.3892/mmr.2019.10604>

ANEXO: Resultados previos

A continuación, destaco alguno de los resultados preliminares obtenidos que sugieren que las hipótesis planteadas en el proyecto, no son únicamente especulativas y que los objetivos que se plantean son alcanzables en el tiempo estipulado:

Se ha realizado un primer análisis de la expresión de proteínas relacionadas con la autofagia en células mesoteliales procedentes de un paciente en diálisis peritoneal, utilizando sinoviocitos como control positivo.

Para ello, en primer lugar, se procesó dicho efluente, el cual se centrifugó durante 10 min a 514 g. El pellet obtenido, correspondiente a las células mesoteliales, se resuspendió en 5 mL de medio RPMI (*Sigma-Aldrich*), y se volvió a centrifugar, a 433 g, durante 10 min, para eliminar cualquier resto de líquido de diálisis. Finalmente, el pellet se resuspendió otra vez en 5 mL de medio RPMI suplementado con 20% de SBF (*ThermoFisher*), 1% de la mezcla de antibióticos penicilina-estreptomicina (*ThermoFisher*) y 0,3% de insulina (*Actrapid, Dinamarca*). Este volumen fue repartido en cinco pocillos de una placa de 48 (*ThermoFisher*), la cual fue incubada a 37°C en una atmósfera con una concentración de CO₂ del 5%. Una vez alcanzada la confluencia, se procedió a la extracción de la proteína.

Mientras, los sinoviocitos fueron cultivados en una placa de 6 pocillos (*ThermoFisher*), utilizando el medio DMEM (*Sigma-Aldrich*) suplementado con 10% de SBF, 1% de penicilina-estreptomicina y 0,3% de insulina. Cuando todos los pocillos alcanzaron la confluencia se llevó a cabo la depleción, incorporándose nuevo medio en el que se disminuyó la concentración de SBF hasta 0,5%. Tras 24 h se llevó a cabo la estimulación, dividiéndose los pocillos en 3 grupos: control, estimulación con cloroquina y estimulación con rapamicina, en los que se añadió 1 µL de cloroquina o rapamicina para obtener una concentración final de 30 y 10 µM, respectivamente. Después de 8 h de estimulación, se extrajo la proteína.

En el caso de las células mesoteliales, las cuales tras su visualización se concluyó que presentaban un fenotipo mixto, al haber sido cultivadas en una placa de 48, fue necesario levantarlas con tripsina. Mientras, en los sinoviocitos además de tripsina, se utilizó un *scraper*, para facilitar su levantamiento. Independientemente del método empleado para la recogida de las células, estas fueron lisadas usando un buffer de lisis (*Sigma-*

Aldrich), después de lo cual se cuantificó la concentración proteica por espectrofotometría (Nanodrop, *Thermofisher*).

A continuación, se llevó a cabo un Western-Blot, utilizando un gel con una fase inferior (*running fase* o gel separador) al 12% de acrilamida, y una superior (*stacking fase* o gel concentrador) al 6%. Se cargó 30 µg de cada una de las muestras, y se aplicó una corriente de 100 V durante 20 min, y a continuación 120V 1 h. Se transfirió a una membrana PVDF durante 40 min a 20 V, y después, se realizó una tinción Ponceau para confirmar que se ha realizado correctamente la transferencia y conocer dónde estaban las proteínas, para así poder cortar la membrana, ya que los diferentes anticuerpos necesitaban ser bloqueados en diferentes soluciones de bloqueo (5% de leche o BSA), además de obtener mejores resultados en las primeras hibridaciones. Tras 1 h de incubación en la solución de bloqueo correspondiente, se añadió al fragmento superior de la membrana original, que se encontraba en una solución al 5% de BSA, el anticuerpo de p62 (1:500) (*Cell Signaling, EEUU*). Mientras, a la parte inferior, que se bloquea en una solución al 5% leche, se le añadió el anticuerpo de LC3 (1:700) (*Cell signaling*). Se dejaron ambas membranas incubando *overnight*. A la mañana siguiente, y tras una serie de lavados, se añadió el anticuerpo secundario anti-conejo (1:5000) (Abcam, Reino Unido) en ambas membranas. Finalmente, como control de carga se empleó el anticuerpo anti-GAPDH (1:1000) (*Cell Signalling*). Como resultado, se obtuvieron los datos correspondientes a la Figura 12, cuyas imágenes fueron ajustadas empleando el programa ImageJ.

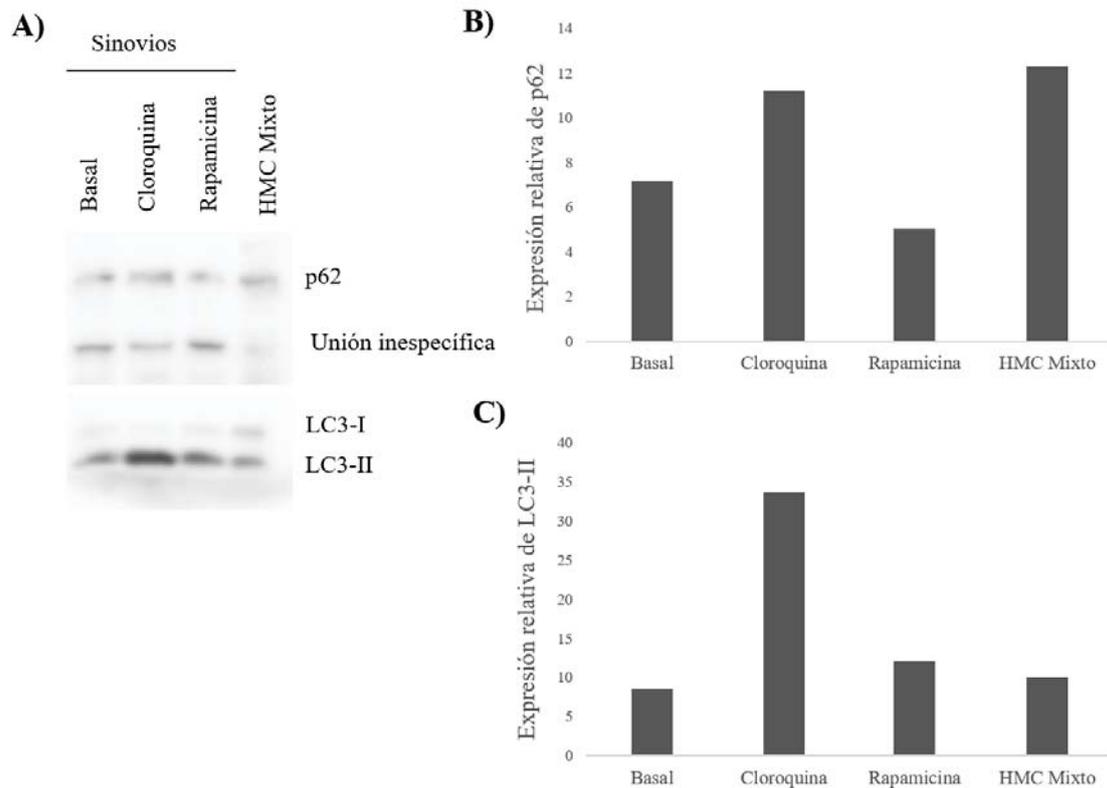


Fig. 12. (A). Western Blot en el que se compara la activación de la autofagia de las células mesoteliales humanas (HMC), con respecto a sinoviocitos previamente estimulados con un inhibidor de la autofagia (cloroquina), y un inductor (rapamicina), cuyas expresiones relativas se muestran en (B) y (C).

La estimulación con cloroquina en los sinoviocitos produce un aumento de p62 (Figura 12B), una proteína que se encuentra dentro de los autofagosomas (*Shefa et al., 2019*) y LC3-II (Figura 12C), una proteína presente en los autolisosomas asociada a los microtúbulos (*Wu et al., 2016*). Esto se debe a que la cloroquina bloquea la autofagia, al impedir la fusión entre el autofagosoma y el lisosoma, es decir, bloquea la formación del autolisosoma (*Mauthe et al., 2018*). Es por ello por lo que, si se suministra cloroquina, se van acumulando autofagosomas, y por lo tanto estas proteínas. Destaca el caso de las células mesoteliales, en el que la concentración de p62 es elevada, lo que a falta de más experimentos puede indicar que existe una autofagia deficiente en estas células.

Mientras, la rapamicina, un inductor de la autofagia, al inhibir el efecto de mTOR (*McKee-Muir & Russell, 2017*), disminuye los niveles de p62 y LC3-II, previsiblemente porque son degradadas, al ser la autofagia efectiva. Los niveles de LC3-II en el tratamiento con rapamicina y en las células mesoteliales son parecidos; si bien estos

resultados no se deben evaluar de forma independiente y son necesarios más experimentos, con diferentes fenotipos de células mesoteliales (epiteliales, fibroblastos y mixtas)

Estos primeros resultados nos han permitido comprobar que el número de células que obtenemos de las muestras de efluentes es adecuado para realizar la detección de las proteínas de interés por Western-blot, así como poner a punto las condiciones del ensayo (bloqueo, concentraciones de anticuerpo primario y secundario) con dichas proteínas.