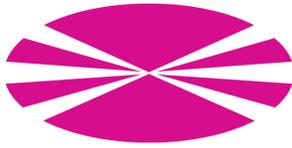


Traballo de Fin de Mestrado
Facultade de Ciencias da Saúde
Universidade da Coruña



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

FACULTADE DE CIENCIAS DA SAÚDE

MÁSTER EN: ASISTENCIA E INVESTIGACIÓN SANITARIA

ESPECIALIDAD: FUNDAMENTOS DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA

Curso académico 2020-2021

TRABAJO DE FIN DE MÁSTER

**Agonistas de PPAR α como Tratamiento
Modificador de la Enfermedad para la Artrosis**

Ana Bretón de la Cal

22 de julio de 2021

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	I
ÍNDICE DE TABLAS	III
ÍNDICE DE ACRÓNIMOS	IV
RESUMEN	VII
RESUMO	IX
ABSTRACT	XI
1.- INTRODUCCIÓN	1
1.1.- La artrosis y el cartílago articular.....	1
1.2.- Tratamiento farmacológico de la artrosis	3
1.3.- Fenofibrato	4
1.4.- Receptores PPAR	5
1.4.1.- Estructura	5
1.4.2.- Clasificación.....	6
1.4.3.- Funcionamiento de los receptores PPAR α	6
1.4.4.- Relación entre el Fenofibrato, los PPAR y la OA.....	7
1.5.- Autofagia y mitofagia.....	8
1.6.- La senescencia celular y la artrosis.....	9
1.6.1.- Disfunción mitocondrial.....	10
1.6.2.- Estrés oxidativo mitocondrial	13
2.- OBJETIVOS	15
3.- MATERIALES Y MÉTODOS	16
3.1.- Línea celular: descongelación y cultivo	17
3.2.- Extracción de ARN para el estudio de la expresión génica...	19
3.2.1.- Extracción de ARN con Trizol [®]	21

3.2.2.- Cuantificación de ARN con Nanodrop	22
3.2.3.- Obtención de ADNc mediante RT-PCR.....	23
3.2.4.- Cuantificación de la expresión génica por qPCR.....	25
3.3.- Estudio del potencial de membrana mitocondrial	28
3.4.- Estudio de la producción de ROS	30
3.5.- Análisis estadístico	31
4.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN	33
4.1.- Evaluar el efecto del Fenofibrato sobre la mitofagia.....	33
4.2.- Analizar el efecto del Fenofibrato sobre el potencial de membrana mitocondrial	36
4.3.- Estudiar el efecto del Fenofibrato sobre el estrés oxidativo ..	38
5.- CONCLUSIONES	41
6.- AGRADECIMIENTOS	42
7.- BIBLIOGRAFÍA	43
ANEXO I	i

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Representación gráfica de una articulación sinovial	1
Figura 2. Estructura del cartílago	2
Figura 3. Tratamientos para la artrosis	3
Figura 4. Estructura química del Fenofibrato	4
Figura 5. Estructura general de los receptores nucleares.....	6
Figura 6. Funcionamiento de los receptores PPAR α	7
Figura 7. Autofagia y mitofagia.....	8
Figura 8. SASP y OA	10
Figura 9. Cadena de transporte de electrones.....	11
Figura 10. Control de calidad mitocondrial.....	12
Figura 11. Envejecimiento, estrés oxidativo y senescencia.	13
Figura 12. Generación de ROS.....	14
Figura 13. Esquema de los experimentos.....	16
Figura 14. Procedimiento para la descongelación de un criovial	17
Figura 15. Aspecto de la línea celular de condrocitos TC28a2.	18
Figura 16. Procedimiento para el cultivo de condrocitos.....	19
Figura 17. Placa de doce pocillos	19
Figura 18. Condiciones de estimulación.....	20
Figura 19. Protocolo de extracción de ARN con Trizol®.....	21
Figura 20. Imagen del Nanodrop ND-1000	22
Figura 21. Kit de retrotranscripción	24
Figura 22. Ciclos de temperatura y tiempo RT-PCR	25
Figura 23. Ciclos de temperatura y tiempo para la qPCR.....	27
Figura 24. Representación gráfica de las sondas TaqMan® MGB	28
Figura 25. Condiciones de estimulación.....	30
Figura 26. Línea celular TC28a2.....	33
Figura 27. Representaciones gráficas de <i>PINK1</i>	35
Figura 28. Representaciones gráficas de <i>PARKIN</i>	36
Figura 29. Representación gráfica de DILC-1 e IL-1 β	37
Figura 30. Representación gráfica de DILC-1 y TNF α	38

Figura 31. Representación gráfica de MitoSOX [®] e IL-1 β	39
Figura 32. Representación gráfica de MitoSOX [®] y TNF α	39

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I. Soluciones madre de reactivos y concentraciones.....	20
Tabla II. Volúmenes de reactivos y orden para retrotranscripción.....	24
Tabla III. Reactivos utilizados en la qPCR y orden.....	26

ÍNDICE DE ACRÓNIMOS

A	Absorbancia
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
AINE	Antiinflamatorios no esteroideos
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ATP	Adenosín trifosfato
Ct	Ciclo umbral
DBD	<i>DNA binding domain</i>
DILC-1	Yoduro de 1,1',3,3',3',3'-hexametilindodicarbocianina
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMEM10	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i> suplementado al 10% con suero bovino fetal y al 1% con penicilina/estreptomicina
DMEM2	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i> suplementado al 2% con suero bovino fetal y al 1% con penicilina/estreptomicina
DMOAD	<i>Disease Modifying Osteoarthritis Drugs</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
dNTP	Desoxinucleótido trifosfato
dUTP	Desoxiuridín trifosfato
FAM	6-carboxifluoresceína
FN10	Fenofibrato 10 μ M
FN50	Fenofibrato 50 μ M
FN	Fenofibrato

GP	Glutation peroxidasa
HDL	<i>High density lipoprotein</i>
HBSS	<i>Hanks' Balanced Salt Solution</i>
IFN	Interferón
IL-1 β	Interleucina 1 β
LDL	<i>Low density lipoprotein</i>
L	Ligando
MEC	Matriz extracelular
MGB	<i>Minor groove binder</i>
MME	Membrana mitocondrial externa
MMI	Membrana mitocondrial interna
n	Número de muestras
NFQ	Apantallador no fluorescente
OA	Artrosis
<i>PARKIN</i>	Ubiquitina ligasa E3 de tipo RBR
PBS	Tampón fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
<i>PINK1</i>	Quinasa 1 inducida por <i>PTEN</i>
PPAR	Receptor activado por proliferador de peroxisomas
PPRE	<i>Peroxisome proliferator response elements</i>
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real
RBR	<i>Ring between ring</i>
RNS	Especies reactivas de nitrógeno
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RT-PCR	PCR con retrotranscripción

RXR	Receptor X retinoico
SASP	Fenotipo secretor asociado a senescencia
SBF	Suero bovino fetal
SOD	Superóxido dismutasa
SYSADOA	<i>Symptomatic Slow Action Drugs for Osteoarthritis</i>
TNF α	Factor de necrosis tumoral α
UNG	Uracil-N-glucosilasa
VLDL	<i>Very low density lipoprotein</i>
$\Delta\Psi_m$	Potencial de membrana mitocondrial

RESUMEN

AGONISTAS DE PPAR α COMO TRATAMIENTO MODIFICADOR DE LA ENFERMEDAD PARA LA ARTROSIS

Introducción: El desarrollo de agentes terapéuticos para prevenir la progresión del envejecimiento articular y la artrosis (OA) es una necesidad clínica urgente en una población cada vez más envejecida. La OA es la causa más común de discapacidad en adultos, siendo el envejecimiento y las alteraciones metabólicas dos de los factores de riesgo más importantes. En este sentido, se ha demostrado que actuando sobre la senescencia celular y la pérdida de autofagia, podemos proteger las células del envejecimiento articular y la OA. Esta aproximación terapéutica ha permitido identificar al Fenofibrato, un agonista de los receptores PPAR α con actividad hipolipemiente, como una molécula senolítica y activadora de autofagia en condrocitos humanos. Se ha observado que los receptores PPAR α están disminuidos en el cartílago envejecido y artrósico en ratones y humanos. En un estudio retrospectivo en pacientes con OA de rodilla se ha demostrado que el tratamiento con fibratos mejora las condiciones clínicas de estos pacientes. Estos hallazgos respaldan la hipótesis de que la activación del metabolismo lipídico, a través de PPAR α , puede mejorar la función articular en pacientes con OA y anima a demostrar el valor de los fibratos como terapia para la OA.

Objetivos: Por ello, el objetivo de este trabajo es evaluar el papel de PPAR α sobre los mecanismos asociados al envejecimiento articular y la OA en condrocitos humanos, centrándonos, en este caso, en su papel sobre la homeostasis de la mitocondria. Objetivo 1: Evaluar el efecto del Fenofibrato sobre la mitofagia. Objetivo 2: Determinar el efecto del Fenofibrato sobre la función mitocondrial.

Métodos: Se evaluará mediante expresión génica el papel de la activación de PPAR α con Fenofibrato sobre marcadores de mitofagia. Además, estudiaremos el papel del Fenofibrato sobre la viabilidad mitocondrial,

evaluando el potencial de membrana mitocondrial y el estrés oxidativo mediante citometría de flujo.

Resultados: Los resultados obtenidos indicaron que la activación de los receptores PPAR α no regulan la expresión de *PINK1* en respuesta a IL-1 β y TNF α . Sin embargo, el tratamiento con Fenofibrato 10 μ M disminuyó, en parte, la expresión de *PARKIN* mediada por IL-1 β . Por otro lado, el tratamiento con Fenofibrato 10 μ M protegió de la pérdida de potencial de membrana mitocondrial en respuesta a la IL-1 β , pero este efecto protector no se observó en respuesta al estrés oxidativo provocado por IL-1 β y TNF α .

Conclusiones: El Fenofibrato regula el proceso de mitofagia a través de la disminución de la expresión de *PARKIN* inducida por la IL-1 β . El efecto del Fenofibrato sobre la función mitocondrial es protector en relación a la estabilización del potencial de membrana mitocondrial, mientras que no modificó el estrés oxidativo mediado por mediadores catabólicos.

RESUMO

AGONISTAS DE PPAR α COMO TRATAMIENTO MODIFICADOR DA ENFERMIDADE PARA A ARTROSE

Introducción: O desenvolvemento de axentes terapéuticos para previr a progresión do envellecemento articular e a artrose é unha necesidade clínica urxente nunha poboación cada vez máis envellecida. A OA é a causa máis común de discapacidade en adultos, sendo o envellecemento e as alteracións metabólicas dous dos factores de risco máis importantes. Neste senso, demostrouse que actuando sobre a senescencia celular e a perda de autofaxia, podemos protexer ás células do envellecemento articular e a OA. Esta aproximación terapéutica permitiu identificar ó Fenofibrato, un agonista dos receptores PPAR α con actividade hipolipemiante coma unha molécula senolítica e activadora de autofaxia en condrocitos humanos. Observouse que os receptores PPAR α están diminuídos na cartilaxe envellecida e artrósica en ratos e humanos. Nun estudo retrospectivo en pacientes con OA de xeonllo, demostrouse que o tratamento con fibratos mellora as condicións clínicas destes pacientes. Estes achados respaldan a hipótese de que a activación do metabolismo lipídico, a través de PPAR α , pode mellorar a función articular en pacientes con OA e anima a demostrar o valor dos fibratos como terapia para a OA.

Obxectivos: Debido a isto, o obxectivo deste traballo é avaliar o papel de PPAR α sobre os mecanismos asociados ó envellecemento articular e a OA en condrocitos humanos, centrándonos, neste caso, no seu papel sobre a homeostase da mitocondria. Obxectivo 1: avaliar o efecto do Fenofibrato sobre a mitofaxia. Obxectivo 2: determinar o efecto do Fenofibrato sobre a función mitocondrial.

Metodoloxía: Avaliarase mediante expresión xénica o papel da activación de PPAR α con Fenofibrato sobre marcadores de mitofaxia. Ademais, estudaremos o papel do Fenofibrato sobre a viabilidade mitocondrial, avaliando o potencial da membrana mitocondrial e o estrés oxidativo mediante citometría de fluxo.

Resultados: Os resultados obtidos indicaron que a activación dos receptores PPAR α non afectan á expresión de *PINK1* en resposta a IL-1 β e TNF α . Porén, o tratamento con Fenofibrato 10 μ M reduciu, en parte, a expresión de *PARKIN* mediada por IL-1 β . Por outro lado, o tratamento con Fenofibrato 10 μ M protexeu da perda de potencial da membrana mitocondrial en resposta á IL-1 β , pero este efecto protector non se observou en resposta ó estrés oxidativo provocado por IL-1 β e TNF α .

Conclusións: O Fenofibrato regula o proceso de mitofaxia a través da diminución da expresión de *PARKIN* inducida pola IL-1 β . O efecto do Fenofibrato sobre a función mitocondrial é protector en relación á estabilización do potencial de membrana mitocondrial, mentres que non modificou o estrés oxidativo mediado por mediadores catabólicos.

ABSTRACT

PPAR α AGONISTS AS DISEASE-MODIFYING TREATMENT FOR OSTEOARTHRITIS

Introduction: Disease-modifying therapeutic agents to prevent cartilage aging and Osteoarthritis (OA) are an urgent clinical need for the older population that is growing dramatically. OA is the most common cause of disability in older adults, being aging and metabolism among the most important risk factors. However, the mechanisms underlying aging-related cartilage damage remain to be completely understood and exploited therapeutically. We demonstrated that targeting senescence and autophagy protect against cartilage aging and OA. Fenofibrate (FN), a PPAR α agonist used as lipid lowering fibrate drug, was identified as a senolytic and autophagy inducer. Reduced PPAR α is found in aging and OA-affected cartilage in mice and humans. Moreover, a retrospective study of Knee OA patients showed clinical improvement after FN treatment. These findings support the hypothesis that activating lipid metabolism in cartilage may improve joint function and encourage further studies to demonstrate the value of PPAR α agonist as disease-modifying OA therapy.

Objective: Evaluate the role of PPAR α on the mechanisms associated with joint aging and OA in human chondrocytes, focusing, in this case, on its role on mitochondrial homeostasis. Objective 1: Evaluate the effect of Fenofibrate on mitophagia. Objective 2: Determine the effect of Fenofibrate on mitochondrial function.

Methods: The role of activation of PPAR α with Fenofibrate on mitophagy markers will be evaluated by gene expression. In addition, we will study the role of Fenofibrate on mitochondrial viability, evaluating the mitochondrial membrane potential and oxidative stress using flow cytometry.

Results: The results indicated that the activation of the PPAR α receptors does not affect the expression of *PINK1* in response to IL-1 β and TNF α . However, treatment with 10 μ M Fenofibrate decreased, in part, the IL-1 β

mediated expression of *PARKIN*. On the other hand treatment with Fenofibrate 10 μ M protected from loss of mitochondrial membrane potential in response to IL-1 β , but this protective effect was not observed in response to oxidative stress caused by IL-1 β and TNF α .

Conclusions: Fenofibrate regulates the mitophagy process through the decrease in the expression of *PARKIN* induced by IL-1 β . The effect of Fenofibrate on mitochondrial function is protective in relation to the stabilization of the mitochondrial membrane potential, while it did not modify oxidative stress mediated by catabolic mediators.

INTRODUCCIÓN

1.- INTRODUCCIÓN

1.1.- LA ARTROSIS Y EL CARTÍLAGO ARTICULAR

La artrosis (OA) es la enfermedad musculoesquelética más común, con una prevalencia del 20% en personas mayores, y más elevada en mujeres que en hombres. Se prevé un aumento de la incidencia y la prevalencia en las próximas décadas debido al envejecimiento de la población, al aumento de las tasas de obesidad y de traumatismos de rodilla (1).

La OA afecta normalmente a las articulaciones de manos, columna vertebral, caderas, rodillas y pies. Actualmente, se considera una enfermedad de toda la articulación con afectación del cartílago articular, de la membrana sinovial, del hueso subcondral y de los tejidos blandos intra y periarticulares (meniscos, ligamentos, músculos, etc.) y está desencadenada por un desequilibrio entre la destrucción y la reparación de los tejidos que conforman la articulación (2) (**Figura 1**).

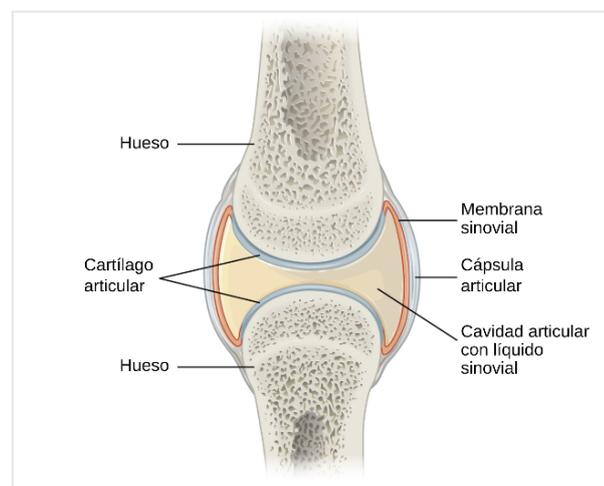


Figura 1. Representación gráfica de una articulación sinovial susceptible de sufrir artrosis (imagen modificada de la original disponible en: <https://cnx.org/contents/bFtYymxt@4/Synovial-Joints>).

Los fallos en los mecanismos de homeostasis relacionados con la edad, como la acumulación de células senescentes y defectos en el proceso de

autofagia, contribuyen a la degeneración del cartílago articular y al desarrollo de la OA (3).

El cartílago articular es un tejido conectivo avascular, aneural y alinfático que se nutre por difusión a partir del líquido sinovial. Los componentes principales del cartílago articular son, por un lado, los condrocitos (el único tipo celular) que representan entre el 2-5% del volumen total de tejido, y por otro lado, la matriz extracelular (MEC) que proporciona un soporte estructural y bioquímico en el cartílago y que está formada por agua, fibras de colágeno, proteoglicanos y otras proteínas (4).

En la **Figura 2 (A-D)** se puede observar la degradación que sufre el cartílago articular con los cambios estructurales y bioquímicos relacionados con la OA, como son el aumento de proteasas y citocinas inflamatorias, como la interleucina 1 β (IL-1 β) o el factor de necrosis tumoral α (TNF α), la disminución del número de condrocitos y de los proteoglicanos de la MEC, la erosión de la red de colágeno, y por último, la formación de agrupaciones de condrocitos y la calcificación del cartílago (**Figura 2D**).

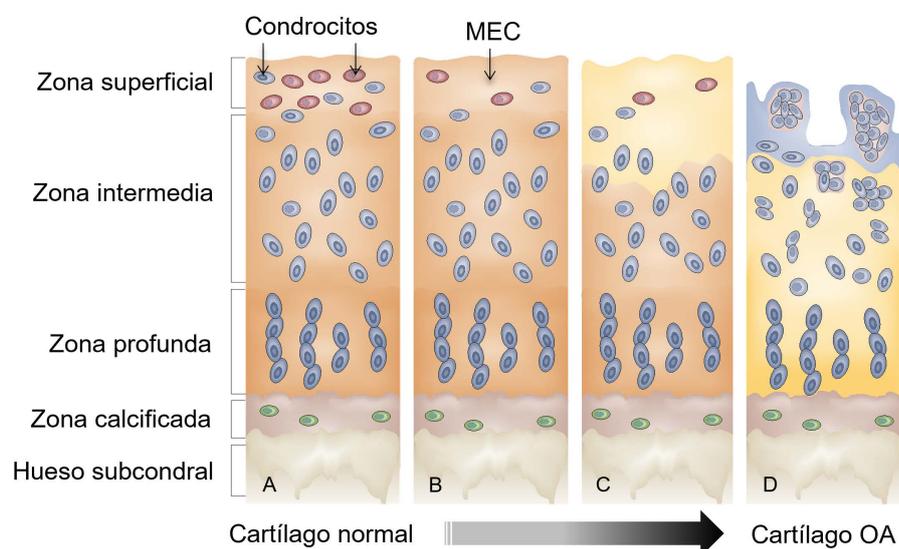


Figura 2. Estructura del cartílago y cambios en su morfología en su transición de cartílago normal a artrosis (figuras de A a D). MEC: matriz extracelular. Figura modificada de (5).

1.2.- TRATAMIENTO FARMACOLÓGICO DE LA ARTROSIS

En la actualidad no existen tratamientos curativos para la OA, solo existen tratamientos sintomáticos, entre los que podemos distinguir cuatro grupos:

- En el primer grupo se incluyen los fármacos de acción rápida como el paracetamol (analgésico) o los antiinflamatorios no esteroideos (AINE), cuyo objetivo es controlar la inflamación y el dolor.
- En segundo lugar, los fármacos modificadores de los síntomas de acción lenta o SYSADOA (*Symptomatic Slow Action Drugs for Osteoarthritis*) que se caracterizan por el inicio tardío de sus efectos, dos o tres semanas después de su administración y un efecto remanente que persiste de dos a seis meses después del cese de su tratamiento. Forman parte de los SYSADOA el ácido hialurónico, el condroitín-sulfato, la diacereína y el sulfato de glucosamina.
- En el tercer grupo tenemos las infiltraciones intraarticulares de glucocorticoides.
- Por último, los antidepresivos para la reducción del dolor en pacientes con depresión y/o dolor neuropático (2).

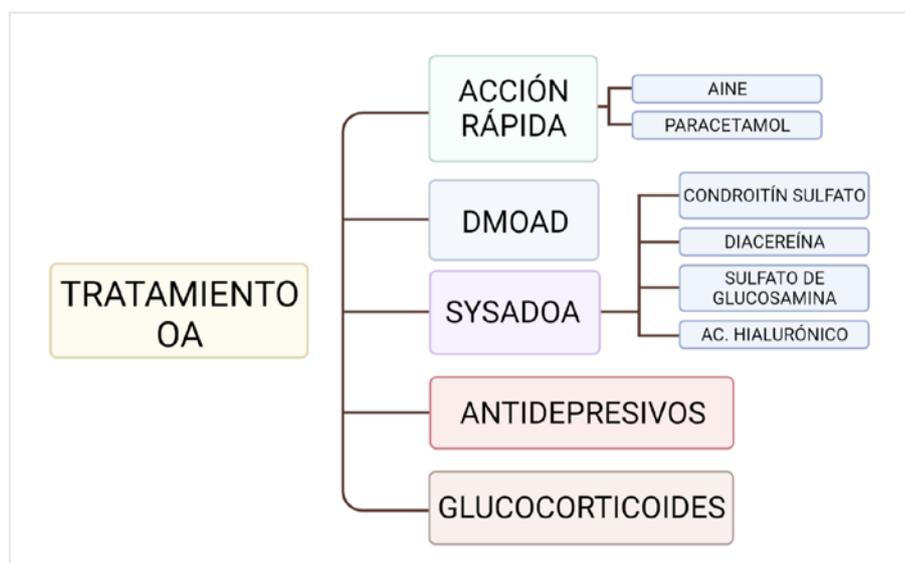


Figura 3. Tratamientos para la artrosis. AINE: antiinflamatorios no esteroideos; DMOAD: *Disease Modifying Osteoarthritis Drugs*; SYSADOA: *Symptomatic Slow Action Drugs for Osteoarthritis*;

Los fármacos modificadores de la estructura para la artrosis o DMOAD (*Disease Modifying Osteoarthritis Drugs*) son aquellos capaces de reducir, frenar o revertir la destrucción del cartílago articular, y no existe actualmente ningún medicamento comercializado con esta indicación. Por esta razón, urge la necesidad de nuevas terapias con actividad farmacológica sobre la degeneración del cartílago articular. En nuestro laboratorio, identificamos un mecanismo de acción y un fármaco aprobado para enfermedades metabólicas, como un candidato a DMOAD (3). El Fenofibrato es un agonista de los receptores activados por proliferadores de peroxisomas (PPAR α), con propiedades farmacológicas sobre algunos mecanismos relacionados con la OA, como la autofagia y la senescencia.

1.3.- FENOFIBRATO

El Fenofibrato es un profármaco del ácido fíbrico, que tras su hidrólisis en el organismo, produce el metabolito activo llamado ácido fenofíbrico. Actúa aumentando el catabolismo de las lipoproteínas ricas en triglicéridos *low density lipoprotein* (LDL) y *very low density lipoprotein* (VLDL), por activación de la lipoproteinlipasa, y la inhibición de la enzima que degrada esa lipasa. Este fármaco se encuentra actualmente aprobado como terapia para reducir los niveles de LDL, VLDL y triglicéridos, y aumentar los niveles de HDL (*high density lipoprotein*). Se puede ver la estructura química del Fenofibrato en la **Figura 4**.

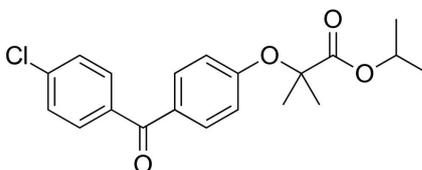


Figura 4. Estructura química del Fenofibrato: 2-[4-(4-clorobenzoil) fenoxi]-2-metilpropanoato de 1-metiletilo (6).

Dado que el Fenofibrato es un fármaco comercializado como hipolipemiente y que es capaz de mejorar el perfil metabólico de los pacientes, así como de disminuir la inflamación, se considera un fármaco

candidato para prevenir la OA en base a varios motivos detallados a continuación:

- El Fenofibrato elimina selectivamente las células senescentes a través de la activación de la muerte celular por apoptosis, incrementa el flujo de autofagia y protege el cartílago articular de su degradación (3).
- Se observó una disminución de los receptores PPAR α en ratones envejecidos y con OA, y en sangre y cartílago de pacientes con OA de rodilla procedentes de la Cohorte Prospectiva de Artrosis de A Coruña (PROCOAC) (3).
- En un estudio retrospectivo de la cohorte americana, *Osteoarthritis Initiative* (OAI), se observó que el tratamiento con fibratos mejoró significativamente las condiciones clínicas de los pacientes con OA de rodilla (3).

El mecanismo de acción de este medicamento está asociado a su actividad como agonista de los receptores activados por proliferadores de peroxisomas (PPAR α), organelas encargadas de oxidar los ácidos grasos.

1.4.- RECEPTORES PPAR

Los receptores PPAR son receptores nucleares activados por ligandos, que actúan como factores de transcripción, regulando la velocidad de transcripción de la información genética de ADN (ácido desoxirribonucleico) a ARNm (ácido ribonucleico mensajero). Estos receptores regulan la expresión de genes implicados en procesos metabólicos relacionados con los lípidos y la glucosa (7).

1.4.1.- Estructura

Los receptores PPAR son proteínas que presentan varias regiones en su estructura (**Figura 5**); un dominio de unión al ADN en la región central de la molécula (C); un dominio de unión al ligando en el extremo C-terminal (E/F), que se puede definir como un interruptor molecular, de manera que en presencia del ligando transforma al receptor de una forma

transcripcionalmente inactiva a otra capaz de activar la maquinaria de transcripción celular; un dominio N-terminal (A/B) y la región bisagra (D) (8).



Figura 5. Esquema de la estructura general de los receptores nucleares. La región A/B en el extremo N-terminal contiene el dominio AF1; La región C contiene el dominio DBD (*DNA binding domain*); D es la región bisagra; la región E/F presenta los dominios LBD y AF2 y está situada en el extremo C terminal. Figura modificada de (9,10).

1.4.2.- Clasificación

La familia de los PPAR está formada por las isoformas PPAR α , PPAR γ y PPAR β/δ :

- PPAR α se expresa más en hepatocitos, cardiomiocitos, enterocitos y células del túbulo proximal del riñón y participan principalmente en el aumento de la oxidación de los ácidos grasos (7).
- PPAR β/δ se expresa en varios tejidos, no solo implicados en la oxidación de ácidos grasos, sino también en la curación de heridas, en la diferenciación de queratinocitos y en la adipogénesis. Se expresa en todas las células, y en gran medida, en el músculo esquelético y en los macrófagos (7).
- PPAR γ se expresa en gran medida en el tejido adiposo y está relacionado con la adipogénesis, el almacenamiento de lípidos y la homeostasis de la glucosa (7).

1.4.3.- Funcionamiento de los receptores PPAR α

Los receptores PPAR α pueden ser activados por multitud de moléculas, por ejemplo, por los ácidos grasos de la dieta o por la molécula de interés para este trabajo, el Fenofibrato. Cuando el ligando se ha unido al receptor, este se transloca al núcleo y se heterodimeriza con el receptor del ácido retinoico X (RXR). Este heterodímero reconoce secuencias específicas del

ADN en los promotores de los genes diana, llamados PPRE (*peroxisome proliferator response elements*) (11).

La actividad de los receptores PPAR α finalmente está regulada por otros compuestos intermedios, conocidos colectivamente como correpresores y coactivadores. En ausencia de ligandos, los heterodímeros de PPAR-RXR reclutan correpresores para silenciar la transcripción.

Una vez que el ligando se une a PPAR α , pueden actuar los coactivadores y se expresará el gen diana. El funcionamiento del receptor PPAR α se explica en la **Figura 6** (11).

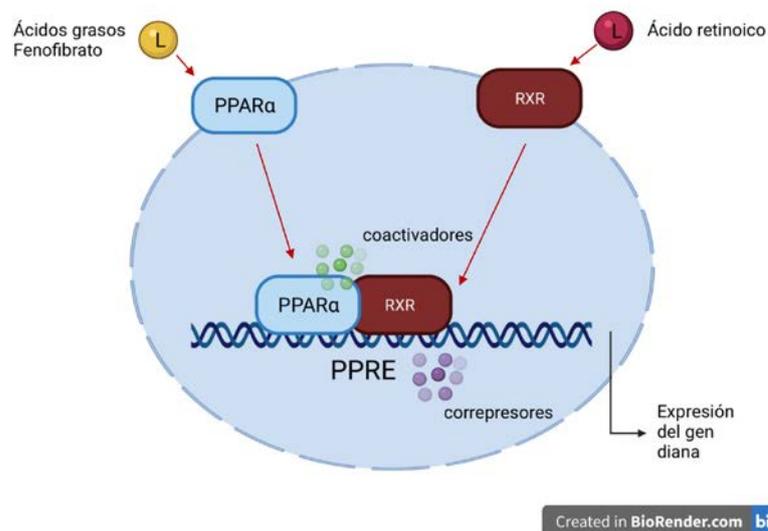


Figura 6. Funcionamiento de los receptores PPAR α como mediadores de la transcripción. PPAR: receptor activado por proliferador de peroxisomas; PPRE: peroxisome proliferator response elements; RXR: receptor x retinoide; L: ligando. Imagen modificada de (11) en <https://biorender.com>.

1.4.4.- Relación entre el Fenofibrato, los PPAR y la OA

El Fenofibrato, como activador de los receptores PPAR α , es capaz de estimular la captación de ácidos grasos para degradarlos mediante la β -oxidación mitocondrial y en los peroxisomas; además, regula la producción de glucosa y activa la autofagia. La activación de estos receptores tiene un efecto antiinflamatorio al regular de forma negativa la expresión de genes proinflamatorios y al disminuir la secreción de citocinas proinflamatorias

como las IL, el TNF α o el interferón gamma (IFN- γ). Durante el envejecimiento se disminuye la expresión de los receptores PPAR y esto provoca el aumento y acumulación de mediadores proinflamatorios.

1.5.- AUTOFAGIA Y MITOFAGIA

La autofagia es el proceso de catabolismo no selectivo de componentes celulares citosólicos, como diferentes orgánulos y agregados proteicos, a través de su encapsulación por una estructura de doble membrana conocida como autofagosoma. El proceso de encapsulación comienza con la formación de una doble membrana, llamada membrana de aislamiento, que comienza a rodear la carga citosólica hasta que sus bordes se sellan para secuestrar el contenido en el autofagosoma, que posteriormente se fusionará con un lisosoma (12). En el lisosoma tendrá lugar la degradación de la bicapa interna del autofagosoma y la degradación del contenido, por enzimas hidrolíticas y proteolíticas, para la reutilización de componentes o producción de energía en forma de adenosín trifosfato (ATP) (13) (**Figura 7**).

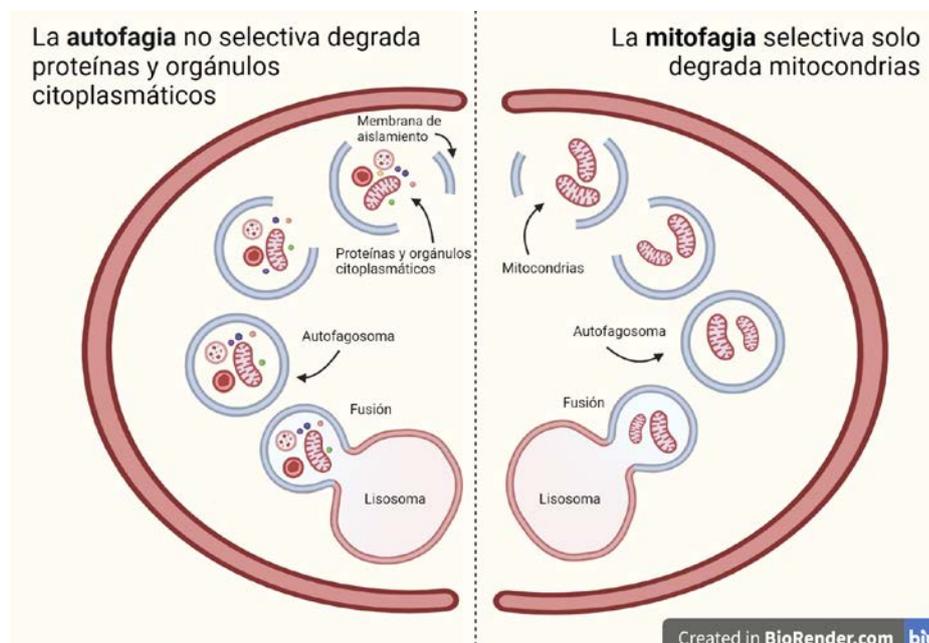


Figura 7. Autofagia y mitofagia. En la imagen de la izquierda podemos observar el proceso de autofagia en el citoplasma celular, mediante el cual se degradan proteínas y orgánulos de manera no selectiva. La imagen de

la derecha describe el proceso de mitofagia mediante el cual solamente se degradan las mitocondrias de manera selectiva. Figura modificada de (13) en <https://biorender.com>.

La autofagia no selectiva tiene lugar cuando las células se ven privadas de nutrientes, por el contrario, la mitofagia (autofagia selectiva de las mitocondrias) tiene la finalidad de regular el número de mitocondrias según los requisitos metabólicos del organismo; o bien, eliminar mitocondrias dañadas (disfuncionales) que podrían llegar a ser perjudiciales para la célula (13).

1.6.- LA SENESCENCIA CELULAR Y LA ARTROSIS

El envejecimiento y las enfermedades asociadas al envejecimiento, como la OA, están directamente relacionadas con el proceso de senescencia celular y en consecuencia, con los efectos provocados por la presencia de células senescentes (10).

La senescencia celular es una respuesta al estrés caracterizada por la inducción de una detención permanente del ciclo celular, que causa una disminución del potencial regenerativo y funcional de los tejidos y, promueve la aparición del fenotipo secretor asociado a la senescencia (SASP) (14). Con el envejecimiento, estas células senescentes tienden a acumularse en los tejidos y secretarán factores proinflamatorios y enzimas (quimiocinas, factores de crecimiento, interleucinas, y metaloproteasas) que degradarán la MEC (**Figura 8**), además de desarrollar un estado de inflamación crónico de bajo grado conocido como *inflammaging* (15).

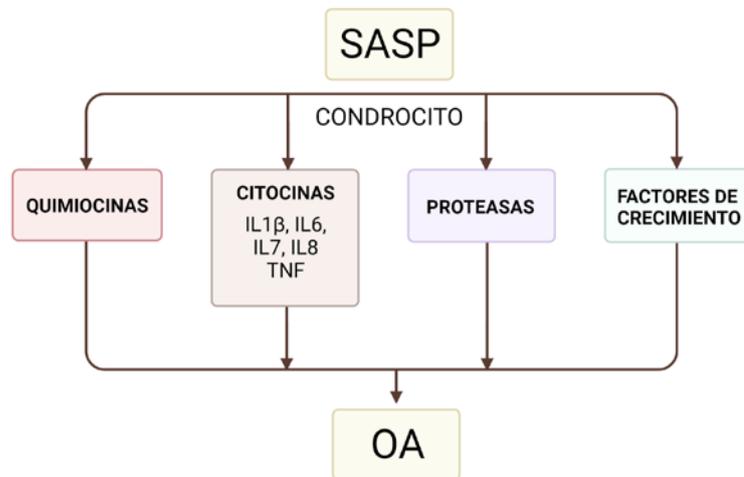


Figura 8. Asociación entre el fenotipo secretor asociado a la senescencia (SASP) y la artrosis (OA). IL: interleucina. Imagen modificada de (16).

La acumulación de estas células envejecidas y la secreción prolongada del SASP puede provocar la senescencia de células vecinas, es decir, transmitir la senescencia a células cercanas normales. También puede modificar la estructura tisular y la función celular, acelerar el desarrollo del envejecimiento y de las enfermedades relacionadas con el envejecimiento, como es la OA. Este ambiente inflamatorio propicia la destrucción del tejido articular y defectos en su reparación por daños en la MEC (15).

Las células senescentes presentan alteraciones morfológicas entre las que se incluyen: el incremento del contenido lisosomal, cambios en la integridad celular, forma más alargada e irregular, alteraciones en la membrana plasmática y presentan disfunción mitocondrial con generación de altos niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS) (17).

1.6.1.- Disfunción mitocondrial

López-Otín *et al.* definieron nueve marcadores del envejecimiento entre los que se encuentra la disfunción mitocondrial (18).

Las mitocondrias son importantes en la regulación de la supervivencia celular, y los signos clásicos de muerte celular están precedidos por alteraciones mitocondriales, que incluyen: una pérdida del potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$), una disminución en la producción de

energía, un aumento en la permeabilidad de la membrana y una liberación de citocromo c (19).

Las mitocondrias producen energía en forma de ATP gracias al gradiente electroquímico que tiene lugar a través de la membrana mitocondrial interna (MMI). Cuando este gradiente disminuye y la producción de ATP se ve afectada, se dice que la mitocondria es disfuncional (**Figura 9**).

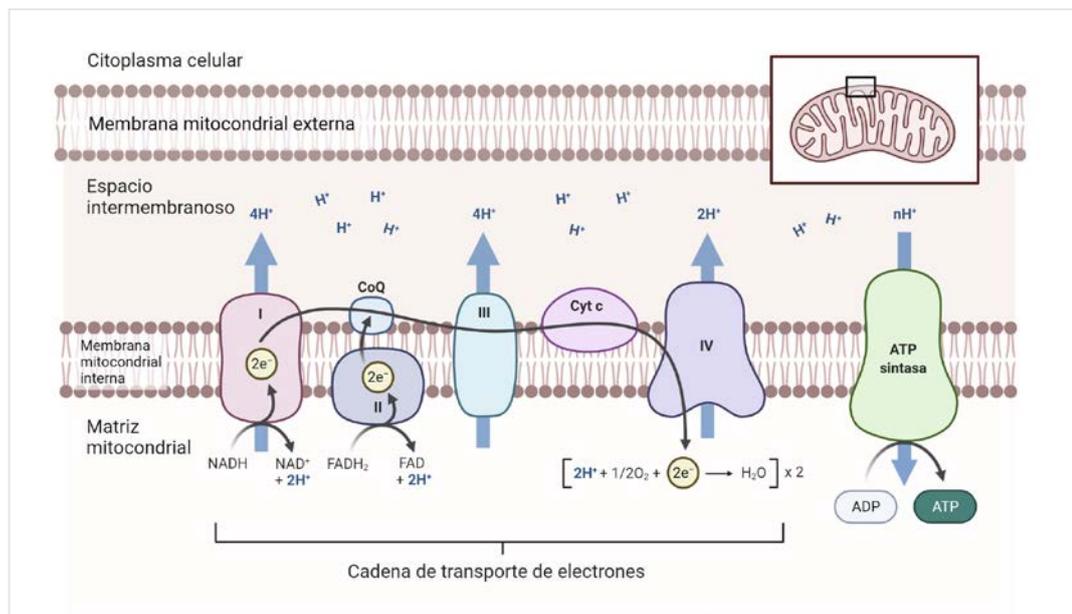


Figura 9. Cadena de transporte de electrones en la membrana mitocondrial interna. Producción de energía en forma de ATP gracias al gradiente electroquímico de H^+ generado entre la matriz y el espacio intermembranoso y a la fosforilación oxidativa (ATP sintasa). Imagen creada en <https://biorender.com>.

Existe un control de calidad para eliminar las mitocondrias disfuncionales y que se encuentra regulado por los genes *PINK1* y *PARKIN*. Las proteínas Pink1 (quinasa 1 inducida por *PTEN*) y Parkin (ubiquitina ligasa E3 de tipo RBR o *ring between ring*) intervienen de manera decisiva en la detección y eliminación de mitocondrias dañadas. Pink1 es un sensor que detecta las mitocondrias disfuncionales y se acumula en su membrana mitocondrial externa (MME). Si la mitocondria no estuviese dañada, Pink1 se translocaría al interior mitocondrial y se degradaría (20).

Parkin se encuentra en el citosol celular de manera inactiva. En el momento en el que Pink1 comienza a acumularse en la MME de una mitocondria dañada, fosforila a Parkin y a las ubiquitinas, y de esta manera, Parkin se transforma en su forma activa. En el paso 1 de la **Figura 10** tiene lugar la activación y reclutamiento de Parkin por parte de las ubiquitinas fosforiladas y tendrá lugar una retroalimentación positiva que provocará, en el paso 2, más unión de cadenas de ubiquitina. Por lo tanto, Parkin se comporta como un amplificador de la cadena de fosfoubiquitinas en mitocondrias dañadas para provocar su eliminación mediante mitofagia. Algunas proteínas como la ubiquitina son degradadas en los proteosomas (21)

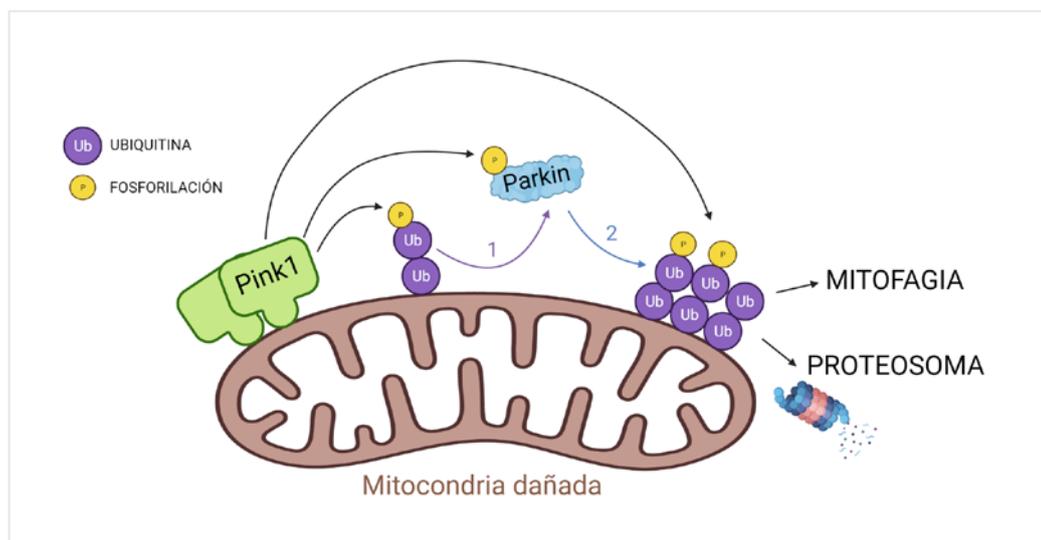


Figura 10. Control de calidad mitocondrial mediado por Pink1 y Parkin.

Pink1 fosforila las ubiquitinas y a Parkin. Paso 1: Parkin es activado y reclutado por las ubiquitinas. Paso 2: Parkin provoca más unión de ubiquitinas (retroalimentación positiva). Finalmente, la mitocondria es degradada por mitofagia y proteosomas. Figura modificada de (22) en <https://biorender.com>

Como los defectos en la fosforilación oxidativa (**Figura 9**) pueden generar especies reactivas de oxígeno (ROS) dañinas, es importante que estas mitocondrias disfuncionales se eliminen de manera eficiente mediante este proceso de mitofagia (23).

1.6.2.- Estrés oxidativo mitocondrial

Además del envejecimiento, se ha demostrado que la senescencia en sí misma induce disfunción mitocondrial y estimula la producción de ROS (16), es decir, estrés oxidativo.

Dado que las mitocondrias son una fuente importante de ROS, la disfunción mitocondrial relacionada con la edad, que conduce a un desequilibrio entre la producción de ROS y la capacidad antioxidante de la célula, se ha identificado como un factor que contribuye al desarrollo de OA (16). Las células sinoviales y los condrocitos envejecidos exhiben disfunción mitocondrial, así como una reducción de la capacidad antioxidante (disminución de la actividad de la catalasa, de la superóxido dismutasa (SOD), de la glutatión peroxidasa y de la peroxirredoxina) (16) (**Figura 11**).

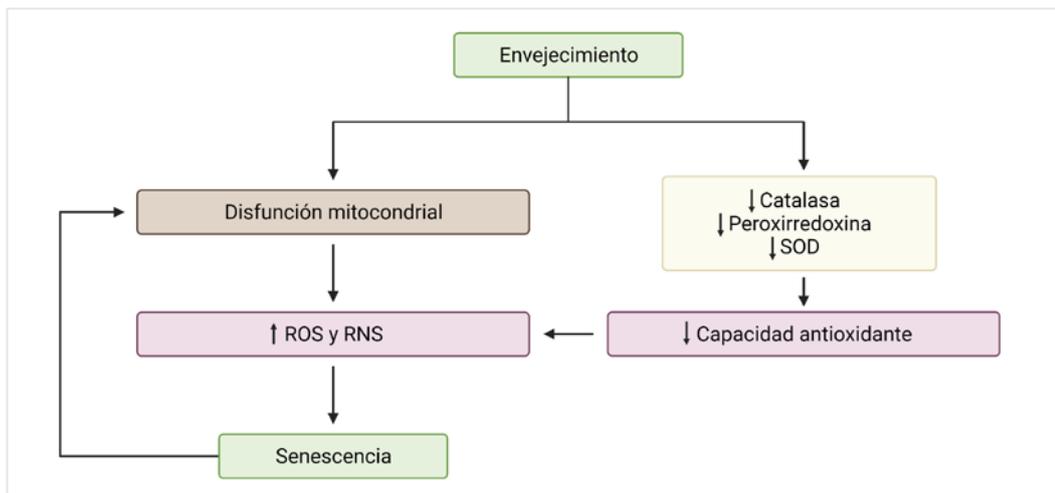


Figura 11. Relación entre el envejecimiento, el estrés oxidativo, la disfunción mitocondrial y la senescencia.

Como resultado del mal funcionamiento de la cadena de transporte de electrones mitocondrial, se produce menos ATP y se aumenta la generación de ROS como, por ejemplo, el ion superóxido (O_2^-) y el radical hidroxilo (HO^\cdot); y también aumentan las especies reactivas de nitrógeno (RNS) que pueden dar lugar a compuestos tan tóxicos como el peroxinitrito ($ONOO^-$). Las ROS pueden generar lesiones oxidativas en lípidos, proteínas, hidratos de carbono o en el ADN (**Figura 12**).

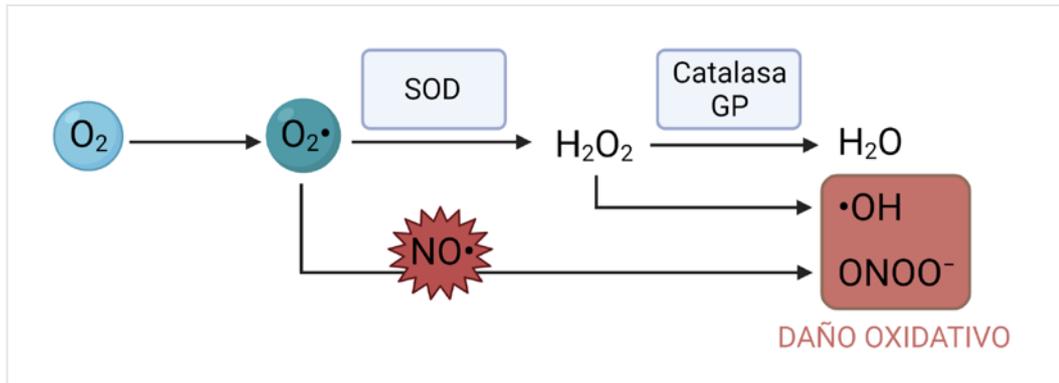


Figura 12. Generación de ROS en la cadena de transporte de electrones mitocondrial. La superóxido dismutasa (SOD) transforma el $O_2\cdot$ en H_2O_2 que posteriormente será transformado en H_2O gracias a la catalasa o a la glutatión peroxidasa (GP). Creado en <https://biorender.com>.

Se sabe que la SOD se expresa abundantemente en el cartílago articular humano y que su actividad está marcadamente disminuida en el cartílago de pacientes OA (24,25). Las catalasas y peroxirredoxinas también se encuentran disminuidas o inactivas en condrocitos OA (26), y cuando se provoca la sobreexpresión de catalasa, se reduce la gravedad de la OA en ratones. Esto sugiere una correlación entre el aumento de estrés oxidativo y la inducción de la senescencia en el cartílago, lo que podría conducir a la OA (16).

2.- OBJETIVOS

El Fenofibrato fue identificado como candidato por su potencial relevancia debida a su mecanismo de acción sobre el metabolismo lipídico en el desarrollo de la artrosis y por su papel activador de los receptores PPAR α (10). Sin embargo, no se conoce en detalle el mecanismo terapéutico protector sobre el cartilago articular de este fármaco candidato, especialmente sobre algunos de los marcadores clave de degeneración y envejecimiento del sistema musculoesquelético, como la autofagia y la función mitocondrial.

Por lo tanto, el objetivo principal de este estudio es investigar en mayor profundidad los mecanismos por los cuales el Fenofibrato presenta su efecto terapéutico sobre la OA, centrándonos, en este caso, en su papel sobre la homeostasis de la mitocondria. Para abordar dicho objetivo, se propusieron los siguientes objetivos específicos:

1. Evaluar el efecto del Fenofibrato sobre la mitofagia
2. Determinar el efecto del Fenofibrato sobre la función mitocondrial
 - 2.1 Analizar el efecto del Fenofibrato sobre el potencial de membrana mitocondrial.
 - 2.2 Estudiar el efecto del Fenofibrato sobre el estrés oxidativo.

MATERIALES Y MÉTODOS

3.- MATERIALES Y MÉTODOS

Para desarrollar los objetivos planteados en este trabajo se realizaron una serie de experimentos, con la línea celular humana de condrocitos TC28a2, consistentes en primer lugar, en el estudio de marcadores de mitofagia mediante expresión génica con sondas Taqman®; en segundo lugar, determinar el potencial de membrana mitocondrial mediante citometría de flujo con el colorante DILC-1 MitoStep™ (yoduro de 1,1',3,3,3',3'-hexametilindodicarbocianina) de Immunostep; y en último lugar, el estudio de la producción de especies reactivas de oxígeno mitocondriales mediante citometría de flujo con el colorante MitoSOX™ de Invitrogen™ (**Figura 13**).

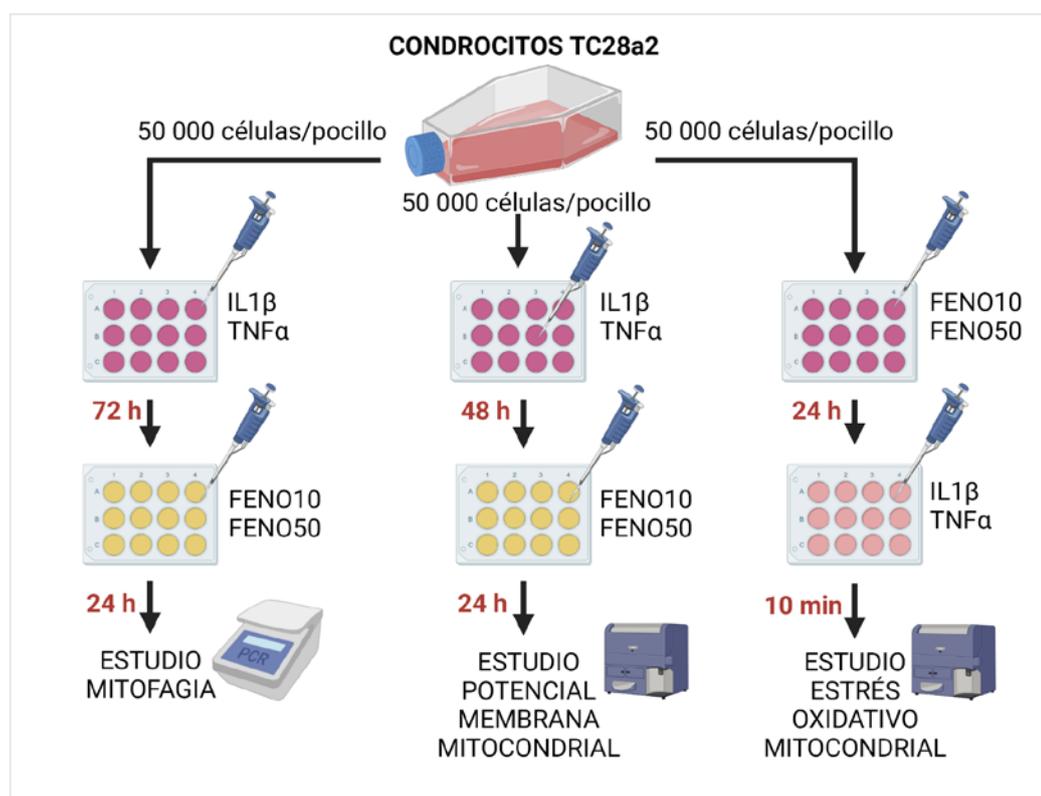


Figura 13. Esquema de los experimentos realizados en la línea celular T/C28a2 con diferentes estímulos y tiempos. Las concentraciones empleadas de IL-1β y de TNFα fueron de 5 ng/mL y las de Fenofibrato (FENO) fueron de 10 μM y 50 μM.

3.1.- LÍNEA CELULAR: DESCONGELACIÓN Y CULTIVO

Para realizar los tres experimentos se sembró una línea celular de condrocitos humanos llamada TC28a2, que fue obtenida inicialmente mediante la cirugía del cartílago costal de una mujer de quince años que sufría de una malformación en el tórax (*pectus excavatum*) (27). Se debe tener en cuenta que la línea celular utilizada para los experimentos procede de un cartílago costal y no de un cartílago articular que sería el tipo de cartílago donde se produce la OA, lo cual es una posible limitación a tener en cuenta.

Las células se almacenan en congeladores a -80°C en un medio crioprotector que contiene suero bovino fetal (SBF) y un 10% de DMSO (dimetilsulfóxido). Para descongelar las células almacenadas en crioviales, se eliminó el líquido crioprotector mediante centrifugación y se sembraron en frascos de cultivo T-75 y T-175 (Falcon®), con un medio de cultivo DMEM10 (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium* suplementado al 10% con SBF y al 1% con penicilina/estreptomicina). Posteriormente, se introdujeron en una estufa de cultivos a 37°C , en una atmósfera húmeda, con 5% de CO_2 (**Figura 14**).

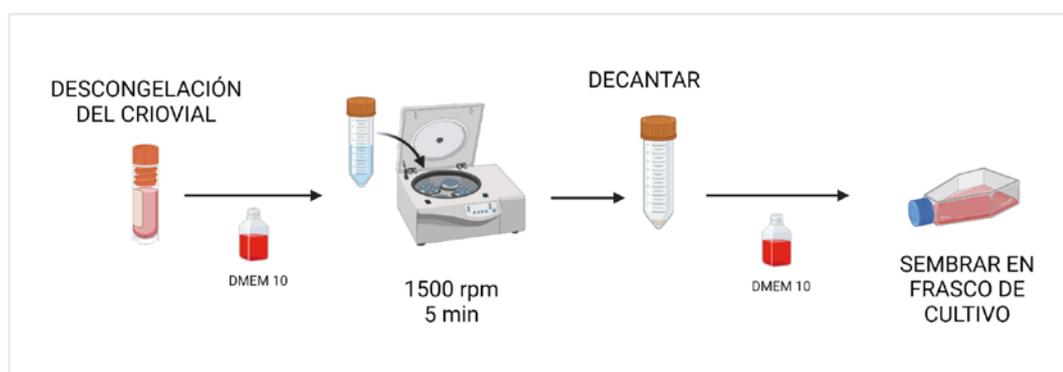


Figura 14. Procedimiento para la descongelación de un criovial (imagen creada en <https://biorender.com>).

Una vez que las células alcanzaron la confluencia, se sembraron en placas de doce pocillos (Costar®). Para ello, se retira el medio del frasco de cultivo, se lava el frasco con 8 mL de suero salino y posteriormente se levantan las

células, que se encuentran adheridas al fondo del frasco, con ayuda de 2 mL de tripsina 2X. Las dejamos en la estufa aproximadamente dos minutos, hasta que comprobamos, mediante el microscopio, que todas las células se han levantado (cambio de morfología de las células que se verán con forma circular y en movimiento). Las diferencias morfológicas de las células levantadas, adheridas a la placa al inicio y confluentes, pueden apreciarse en la **Figura 15**.

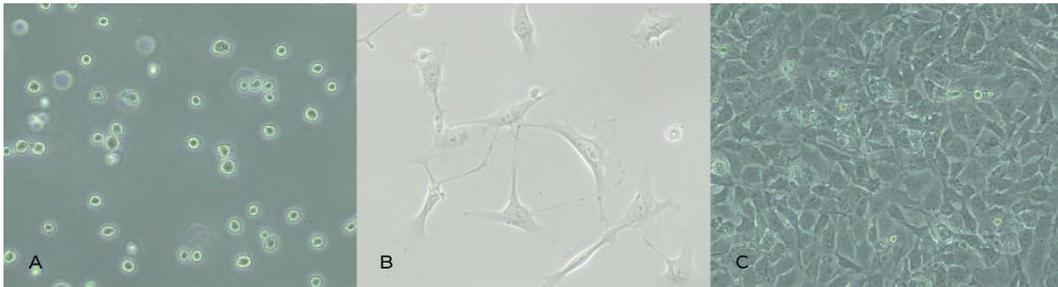


Figura 15. Aspecto de la línea celular de condrocitos TC28a2. A) Aspecto globular de los condrocitos cuando no se encuentran adheridos a la placa (levantados). B) Aspecto fibroblástico de los condrocitos cuando se adhieren a la placa de siembra. C) Aspecto de los condrocitos cuando alcanzan la confluencia.

A continuación, inactivamos la tripsina con DMEM 10% (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium* suplementado al 10% con SBF, DMEM10) y centrifugamos el contenido del frasco a 1500 rpm durante cinco minutos. Decantamos el sobrenadante y resuspendemos el precipitado en 10 mL de DMEM10 para contar, con una cámara de Neubauer, el número de células de las que disponemos (**Figura 16**).

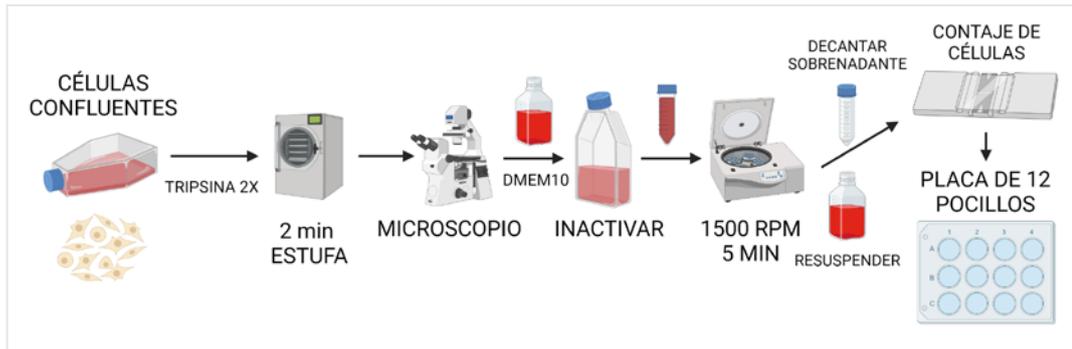


Figura 16. Procedimiento para el cultivo de condrocitos en placas de 12 pocillos (figura creada en <https://biorender.com>)

Sembramos 50 000 células por pocillo en las placas de doce pocillos, con la finalidad de realizar los experimentos de expresión génica y citometría de flujo (**Figura 17**).



Figura 17. Placa de doce pocillos donde se sembraron células con condiciones distintas para realizar los estudios de expresión génica y las citometrías de flujo con DILC-1.

3.2.- EXTRACCIÓN DE ARN PARA EL ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN GÉNICA

Para observar el efecto del Fenofibrato sobre la mitofagia realizamos un estudio de la expresión de varios genes relacionados con este proceso de mitofagia (*PINK1*, *PARKIN*).

Después de 24 horas de incubación en la estufa en las placas de doce pocillos, retiramos el medio DMEM10, lavamos con 500 μ L de suero salino cada pocillo y añadimos 500 μ L de DMEM 2% (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium* suplementado al 2% con SBF y 1% de penicilina/estreptomicina, DMEM2) a cada pocillo. El medio de mantenimiento DMEM2 se prepara previamente a partir de DMEM 0% y DMEM10.

Al tratarse de una línea de condrocitos sanos, provocamos un daño celular para simular enfermedad, estimulando las células con dos citocinas proinflamatorias, la IL-1 β (5 ng/mL) y el TNF α (5 ng/mL). Pasadas 72 horas, tratamos las células con Fenofibrato (FN) 10 μ M y 50 μ M durante 24 horas, según el esquema que podemos ver en la **Figura 18** y en la **Tabla I**.

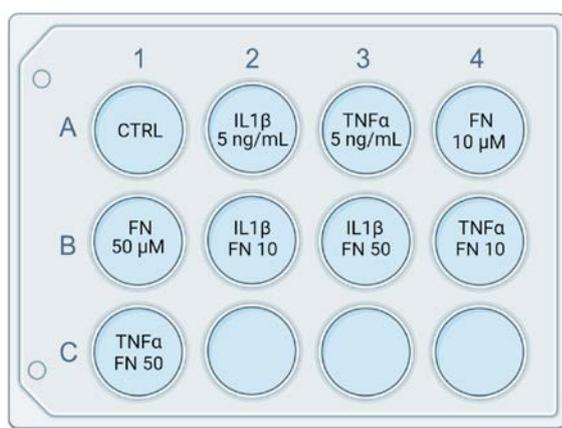


Figura 18. Condiciones de estimulación de las células con interleucina (IL-1 β), Factor de necrosis tumoral (TNF α) y Fenofibrato (FN) (figura realizada con <https://biorender.com>).

Tabla I. Soluciones madre de reactivos y concentraciones utilizadas para los experimentos.

Reactivos	[Solución madre]	[Solución de trabajo]
FN	10 mM	10 μ M
IL-1 β	5 μ g/mL	5 ng/mL
TNF α	10 μ g/mL	5 ng/mL

3.2.1.- Extracción de ARN con Trizol®

El Trizol® es un reactivo de color rosa brillante que contiene fenol, tiocianato de guanidinio y otros componentes, que nos permitirá el aislamiento de ARN procedente de nuestro cultivo celular. Debido a la toxicidad y al fuerte olor del Trizol® se debe trabajar en una campana de extracción de químicos.

Una vez pasadas las 24 horas desde que estimulamos las células con Fenofibrato, comenzamos el proceso de extracción con Trizol® (**Figura 19**). Con unas pipetas Pasteur, retiramos todo el medio DMEM2 de nuestros pocillos y lavamos cada pocillo con 500 µL de suero salino para retirar cualquier resto de medio que pudiera quedar.

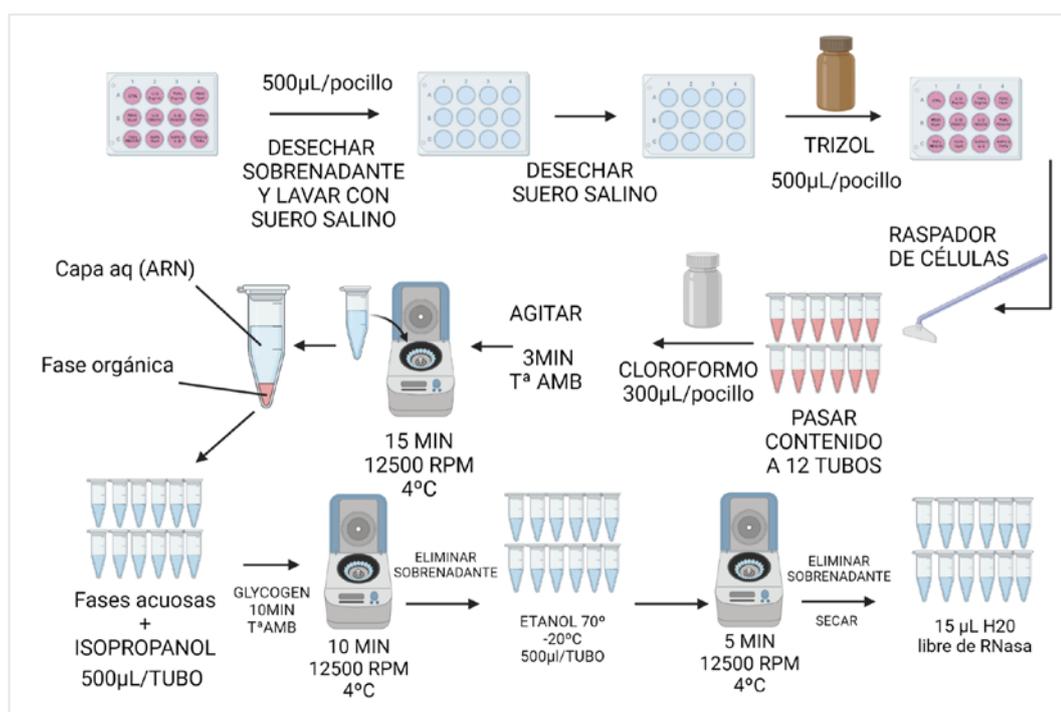


Figura 19. Protocolo de extracción de ARN con Trizol® y cloroformo (figura realizada con <https://biorender.com>).

A continuación, añadimos 500 µL de Trizol® a cada pocillo y con ayuda de un raspador de células separamos todas las células que se encuentran adheridas al fondo de los pocillos. Transferimos el contenido de cada pocillo a un tubo de microcentrífuga de 1,5 mL y añadimos 300 µL de cloroformo a cada tubo y mezclamos por inversión. A continuación, lo dejamos incubar

a temperatura ambiente durante tres minutos, antes de centrifugar a 12 500 rpm durante quince minutos y a 4°C.

En los tubos centrifugados observamos dos fases bien diferenciadas, la fase superior o acuosa, que es donde se encuentra el ARN que queremos extraer, y la fase inferior, que es la orgánica. Extraemos la fase acuosa, con cuidado de no recoger nada de la fase orgánica ni de la interfase y la depositamos en otros tubos de microcentrífuga de 1,5 mL, donde añadimos 500 µL de isopropanol para provocar la precipitación del ARN. Mezclamos por inversión e incubamos diez minutos a temperatura ambiente.

Centrifugamos los tubos a 4°C y 12 500 rpm durante diez minutos y descartamos el sobrenadante para añadir al precipitado 700 µL de etanol de 70° en frío. Desechamos nuevamente el sobrenadante con ayuda de una micropipeta y centrifugamos 15 segundos a 13 000 rpm para poder retirar cualquier pequeño resto de alcohol que pudiera quedar. A continuación, dejamos los tubos abiertos en hielo para que se seque el precipitado durante unos minutos. Una vez que los alcoholes se han evaporado por completo, añadimos a cada tubo 15 µL de agua libre de ribonucleasas, resuspendemos y dejamos en hielo.

3.2.2.- Cuantificación de ARN con Nanodrop

Para cuantificar el ARN que hemos obtuvimos en el paso anterior utilizamos el Nanodrop ND-1000, un espectrofotómetro que permite analizar muestras con volúmenes muy bajos, de entre 1 y 2 µL (**Figura 20**).

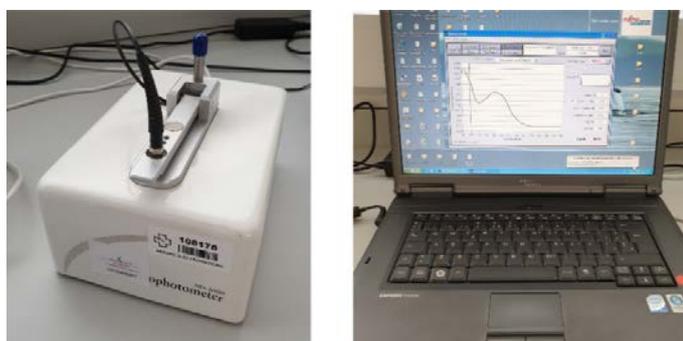


Figura 20. Imagen del Nanodrop ND-1000 en las instalaciones del INIBIC.

El Nanodrop nos proporciona la concentración en ng/μL de ARN que tenemos en nuestras muestras. Además, la absorbancia (A) medida a 260 nm y a 280 nm nos da información sobre la pureza de los ácidos nucleicos y sobre el contenido en proteínas respectivamente. La pureza se estima utilizando la relación $A_{280/260}$ y debe ser aproximadamente 1,8 para el ADN y 2 para el ARN. El ratio $A_{260/230}$ nos da información útil sobre la contaminación con alcoholes que hayan podido quedar a consecuencia de la extracción con fenol o por un insuficiente tiempo de secado en los pasos previos.

3.2.3.- Obtención de ADN complementario mediante retrotranscripción (RT-PCR)

Después de extraer y cuantificar el ARN es conveniente retrotranscribirlo a ADN complementario (ADNc) ya que el ADNc es más estable y fácil de conservar que el ARN.

Mantuvimos las muestras de ARN en hielo y rotulamos los tubos de microcentrífuga de 200 μL donde se preparó la mezcla de reacción para la RT-PCR con los siguientes elementos:

- Muestra (volumen necesario para tomar 500 ng de ARN).
- Kit de retrotranscripción *First-Strand cDNA Synthesis* (NZYTech).
 - NZYRT *Master Mix*: contiene los cebadores, el $MgCl_2$ y los dNTP (desoxinucleótidos trifosfato).
 - NZYRT *Enzyme Mix*: contiene la enzima transcriptasa inversa.
 - Agua libre de ribonucleasas.
 - Ribonucleasa H: contiene esta enzima procedente de *Escherichia coli*.



Figura 21. Kit de retrotranscripción *First-Strand cDNA Synthesis* (NZYTech).

Los diferentes reactivos se añadieron en el orden y volumen que se indica en la **Tabla II**, con los tubos de microcentrifuga colocados en una plataforma fría.

Tabla II. Volúmenes de reactivos y orden en el que se utilizan para realizar la retrotranscripción.

Orden	Reactivo	Volumen por reacción
1°	Agua libre de RNasas	Hasta 20 μ L
2°	Muestra	X μ L (500 ng ARN)
3°	NZYRT <i>Master Mix</i>	10 μ L
4°	NZYRT <i>Enzyme Mix</i>	2 μ L
5°	RNasa H	1 μ L

Se colocaron los tubos en el termociclador Applied Biosystems™ Veriti™ de 96 pocillos y se programaron los ciclos de tiempo y temperatura que se muestran en la **Figura 22**.

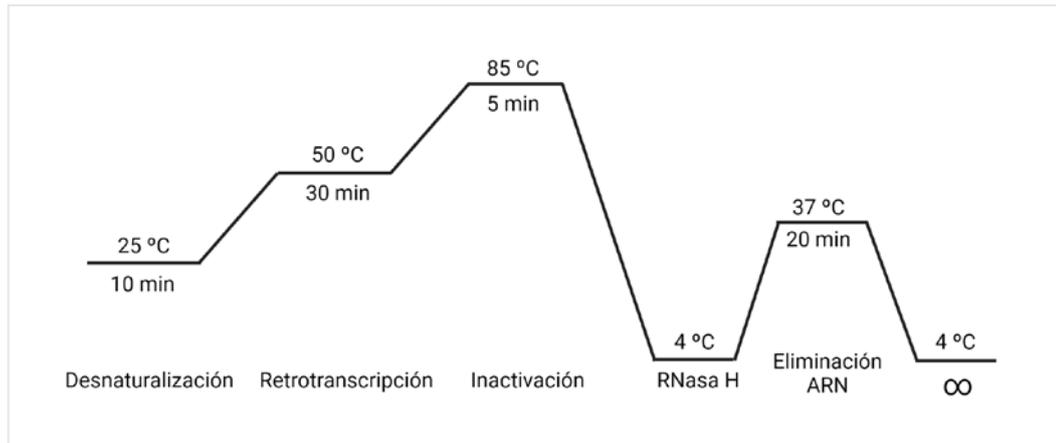


Figura 22. Ciclos de temperatura y tiempo utilizados en la retrotranscripción.

Después de los primeros 45 minutos, se disminuyó la temperatura a 4°C y en ese punto se añadió la RNasa H que permitió eliminar cualquier resto de ARN que pudiese quedar después de la retrotranscripción.

Finalizados todos los ciclos, el ADNc se diluyó 1:10 hasta completar un volumen de 200 µL y las muestras se conservaron a 4°C hasta realizar la qPCR.

3.2.4.- Cuantificación de la expresión génica por qPCR con sondas Taqman®

Los niveles de expresión de los genes de interés se cuantificaron en el termociclador LightCycler® 480 II de Roche utilizando sondas fluorescentes TaqMan® MGB (*minor groove binder*).

Los reactivos que se utilizaron para llevar a cabo la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR) se colocaron en hielo y se detallan a continuación:

- Reactivo preformulado específico para la diana de estudio, que en nuestro caso son los genes *PINK1*, *PARKIN* con el fluorocromo FAM (520 nm) de Applied Biosystems™ (Ref#4331182).
- Cebador directo *h36B4_592F* y cebador indirecto *h36B4_658R* del gen de referencia ribosomal *36B4* de IDT Technologies

(h36B4_592F 5'CCACGCTGCTGAACATGC3'; h36B4 658R5'TCGAACACCTGCTGGATGAC3')

- Sonda para el gen de referencia 36B4 con el fluorocromo VIC™ de Life Technologies (550 nm) (h36B4_VIC VIC-AACATCTCCCCCTTCTCCTTTGGGCT-TAMRA).
- TaqMan™ *Fast Advanced Master Mix* de Applied Biosystems (Ref#4444554) contiene la ADN polimerasa (AmpliAq™*Fast*), la Uracil-N-glucosilasa (UNG) para evitar contaminaciones, los dNTP, 2'-desoxiuridín 5'-trifosfato (dUTP), colorante ROX™ y tampón optimizado.

Todos los reactivos se mezclan en un tubo de microcentrífuga para cada gen de estudio, en el orden y volúmenes que aparecen en la **Tabla III**.

Tabla III. Reactivos utilizados en la qPCR y orden en el que se añaden a los tubos de microcentrífuga.

Orden	Reactivo	Volumen por reacción
1°	Agua libre de ribonucleasas	3.28 µL
2°	TaqMan™ <i>Fast Advanced Master Mix</i>	5 µL
3°	Sondas para el gen de estudio	0.5 µL
4°	Sondas para el gen de referencia	0.02 µL
5°	Cebadores para el gen de referencia	0.2 µL

Tomamos 9 µL de cada tubo preparado en el paso anterior y lo cargamos en la placa de 96 pocillos de BioRad que colocamos previamente sobre una plataforma de frío. Para el estudio de cada gen generamos duplicados en las placas de 96 pocillos, es decir, cargamos 24 pocillos y dos blancos. A continuación, añadimos 1 µL de cada muestra de ADNc a sus correspondientes pocillos, exceptuando los blancos que llevan 1 µL de agua libre de ribonucleasas.

Por lo tanto, obtuvimos un volumen total de 10 μ L en cada pocillo. Una vez que cargamos todos los pocillos en función de los genes que estábamos estudiando, sellamos la placa con una lámina transparente y la centrifugamos a 2000 rpm durante dos minutos para que todos los componentes se dirijiesen al fondo de los pocillos. Además, protegimos la placa de la luz con papel de aluminio para evitar la degradación de los fluorocromos.

A continuación, se introdujo la muestra en el termociclador LightCycler® 480 II de Roche y se programaron los ciclos de tiempos y temperaturas que aparecen en la **Figura 23** para proceder a la cuantificación de la fluorescencia emitida en la fase de elongación.

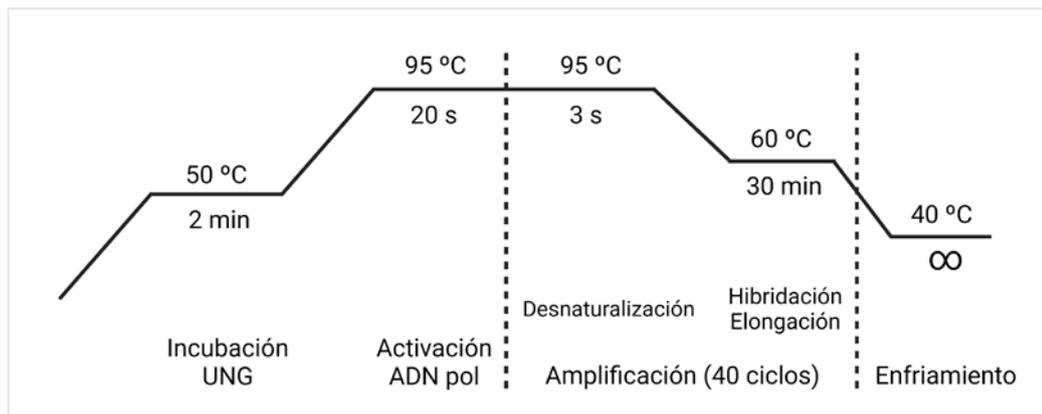


Figura 23. Ciclos de temperatura y tiempo para la qPCR programada en el LightCycler 480 II.

El empleo de sondas TaqMan® MGB nos permite cuantificar los amplicones generados durante los ciclos de PCR gracias a la emisión de la fluorescencia. Como se puede observar en la **Figura 24**, estas sondas contienen un fluoróforo en el extremo 5' que puede tratarse de FAM™ (6-carboxifluoresceína) o VIC™ y un apantallador no fluorescente (NFQ™) en el extremo 3'.

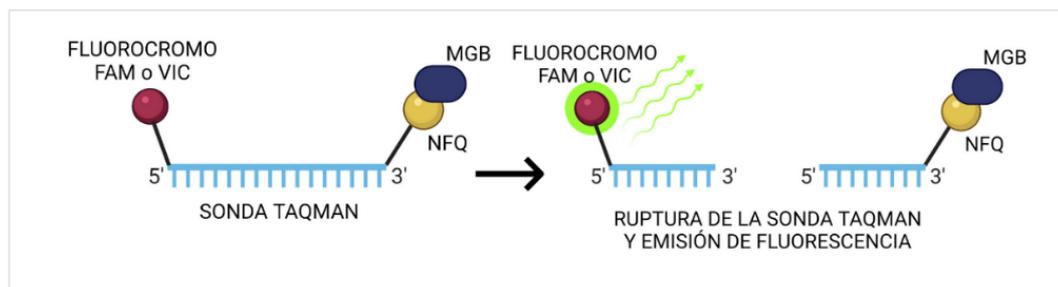


Figura 24. Representación gráfica de las sondas TaqMan® MGB que emiten fluorescencia medible al separarse el fluoróforo (FAM™ o VIC™) del apantallador (NFQ™). FAM (6-carboxifluoresceína). Figura realizada con <https://biorender.com>.

Una vez finalizados los ciclos de qPCR analizamos los valores de Ct (ciclo umbral) que representan el momento en el cual la intensidad de fluorescencia se eleva por encima del ruido de fondo en la fase exponencial de la reacción de PCR. El valor de Ct es inversamente proporcional a la concentración de ADN de la muestra.

Para el análisis de los datos de Ct se utilizó el programa informático Qbase+ de Biogazelle que transforma los datos de texto procedentes del termociclador en archivos Excel, permitiendo comparar los resultados de la expresión de los genes de estudio con los resultados del gen de referencia. Para el análisis estadístico y gráfico de los datos se utilizó el programa GraphPad Prism 9.

3.3.- ESTUDIO DEL POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL

Para el estudio de la función mitocondrial utilizamos la citometría de flujo.

Antes de comenzar a estimular las células sembradas en placas de doce pocillos, cambiamos el medio DMEM10, donde se habían sembrado inicialmente durante 24 horas en la estufa (5% CO₂ y 37°C), por medio de cultivo DMEM2. A continuación, se incubaron con IL-1β y TNFα durante 48 horas y con Fenofibrato (10 μM y 50 μM) durante 24 horas, siguiendo el esquema mostrado en la **Figura 18**.

Se recogió el sobrenadante de cada uno de los doce pocillos y se trasladó a cada tubo de microcentrífuga que habíamos rotulado previamente con las doce condiciones que estábamos estudiando. A cada pocillo con células adheridas le añadimos 250 μ L de tripsina para ayudar a levantarlas, incubándolas durante un minuto a 37 °C.

Al retirar la placa de la estufa le añadimos 250 μ L de DMEM10 a cada pocillo para inactivar la tripsina y seguidamente, raspamos el fondo de los pocillos con un raspador de células. Se recoge el contenido de cada pocillo para pasarlo a su correspondiente tubo donde habíamos introducido anteriormente el sobrenadante.

Se centrifuga el contenido de los tubos a 2500 rpm durante cinco minutos. Al recoger los tubos se puede observar un pequeño precipitado y desechamos el sobrenadante con el máximo cuidado de no tirar el precipitado.

Para este experimento mediante citometría utilizamos un colorante llamado DILC-1 (MitoStep™, Immunostep) que proporcionó información sobre el potencial de membrana de las mitocondrias. Cuando la mitocondria es disfuncional, el potencial de membrana se encuentra disminuido y por lo tanto veremos menos señal procedente de este colorante. El DILC-1 se excita a 633 nm y emite señal a 658nm.

Para preparar el colorante calculamos 5 μ L de DILC-1 por cada una de las 12 muestras y lo colocamos en un tubo protegido de la luz con papel de aluminio para que el colorante no se degrade. Además, añadimos a ese tubo 100 μ L de tampón fosfato salino (PBS) por cada muestra. Una vez preparada esta dilución del colorante, añadimos 100 μ L del DILC-1 diluido a cada tubo que contenía el precipitado e incubamos en la estufa a 37°C durante quince minutos con los tubos abiertos. A continuación, retiramos los tubos de la estufa y les añadimos 200 μ L de PBS, resuspendemos y trasladamos todo el contenido de los tubos de microcentrífuga a unos tubos de citometría, tapándolos para protegerlos de la luz.

El citómetro utilizado fue BD FACSCalibur™ y analizamos con el detector FL4, haciendo pasar hasta 10 000 células.

3.4.- ESTUDIO DE LA PRODUCCIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DEL OXÍGENO MITOCONDRIALES MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO CON MitoSOX®

MitoSOX® es un indicador que emite fluorescencia roja cuando se oxida en presencia de aniones superóxidos ($O_2^{\cdot-}$) mitocondriales en células vivas. Ese producto oxidado es fluorescente y su señal es medible en el citómetro de flujo. Hay una creciente evidencia de la existencia de niveles elevados de especies reactivas de oxígeno, como el superóxido, en enfermedades relacionadas con la edad como la artrosis (28).

En la placa de doce pocillos, con 50 000 células sembradas 24 horas antes, cambiamos el medio DMEM10 por medio de cultivo DMEM2 e incubamos con Fenofibrato durante 24 horas, en la estufa a 37°C, en atmósfera húmeda y 5% de CO_2 , siguiendo el esquema mostrado en la **Figura 25**.

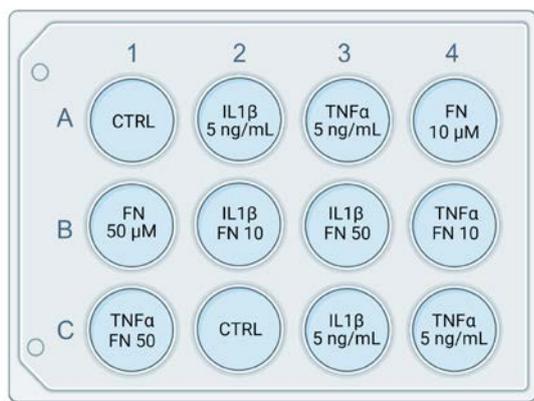


Figura 25. Condiciones de estimulación de las células con IL-1β, TNFα, Fenofibrato 10 μM (FN10) y Fenofibrato 50 μM (FN50) en una placa de 12 pocillos. Los controles (CTRL) no contienen ningún estímulo.

Después de 24 horas con Fenofibrato, estimulamos las células con IL-1β y TNFα durante diez minutos en la estufa (5% CO_2 y 37°C) y durante ese tiempo se preparó la dilución de MitoSOX® y el nuevo medio de incubación

basado en HBSS (*Hanks' Balanced Salt Solution*) sin Ca^{2+} y sin Mg^{2+} de Gibco™ (Ref#24020117).

Cada vial de MitoSOX® contiene 50 µg que deben diluirse en 13 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) para obtener una disolución madre de concentración 5 mM. Tomamos 1.2 µL de MitoSOX® 5 mM y lo mezclamos en un tubo Falcon® con 6 mL de HBSS para preparar el nuevo medio de incubación.

Después de diez minutos, se sacó la placa de la estufa y retiramos el medio de los pocillos con una pipeta Pasteur para sustituirlo por el nuevo medio con MitoSOX® preparado anteriormente (500 µL por pocillo) e incubamos durante treinta minutos en la estufa (37°C y 5% CO_2). A continuación, pasamos el sobrenadante a unos tubos de microcentrifuga y añadimos 250 µL de tripsina 2X a cada pocillo y ponemos la placa en la estufa, a 37°C durante dos minutos, para levantar las células. Para parar la reacción, se utilizaron 250 µL de DMEM10 por cada pocillo y nos ayudamos de un raspador de células y una pipeta Pasteur para pasar todo el contenido de los pocillos a los tubos de microcentrifuga. Limpiamos cada pocillo con 250 µL de suero salino y lo recogimos para añadirlo a los tubos que posteriormente se centrifugaron a 2 500 rpm durante cinco minutos. Se descartó el sobrenadante con cuidado y a continuación, se resuspendió el precipitado para añadir sobre él 300 µL de PBS (tampón fosfato salino) y pasar el contenido a los tubos de citometría, que se mantuvieron en hielo mientras tuvo lugar la citometría de flujo.

El citómetro de flujo utilizado fue el BD FACSCalibur™ con el detector FL2 debido a la fluorescencia roja del MitoSOX® que se excita a 510 nm y emite a 580 nm. Los datos se analizaron utilizando el software BD CellQuest™ Pro.

3.5.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para verificar la distribución normal de los datos, usamos el test de Kolmogorov-Smirnov. En general, el conjunto de datos siguió una

distribución normal. Las diferencias significativas entre dos grupos fueron determinadas por la t-Student, mientras que las diferencias entre múltiples grupos se determinó mediante un análisis de varianza (ANOVA) junto con el test de comparaciones múltiples Tukey. Los datos de los análisis y la inferencia estadística se interpretaron con el software Prism 9.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). Los resultados se representaron según la media \pm SEM. Los p valores menores de 0.05 fueron considerados significativos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1.- EVALUAR EL EFECTO DEL FENOFIBRATO SOBRE LA MITOFAGIA

Para investigar el efecto de la activación de PPAR sobre la mitofagia, analizamos la expresión de los genes *PINK1* y *PARKIN*, ambos implicados en el proceso de mitofagia. Para ello, los condrocitos fueron tratados con las condiciones experimentales mostradas en la **Figura 26** para intentar demostrar el posible efecto del Fenofibrato sobre la expresión de estos dos genes implicados en la mitofagia, tras provocar en las células estrés inflamatorio.

En la **Figura 26** se puede observar un cambio en la morfología de los condrocitos tratados con IL-1 β respecto al control, y una evidente disminución en el número de células en las condiciones experimentales IL-1 β +FN10 e IL-1 β +FN50, lo cual sería compatible con el efecto senolítico que tiene el Fenofibrato solo sobre los condrocitos senescentes. Sin embargo, en los condrocitos tratados (FN10 y FN50), no se aprecia ningún cambio morfológico. Por otro lado, se observó un mayor cambio en la morfología de los condrocitos tratados con IL-1 β que con el TNF α .

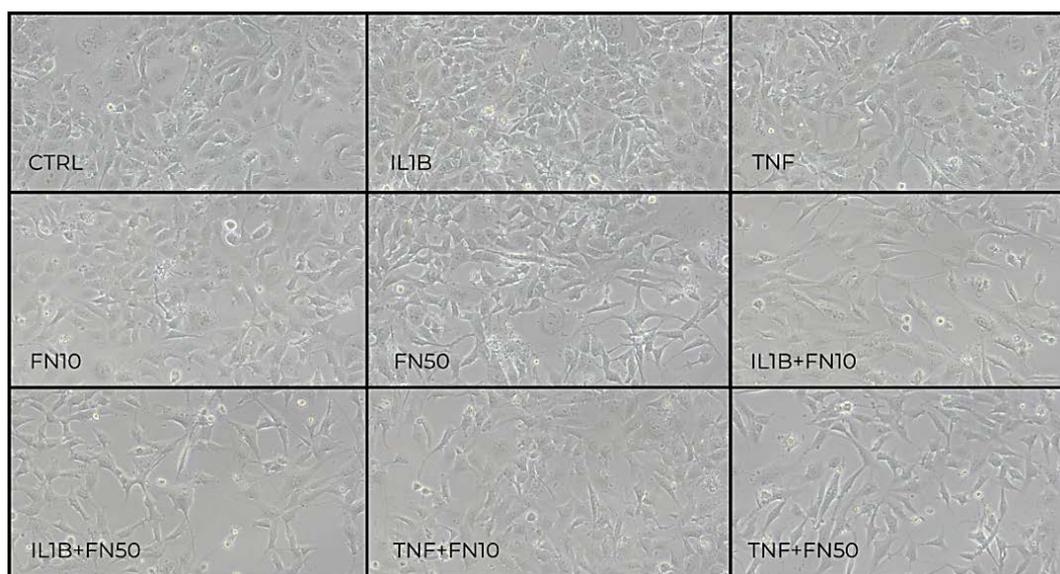


Figura 26. Línea celular TC28a2 tratada con 9 condiciones experimentales diferentes. CTRL: sin tratamientos; IL-1 β 5 ng/mg; TNF 5 ng/mL; FN 10 μ M;

FN 50 μ M; IL-1 β +FN10; IL-1 β +FN50; TNF α +FN10 y TNF α +FN50. Imágenes representativas de 5 experimentos independientes realizadas con un microscopio óptico invertido con un aumento de 10X.

En la **Figura 27** se muestran los datos de los niveles de expresión de *PINK1* normalizados frente al gen de referencia ribosomal *36B4*. En la **Figura 27 A** se muestran los datos referentes a la IL-1 β , en los que observamos que el tratamiento de los condrocitos con IL-1 β , FN10, FN50 y sus combinaciones, no modificó significativamente la expresión de *PINK1*. En la **Figura 27 B**, se muestran los resultados con TNF α y sus combinaciones con el fármaco. Los resultados indicaron que el tratamiento con TNF α y sus combinaciones con Fenofibrato tampoco modularon la expresión de *PINK1*, siendo los resultados del tratamiento con TNF α similares al control. Estos datos confirman que la IL-1 β disminuye parcialmente la expresión de *PINK1*, mientras que el TNF α no parece modificar la expresión de este marcador de mitofagia. Además, la activación de PPAR α con Fenofibrato no regula la expresión de este marcador de mitofagia. Es importante destacar que la variabilidad de los datos fue bastante elevada para tratarse de experimentos con una línea celular y esto podría deberse a los diferentes pases de las líneas celulares empleadas (pases desde SX+55 a SX+22) o bien, al tratamiento que tuvieron que recibir por contaminación por *Mycoplasma* spp. Estos datos deberían de tenerse en cuenta a la hora de analizar los resultados, y sugieren que son necesarios más experimentos para establecer conclusiones.

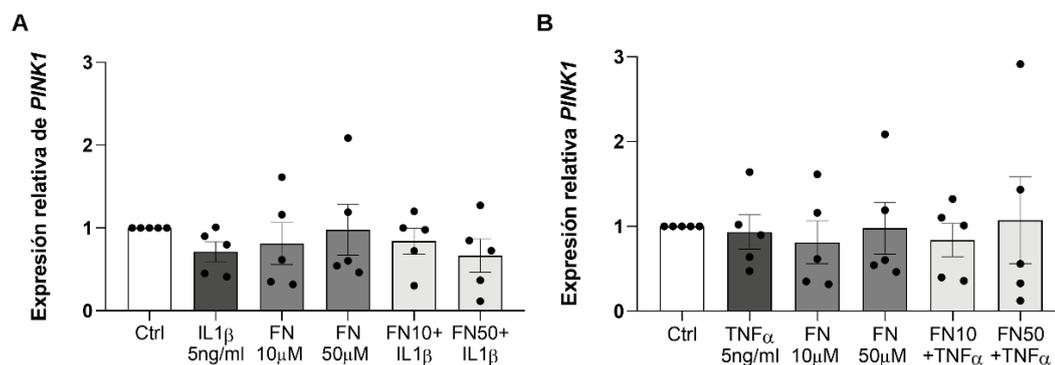


Figura 27. Representaciones gráficas obtenidas con el programa GraphPad Prism, en las cuales se representan los niveles de expresión de *PINK1* normalizados frente al valor del gen de referencia *36B4*. **(A)** Expresión de *PINK1* con IL-1 β (CTRL, IL-1 β 5ng/mL, FN 10 μ M, FN 50 μ M, FN10+IL-1 β y FN50+IL-1 β). **(B)** Expresión de *PINK1* con TNF α (CTRL, TNF α 5 ng/mL, FN 10 μ M, FN 50 μ M, FN10+TNF α y FN50+TNF α). Los resultados se corresponden con la media \pm SEM de cinco experimentos independientes. Se aplicó un análisis de varianza (ANOVA) junto con el test de comparaciones múltiples Tukey.

En la **Figura 28** se muestran los datos de los niveles de expresión de *PARKIN* normalizados frente al gen de referencia ribosomal *36B4*. En la **Figura 28 A** se observa cómo la expresión relativa de *PARKIN* se ve significativamente aumentada con respecto al control en las células tratadas con IL-1 β , lo cual indica que la mitofagia se activa en respuesta al estrés celular provocado por la IL-1 β . Sin embargo, el tratamiento con FN10 disminuyó la activación de *PARKIN* en respuesta a IL-1 β . Estos datos sugieren que la mitofagia, en la que *PARKIN* es un actor fundamental, también puede estar activa para controlar la población de mitocondrias disfuncionales y prevenir el daño inducido por mediadores inflamatorios, y que la activación de PPAR α con FN podría regular, en parte, este proceso. Estos resultados confirman hallazgos anteriores, donde se demostró que el tratamiento con IL-1 β activa la expresión de *PARKIN* en condrocitos en respuesta a los altos niveles de especies reactivas de oxígeno, a la disfunción mitocondrial y a la apoptosis mediada por la IL-1 β (28). En la

Figura 28 B podemos apreciar que el TNF α no modificó la expresión de *PARKIN*, y que el tratamiento con FN tampoco modificó significativamente los niveles de expresión de *PARKIN* en respuesta a TNF α . Estos resultados sugieren que el TNF α podría no ser un buen modelo de enfermedad para el estudio de marcadores de mitofagia en condrocitos.

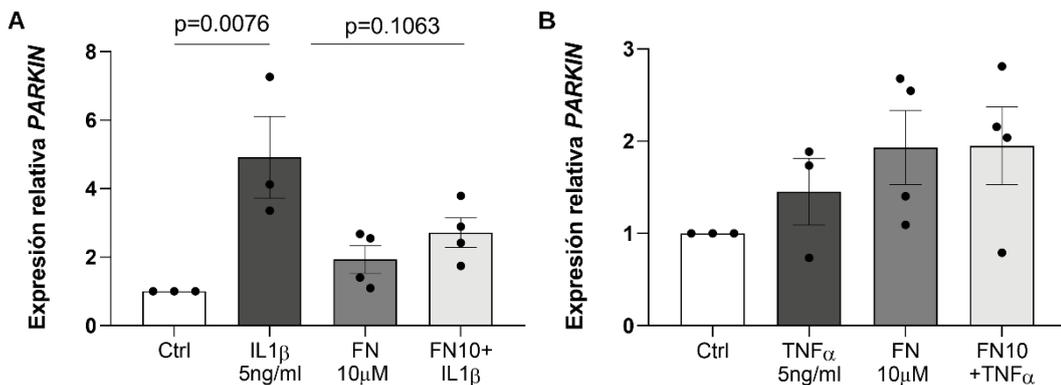


Figura 28. Representaciones gráficas obtenidas con el programa GraphPad Prism, en la cual se representan los niveles de expresión de *PARKIN* normalizados frente al valor del gen de referencia *36B4*. **(A)** Expresión de *PARKIN* con IL-1 β (CTRL, IL-1 β 5ng/mL, FN 10 μ M y FN10+IL-1 β). **(B)** Expresión de *PARKIN* con TNF α (CTRL, TNF α 5 ng/mL, FN 10 μ M, TNF α +FN10). Los resultados se corresponden con la media \pm SEM de tres experimentos independientes. Se aplicó un análisis de varianza (ANOVA) junto con el test de comparaciones múltiples Tukey.

4.2.- ANALIZAR EL EFECTO DEL FENOFIBRATO SOBRE EL POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL

Debido a que los condrocitos artrósicos presentan una disminución en el potencial de membrana mitocondrial, quisimos investigar el papel del FN sobre la función mitocondrial.

La **Figura 29** indica que la IL-1 β disminuyó significativamente el potencial de membrana mitocondrial con respecto al control. Sin embargo, se observó que el tratamiento con FN a 10 y 50 μ M aumentó el potencial de membrana mitocondrial en respuesta a IL-1 β . Estos datos sugieren que el

FN protege del daño mitocondrial en respuesta a mediadores catabólicos presentes en la enfermedad artrósica, como la IL-1 β .

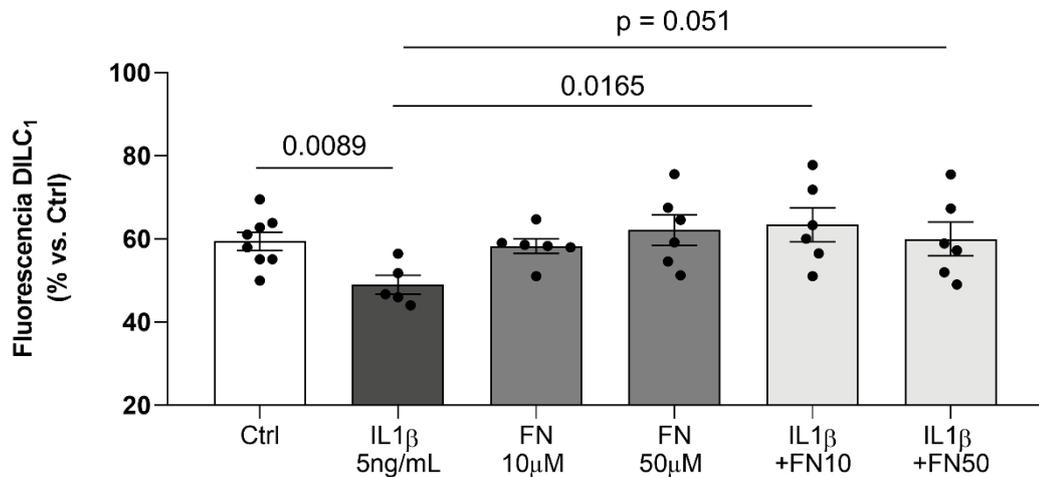


Figura 29. Representación gráfica obtenida con GraphPad Prism donde se representa el porcentaje de fluorescencia de DILC-1 (normalizado frente al control), CTRL, IL-1 β 5ng/mL, FN 10 μ M, FN 50 μ M, FN10+IL-1 β y FN50+IL-1 β . Los resultados se corresponden con la media \pm SEM de seis experimentos independientes. Se aplicó un test *t-Student* no pareado y paramétrico.

La **Figura 30** muestra los resultados obtenidos con el TNF α . Los resultados obtenidos indican que el tratamiento con TNF α disminuye significativamente el potencial de membrana mitocondrial. Sin embargo, no se aprecian diferencias significativas en el co-tratamiento con el FN.

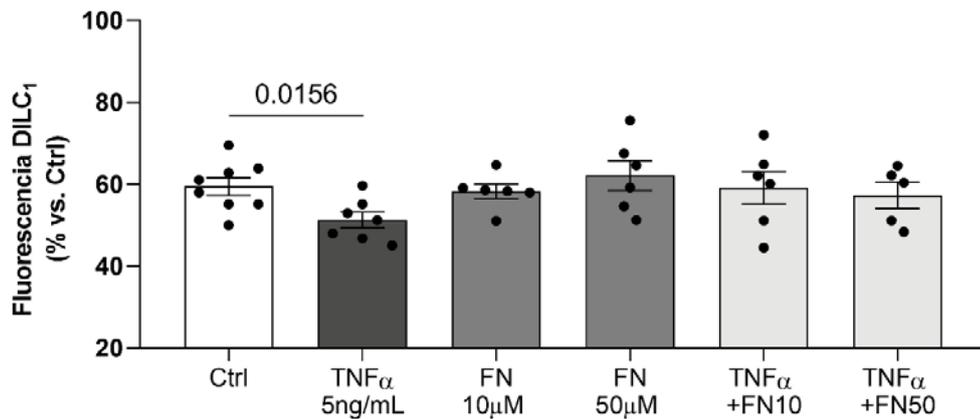


Figura 30. Representación gráfica obtenida con GraphPad Prism donde se representa el porcentaje de fluorescencia de DILC-1 (normalizado frente al control), CTRL, TNF α 5 ng/mL, FN 10 μ M, FN 50 μ M, FN10+TNF α y FN50+TNF α . Los resultados se corresponden con la media \pm SEM de seis experimentos independientes. Se aplicó un test *t-Student* no pareado y paramétrico.

4.3.- ESTUDIAR EL EFECTO DEL FENOFIBRATO SOBRE EL ESTRÉS OXIDATIVO

En este objetivo, evaluamos si la activación de los receptores PPAR α mediante el tratamiento de los condrocitos con Fenofibrato, tiene algún efecto sobre el estrés oxidativo mitocondrial. Para ello, cuantificamos la producción del anión superóxido presente, empleando la sonda fluorescente MitoSOX[®].

En la **Figura 31** se representan los resultados del porcentaje de fluorescencia emitido por MitoSOX[®] cuando es oxidado por la presencia de superóxido. Podemos observar que la IL-1 β aumenta significativamente la producción de especies reactivas de oxígeno mitocondriales (ROS), generando un aumento del estrés oxidativo en los condrocitos. Sin embargo, el tratamiento con FN 10 μ M, disminuyó ligeramente este aumento de ROS en respuesta a IL-1 β , mientras que con el tratamiento con FN 50 μ M no se observó ningún cambio.

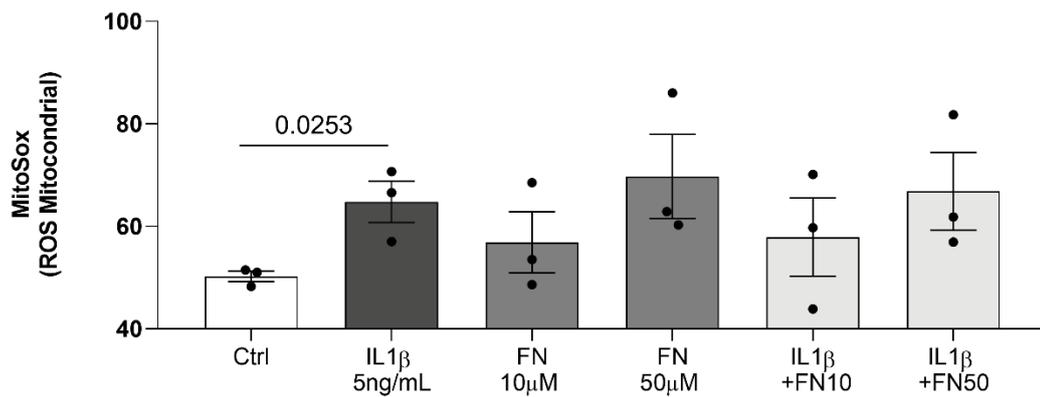


Figura 31. Representación gráfica obtenida con GraphPad Prism donde se representa el porcentaje de fluorescencia de MitoSOX® (normalizado frente al control), CTRL, IL-1β 5ng/mL, FN 10 μM, FN 50 μM, FN10+IL-1β y FN50+IL-1β. Los resultados se corresponden con la media ± SEM de tres experimentos independientes. Se aplicó un test *t-Student* no pareado y paramétrico.

En base a los resultados que se reflejan en la **Figura 32** podemos concluir, que el tratamiento con TNFα no parece ser un buen indicador de estrés oxidativo ya que no se observó ningún cambio en la producción de ROS, ni en el co-tratamiento con FN.

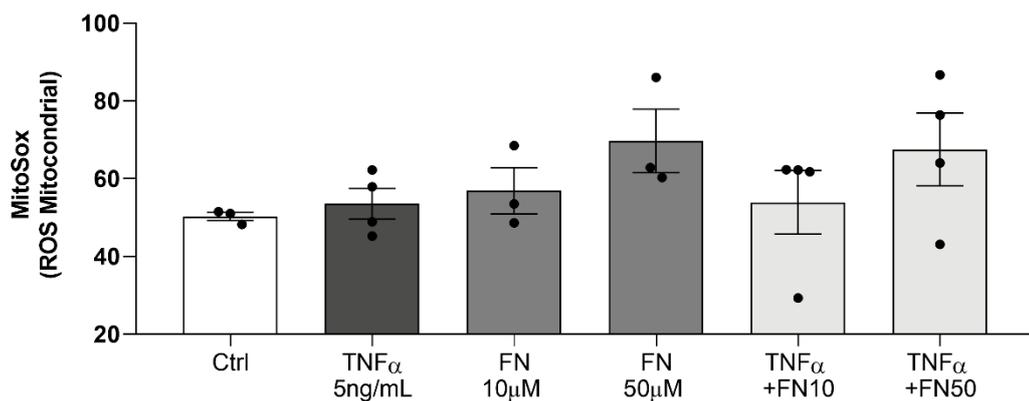


Figura 32. Representación gráfica obtenida con GraphPad Prism donde se representa el porcentaje de fluorescencia de MitoSOX® (normalizado frente al control), CTRL, TNFα 5 ng/mL, FN 10 μM, FN 50 μM, FN10+TNFα y FN50+TNFα. Los resultados se corresponden con la media ± SEM de tres

experimentos independientes. Se aplicó un test *t-Student* no pareado y paramétrico.

A la vista de estos resultados, creemos que el uso de mediadores catabólicos presentes en la enfermedad artrósica, como la IL-1 β , muestra una utilidad prometedora para estudiar en mayor detalle los mecanismos de mitofagia y de función mitocondrial en condrocitos. Este modelo *in vitro* también resultó de utilidad para evaluar la actividad de moléculas con perfil senolítico y proautofágico, como el Fenofibrato.

En futuros estudios relacionados con mitofagia sería interesante evaluar la expresión de optineurina (*OPTN*) y *NDP52*, ya que se ha descubierto que son esenciales en la mitofagia mediada por *PINK1* y *PARKIN* (30), además de otros marcadores de función mitocondrial que podrían ayudar a investigar en mayor detalle estos mecanismos, además del papel que la activación de PPAR α podría jugar en estos procesos de homeostasis del condrocito.

CONCLUSIONES

5.- CONCLUSIONES

A la vista de los resultados obtenidos a lo largo de este estudio podemos concluir lo expuesto a continuación:

1. Evaluar el efecto del Fenofibrato sobre la mitofagia.

- La activación de los receptores PPAR α por parte del Fenofibrato parece no afectar significativamente a la expresión del gen *PINK1* en respuesta a IL-1 β y TNF α .
- El tratamiento con Fenofibrato 10 μ M disminuyó, en parte, la expresión de *PARKIN* mediada por IL-1 β .
- El tratamiento con TNF α parece no ser un buen modelo para el estudio de la mitofagia.

2. Determinar el efecto del Fenofibrato sobre la función mitocondrial.

2.1 Analizar el efecto del Fenofibrato sobre el potencial de membrana mitocondrial.

- La IL-1 β y el TNF α disminuyeron el potencial de membrana mitocondrial.
- El tratamiento con Fenofibrato 10 μ M protegió de la pérdida de potencial de membrana mitocondrial en respuesta a IL-1 β .

2.2 Estudiar el efecto del Fenofibrato sobre el estrés oxidativo.

- La IL-1 β provocó un aumento en la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) mitocondriales.
- No se observó un efecto protector por parte del Fenofibrato en respuesta al estrés oxidativo producido por la IL-1 β .

AGRADECIMIENTOS

6.- AGRADECIMIENTOS

Quisiera expresar mi agradecimiento a todas las personas que han colaborado en la realización de este trabajo, llevado a cabo en el Grupo de Biología del Cartílago del INIBIC. En especial quiero agradecerle a la Dra. Beatriz Caramés Pérez por permitirme permanecer en su grupo durante estos meses, por haber sabido transmitirme su pasión por la ciencia y, sobre todo, por darme su apoyo y confianza para que este trabajo saliera adelante. A Irene Lorenzo Gómez, le estoy muy agradecida por su amabilidad y ayuda siempre que se la he pedido. Y a la Dra. Uxía Nogueira agradecerle su tiempo invertido en mi formación.

También quiero agradecer a la Dra. María del Carmen de Andrés González y a todo su equipo, su amabilidad, su profesionalidad y que con su alegría hacen que el trabajo diario sea mucho más agradable.

BIBLIOGRAFÍA

7.- BIBLIOGRAFÍA

1. Mandl LA. Osteoarthritis year in review 2018: clinical. *Osteoarthritis Cartilage*. 2019;(3):359-364. [doi: 10.1016/j.joca.2018.11.001](https://doi.org/10.1016/j.joca.2018.11.001). PMID: 30453055.
2. Tornero J, Blanco F. *Tratado de enfermedades reumáticas de la SER*. Madrid:Editorial Médica Panamericana; 2018.
3. Nogueira-Recalde U, Lorenzo-Gómez I, Blanco FJ, Loza MI, Grassi D, Shirinsky V, *et al*. Fibrates as drugs with senolytic and autophagic activity for osteoarthritis therapy. *EBioMedicine*. 2019;45:588-605. [doi: 10.1016/j.ebiom.2019.06.049](https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2019.06.049). PMID: 31285188.
4. Martel-Pelletier J, Boileau C, Pelletier JP, Roughley PJ. Cartilage in normal and osteoarthritis conditions. *Best Pract Res Clin Rheumatol*. 2008;22(2):351-84. [doi: 10.1016/j.berh.2008.02.001](https://doi.org/10.1016/j.berh.2008.02.001). PMID: 18455690.
5. Lotz MK, Caramés B. Autophagy and cartilage homeostasis mechanisms in joint health, aging and OA. *Nat Rev Rheumatol*. 2011;7(10):579-87. [doi: 10.1038/nrrheum.2011.109](https://doi.org/10.1038/nrrheum.2011.109). PMID: 21808292
6. CGCOF. *Catálogo de medicamentos 2020*. Madrid:Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos; 2020.
7. Mirza AZ, Althagafi II, Shamshad H. Role of PPAR receptor in different diseases and their ligands: Physiological importance and clinical implications. *Eur J Med Chem*. 2019;166:502-513. [doi: 10.1016/j.ejmech.2019.01.067](https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.01.067). PMID: 30739829.
8. Vázquez, M. Laguna J. Receptores activados por proliferadores peroxisómicos (PPAR), metabolismo energético y aterosclerosis. *Endocrinol nutr*. 2000;47(10):301–10.

9. Boitier E, Gautier JC, Roberts R. Advances in understanding the regulation of apoptosis and mitosis by peroxisome-proliferator activated receptors in pre-clinical models: relevance for human health and disease. *Comp Hepatol*. 2003;2(1):3. [doi: 10.1186/1476-5926-2-3](https://doi.org/10.1186/1476-5926-2-3). PMID: 12622871.
10. Nogueira-Recalde U. Identificación de moléculas reguladoras del envejecimiento articular para el tratamiento de la artrosis. [Tesis doctoral]. A Coruña: 2019. Disponible en : <http://hdl.handle.net/2183/24471>
11. Rigano D, Sirignano C, Taglialatela-Scafati O. The potential of natural products for targeting PPAR α . *Acta Pharm Sin B*. 2017;7(4):427-438. [doi: 10.1016/j.apsb.2017.05.005](https://doi.org/10.1016/j.apsb.2017.05.005). PMID: 28752027.
12. Nakatogawa H. Mechanisms governing autophagosome biogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2020;21(8):439-458. [doi: 10.1038/s41580-020-0241-0](https://doi.org/10.1038/s41580-020-0241-0). PMID: 32372019.
13. Youle RJ, Narendra DP. Mechanisms of mitophagy. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2011;12(1):9-14. [doi: 10.1038/nrm3028](https://doi.org/10.1038/nrm3028). PMID: 21179058.
14. Soto-Gamez A, Demaria M. Therapeutic interventions for aging: the case of cellular senescence. *Drug Discov Today*. 2017;22(5):786-795. [doi: 10.1016/j.drudis.2017.01.004](https://doi.org/10.1016/j.drudis.2017.01.004). PMID: 28111332.
15. Loeser RF, Collins JA, Diekman BO. Ageing and the pathogenesis of osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol*. 2016;12(7):412–20. [doi: 10.1038/nrrheum.2016.65](https://doi.org/10.1038/nrrheum.2016.65). PMID: 27192932.
16. Coryell PR, Diekman BO, Loeser RF. Mechanisms and therapeutic implications of cellular senescence in osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol*. 2021;17(1):47-57. [doi: 10.1038/s41584-020-00533-7](https://doi.org/10.1038/s41584-020-00533-7). PMID: 33208917.
17. Hernandez-Segura A, Nehme J, Demaria M. Hallmarks of Cellular Senescence. *Trends Cell Biol*. 2018;28(6):436-453. [doi:](https://doi.org/)

[10.1016/j.tcb.2018.02.001](https://doi.org/10.1016/j.tcb.2018.02.001).

18. López-Otín C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G. The hallmarks of aging. *Cell*. 2013;153(6):1194-217. doi: [10.1016/j.cell.2013.05.039](https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.05.039). PMID: 29477613.
19. Blanco FJ, López-Armada MJ, Maneiro E. Mitochondrial dysfunction in osteoarthritis. *Mitochondrion*. 2004;4(5-6):715-28. doi: [10.1016/j.mito.2004.07.022](https://doi.org/10.1016/j.mito.2004.07.022). PMID: 16120427.
20. Truban D, Hou X, Caulfield TR, Fiesel FC, Springer W. *PINK1*, Parkin, and Mitochondrial Quality Control: What can we learn about Parkinson's disease pathobiology? *J Parkinsons Dis*. 2017;7(1):13-29. doi: [10.3233/JPD-160989](https://doi.org/10.3233/JPD-160989). PMID: 27911343.
21. Matsuda N. Phospho-ubiquitin: upending the PINK-Parkin-ubiquitin cascade. *J Biochem*. 2016;159(4):379-85. doi: [10.1093/jb/mvv125](https://doi.org/10.1093/jb/mvv125). PMID: 26839319.
22. Luo R, Su LY, Li G, Yang J, Liu Q, Yang LX, *et al*. Activation of PPARA-mediated autophagy reduces Alzheimer disease-like pathology and cognitive decline in a murine model. *Autophagy*. 2020;16(1):52-69. doi: [10.1080/15548627.2019.1596488](https://doi.org/10.1080/15548627.2019.1596488). PMID: 30898012.
23. Hamacher-Brady A, Brady NR. Mitophagy programs: mechanisms and physiological implications of mitochondrial targeting by autophagy. *Cell Mol Life Sci*. 2016;73(4):775-95. doi: [10.1007/s00018-015-2087-8](https://doi.org/10.1007/s00018-015-2087-8). PMID: 26611876.
24. Scott JL, Gabrielides C, Davidson RK, Swingler TE, Clark IM, Wallis GA, *et al*. Superoxide dismutase downregulation in osteoarthritis progression and end-stage disease. *Ann Rheum Dis*. 2010;69(8):1502-10. doi: [10.1136/ard.2009.119966](https://doi.org/10.1136/ard.2009.119966). PMID: 26611876.
25. Regan E, Flannelly J, Bowler R, Tran K, Nicks M, Carbone BD, *et al*.

- Extracellular superoxide dismutase and oxidant damage in osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 2005;52(11):3479-91. [doi: 10.1002/art.21387](https://doi.org/10.1002/art.21387). PMID: 16255039.
26. Rhee SG, Woo HA, Kang D. The Role of Peroxiredoxins in the Transduction of H₂O₂ Signals. *Antioxid Redox Signal.* 2018;28(7):537-557. [doi: 10.1089/ars.2017.7167](https://doi.org/10.1089/ars.2017.7167). PMID: 28587524.
27. Goldring MB, Birkhead JR, Suen LF, Yamin R, Mizuno S, Glowacki J, *et al.* Interleukin-1 beta-modulated gene expression in immortalized human chondrocytes. *J Clin Invest.* 1994;94(6):2307-16. [doi: 10.1172/JCI117595](https://doi.org/10.1172/JCI117595). PMID: 7989586.
28. Ansari MY, Khan NM, Ahmad I, Haqqi TM. *PARKIN* clearance of dysfunctional mitochondria regulates ROS levels and increases survival of human chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage.* 2018;26(8):1087-1097. [doi: 10.1016/j.joca.2017.07.020](https://doi.org/10.1016/j.joca.2017.07.020). PMID: 28801211.
29. Yun MH, Davaapil H, Brookes JP. Recurrent turnover of senescent cells during regeneration of a complex structure. *Elife.* 2015;4:e05505. [doi: 10.7554/eLife.05505](https://doi.org/10.7554/eLife.05505). PMID: 25942455.
30. Lazarou M, Sliter DA, Kane LA, Sarraf SA, Wang C, Burman JL, *et al.* The ubiquitin kinase *PINK1* recruits autophagy receptors to induce mitophagy. *Nature.* 2015;524(7565):309-314. [doi: 10.1038/nature14893](https://doi.org/10.1038/nature14893). PMID: 26266977.

ANEXOS

ANEXO I

RESULTADOS PREVIOS QUE AVALAN LA VIABILIDAD DEL PROYECTO

Nuestros datos preliminares establecen una fuerte evidencia preclínica que podría llevar al desarrollo de nuevas terapias que modifican la enfermedad dirigidas al metabolismo lipídico para prevenir y tratar la artrosis (OA). Estos datos se obtuvieron a través del “Proyecto de Investigación en Salud del ISCIII, AES 2014 concedido a la Dra. Beatriz Caramés Pérez para identificar nuevas moléculas para el tratamiento del envejecimiento articular y la OA. Los resultados de este proyecto fueron publicados en la revista *EBioMedicine* publicada por *The Lancet* (Nogueira-Recalde *et al.* Fibrates as drugs with senolytic and autophagic activity for osteoarthritis therapy. *EBioMedicine*. 2019; 45: 588-605).

Los resultados de este Trabajo Fin de Máster han sido financiados por el Proyecto de Investigación en Salud, AES 2020 concedido a la Dra. Beatriz Caramés Pérez para estudiar el efecto de los agonistas de PPAR α como tratamiento modificador de la enfermedad para la artrosis.