

# Estudio de la activación de mecanismos de muerte celular programada inducida por el uso de resveratrol en un modelo de artritis inducida por antígeno (AIA)

Jennifer Adriana Fernández Rodríguez

---

Tesis doctoral

2022

Directora: María José López Armada

Programa de Doctorado en Ciencias de la Salud







*A María de Cambre*

*A mis padres*

*A mi hermano*

*A Alicia*



## AGRADECIMIENTOS

Carrera de fondo. Así podría definir esta etapa de mi vida. Larga y con alguna que otra dificultad pero, a fin de cuentas, muy enriquecedora. Ya que este camino no lo he hecho sola, ahora que me encuentro dando el último esprint y como no podía ser de otra forma, es el momento de agradecer a todas aquellas personas que me han acompañado a lo largo del recorrido, me han apoyado y han contribuido a que finalmente pueda llegar a la línea de meta.

Quiero comenzar agradeciéndole a mi directora de tesis, María, la confianza que depositó en mí desde un principio. Nunca me olvidaré de todas las veces que me repitió que “la experiencia es un grado”. Gracias por acogerme e iniciarme en el mundo de la investigación.

Quiero agradecer también a Víctor Bautista la oportunidad que me ha brindado; sin olvidarme de su equipo, en especial de Fran y Comendador.

A mis “inflamados”. A Oly. Me asusta que sepas lo que pienso todo el rato. Has sido mi mejor cómplice y si tuviera que destacar algo que hayamos aprendido juntas sería esto: NO. A Maylin, porque nos trasladaste lo mejor de México a nuestro pequeño laboratorio. Gracias por tu paciencia, tu empeño y tu forma de vivir la investigación. A Mirian. Nos has traído aire fresco, una risa la mar de contagiosa y muchos “zascas”; ahora eres la siguiente, te cedo el testigo. A Laura. No sabes lo muchísimo que aprendí convirtiéndome en tu sombra. A todos los que formaron parte de nuestro grupo y dejaron huella, en especial Sergio, Gonzalo y Rocío.

A las integrantes de “Gordura Máxima”. A Isa, mi Cabuxiña. Has ejercido de madre postiza y lo cierto es que has dado “el pego” (y las collejas). A Belén. Eres la empatía personificada. Gracias por saber siempre cuándo, cómo y qué decir. A Bea, Mailof, capaz de alegrarme los días grises con ese punto de vista tan tuyo que pone todo “patas parriba” y a Esther, que tantas y tantas veces nos contagiaste tu alegría murciana.

A Charlie, porque nadie reconoce una sinovial “jugosa, jugosa” como tú. Gracias por tener siempre un consejo que ofrecer. A Sara P. Contagias el buen rollo allá donde estes y en mi caso, las ganas de vivir la vida. A Juanita. Gracias por poner tu nota de humor a mis dramas, siempre tendrás un hueco en mi mesa presidencial; y también a su pupila Rocío, que tienes ese “*je ne sais quoi*” que a mí me deja absorta. A Tammy. Entre rata y

rata nos fuimos descubriendo y aunque somos tan opuestas como el sol y la luna (guiño), algo tenemos en común: las dos sabemos que no puedes vivir sin mí. Eres mi imprescindible. A Andrés, por sacarme muchas sonrisas.

A mis vecinos. A Sara (¡¡SAAARAAAAA!!). Eres incansable. Gracias por estar siempre dispuesta a arrimar el hombro. A Mery, por tener siempre algo que aportar y ponerle a todo un filtro de optimismo. A Durán, tu habilidad para sacarme de los quicios está depuradísima y aun así, me gusta tenerte cerca. A Paula, que me has tenido que aguantar colonizando poco a poco tu sitio durante muchos años. Al recién incorporado Jorge. A Andrea, a Estefa y por supuestísimo, Nacho.

A Bea, Uxía, May, Marga y Carmen. ¡Gracias por estar siempre dispuestas a ayudar, qué riquiñas sois! También quiero agradecerle a Irene ser una persona tan bonita y un apoyo incondicional. A todo el grupo de PEM. A Andrea DD, Alba y Dani, que se os echa mucho de menos por estos lares. A Andrea R, Maca y Lorena, porque sois encantadoras. A Gloria, que arrasas por donde pasas.

A las proteómicas. Lu, Rocío, las Patris, Bea y Valen. ¡Sois un grupazo! Estoy deseando poder compartir de nuevo otro karaoke con vosotras. A las chicas y chicos cardio. Pilarica, Paula y mis compañeros de campana, Luis y especialmente Ricardo, que para mi fortuna siempre está disponible, para debatirlo absolutamente todo. A todo el grupo de CellCom. Especialmente a Gus, mi mejor descubrimiento; y gracias a todos los integrantes del grupo de Microbiología. A María Moreno. Gracias por tus terribles correos, todos sabemos que algo que empieza por “Estimados investigadores...” nunca acaba bien. También quiero agradecerles a todos los miembros del equipo del Centro Tecnológico de Formación. Valentina, Estefanía, Guti, Patricia, María y Alberto. A mi Edu y en especial, a Sofía. Gracias por ponerme todas las facilidades del mundo cuando encadenaba un modelo animal con otro

A mis amigas. Sois un apoyo incondicional. Gracias por estar ahí en las buenas y en las malas, y por haberme acompañado en toda esta aventura.

A mis padres. Gracias por recordarme cada día que no hay nada que no se consiga con esfuerzo. Sois la definición de sacrificio y ojalá algún día pueda llegar a ser una milésima parte de lo que vosotros sois para mí. A Charly, porque si algo puedo decir es que eres uno de mis grandes apoyos y estoy muy orgullosa de ti. A Alicia. Mi otra hermana. Gracias por hacer simples las cosas complejas.





## RESUMEN

La artritis reumatoide (AR) es una de las enfermedades crónicas e inflamatorias más comunes del sistema musculoesquelético, capaz de producir un daño articular a largo plazo asociado con dolor severo, incapacitación funcional progresiva e incluso, la muerte temprana; además de los elevados costes socioeconómicos que ésta supone. Aunque la AR muestra con frecuencia una afectación sistémica, su principal diana son las articulaciones sinoviales. Así, la membrana sinovial hiperplásica es uno de sus principales rasgos patológicos, y se asocia tanto con la infiltración y retención local de células inmunes inflamatorias como con la activación y proliferación desmesurada de las células residentes de la sinovial. En relación a su tratamiento, los fármacos actuales presentan numerosas limitaciones, razón por la cual, en los últimos años, está suscitando gran interés el posible potencial terapéutico de los productos naturales frente a esta enfermedad. En esta línea, el presente trabajo tuvo por objetivo profundizar en el efecto profiláctico de un compuesto de origen natural, como es el resveratrol, en la AR, empleando para ello, un modelo animal en ratas de artritis inducida por antígeno (AIA).

Para evaluar el efecto del resveratrol en el estudio *in vivo*, éste fue administrado oralmente durante los dos meses previos a la inducción de la artritis y continuando hasta el día del sacrificio, dos días después de la inducción, correspondiéndose con la fase aguda de la enfermedad. En primer lugar, se observó como el tratamiento con resveratrol fue capaz de contrarrestar los parámetros cardinales de la patología artrítica (proliferación de la capa íntima, infiltrado celular inmune y celularidad) en el tejido sinovial. Sumado a ello, se evaluó cómo la posible implicación de dos de los mecanismos de muerte celular de mayor relevancia, la muerte celular de tipo I o apoptosis y/o la muerte celular de tipo II o autofagia, podría ejercer un papel fundamental en el control de la proliferación celular desmedida del tejido sinovial de la articulación artrítica. Para ello, se analizó mediante técnicas inmunohistoquímicas la expresión sinovial de los marcadores caspasa-3 activa y su sustrato PARP como intermediarios del proceso apoptótico y LC3, p62 y beclin-1 como mediadores del proceso autofágico; evidenciándose como el resveratrol es capaz de regular el equilibrio entre la autofagia y la apoptosis, dirigiéndolo hacia la autofagia y potenciando, más concretamente, la vía no canónica de la autofagia.

Así mismo, cada vez son más las evidencias que apuntan a que un fallo en la autofagia podría modular la actividad inflamatoria, favoreciendo de este modo el desarrollo de

múltiples enfermedades inflamatorias y autoinmunes, como es la AR. De este modo, se evaluó mediante inmunoensayos la concentración sérica de tres importantes mediadores de la inflamación a nivel sistémico, con gran relevancia clínica: la interleuquina (IL)-1 $\beta$ , la prostaglandina (PG)E<sub>2</sub> y la proteína C reactiva (CRP). Los resultados obtenidos mostraron como aquellos animales a los que se les administró el resveratrol de forma profiláctica presentaban unos niveles reducidos de estos marcadores; y del mismo modo, al llevar a cabo el análisis de correlación entre los niveles de éstos y la expresión sinovial de p62, se obtuvo en todos los casos una fuerte correlación positiva, evidenciando la importante relación que mantiene la autofagia con el proceso inflamatorio.

Por último, se evaluó la expresión sinovial del factor de transcripción p65-NF- $\kappa$ B, clave en la regulación de la inflamación, y también de los marcadores VEGF y Ang-1, involucrados en el proceso de angiogénesis, lo que contribuyó a obtener una visión más amplia de las potenciales propiedades antiinflamatorias que posee el resveratrol en la patología artrítica. Nuestros datos mostraron que el resveratrol reguló a la baja los niveles de expresión de todas estas proteínas en el tejido sinovial de los animales a los que se les indujo la patología artrítica y, asimismo, nuestros resultados reflejaron la existencia de una fuerte correlación positiva entre la expresión sinovial de p62 y el factor p65-NF- $\kappa$ B. A raíz de estos datos, podemos sugerir que la supresión de la ruta inflamatoria, como consecuencia de la inhibición del factor de transcripción NF- $\kappa$ B a través de la activación del proceso autofágico, podría considerarse como una estrategia terapéutica. La razón de esto se debe a que se inhiben multitud de mediadores inflamatorios que se encuentran involucrados en su vía de señalización y que participan activamente en los distintos eventos que subyacen a la AR.

Para concluir, los datos aportados en este trabajo sugieren que la mejora del proceso autofágico podría considerarse como una potencial diana terapéutica en el tratamiento de la AR y, asimismo, apoya el empleo de compuestos de origen natural, como el resveratrol, como estrategia en el tratamiento de esta enfermedad.

## RESUMO

A artrite reumatoide (AR) é unha das enfermidades crónicas e inflamatorias máis comúns do sistema músculo-esquelético, capaz de producir danos articulares a longo prazo asociados a dor severa, discapacidade funcional progresiva e mesmo a morte precoz; ademais dos elevados custos socioeconómicos que isto supón. Aínda que a AR mostra frecuentemente unha afectación sistémica, o seu principal obxectivo son as articulacións sinoviais. Así, a membrana sinovial hiperplásica é unha das súas principais características patolóxicas, e está asociada tanto coa infiltración e retención local de células inmunes inflamatorias como coa activación e proliferación excesiva de células residentes da sinovial. En relación co seu tratamento, os fármacos actuais presentan numerosas limitacións, razón pola cal, nos últimos anos, existe un auxe de interese no posible potencial terapéutico dos produtos naturais fronte a esta enfermidade. Nesta liña, o presente traballo pretendeu afondar no efecto profiláctico dun composto de orixe natural, como é o resveratrol, na AR, empregando un modelo animal de artrite inducida por antígeno en ratas (AIA).

Para avaliar o efecto do resveratrol no estudo *in vivo*, éste adminístrouse por vía oral durante os dous meses previos á indución da artrite e continuándose ata o día do sacrificio, dous días despois da indución, correspondéndose coa fase aguda da enfermidade. En primeiro lugar, observouse como o tratamento con resveratrol foi capaz de contrarrestar os parámetros cardinais da patoloxía artrítica (proliferación da capa íntima, infiltrado celular inmune e celularidade) no tecido sinovial. Ademais disto, avalíouse como a posible implicación de dous dos mecanismos de morte celular máis relevantes, a morte celular de tipo I ou apoptose e/ou a morte celular de tipo II ou autofaxia, podería xogar un papel fundamental no control da proliferación celular excesiva do tecido sinovial da articulación artrítica. Para iso, analizouse mediante técnicas inmunohistoquímicas a expresión sinovial dos marcadores caspase-3 activa e do seu substrato PARP como intermediarios do proceso apoptótico e LC3, p62 e beclin-1 como mediadores do proceso autofáxico; amosando como o resveratrol é capaz de regular o equilibrio entre a autofaxia e a apoptose, dirixíndoo cara a autofaxia e promovendo, máis concretamente, a vía non canónica da autofaxia.

Así mesmo, cada vez hai máis evidencia de que un fallo na autofaxia podería modular a actividade inflamatoria, favorecendo así o desenvolvemento de múltiples enfermidades

inflamatorias e autoinmunes, como a AR. Deste xeito, avalíouse mediante inmunoensaios a concentración sérica de tres importantes mediadores da inflamación a nivel sistémico e con gran relevancia clínica: interleucina (IL)-1 $\beta$ , prostaglandina (PG)E<sub>2</sub> e a proteína C reactiva (PCR). Os resultados obtidos mostraron como aqueles animais aos que se lles administrou profilácticamente resveratrol tiñan niveis reducidos destes marcadores; Do mesmo xeito, ao realizar a análise de correlación entre os niveis destes e a expresión sinovial de p62, obtívose en todos os casos unha forte correlación positiva, evidenciando a importante relación que mantén a autofaxia co proceso inflamatorio.

Finalmente, avalíouse a expresión sinovial do factor de transcrición p65-NF- $\kappa$ B, clave na regulación da inflamación, e tamén dos marcadores VEGF e Ang-1, implicados no proceso de anxióxese, o que contribuíu a obter unha visión máis ampla das potenciais propiedades antiinflamatorias do resveratrol na patoloxía artrítica. Os nosos datos mostraron que o resveratrol regulaba á baixa os niveis de expresión de todas estas proteínas no tecido sinovial dos animais nos que se inducía a enfermidade artrítica e, así mesmo, os nosos resultados reflexaron a existencia dunha forte correlación positiva entre a expresión sinovial de p62 e o factor p65-NF- $\kappa$ B. En base a estes datos, podemos suxerir que a supresión da vía inflamatoria, como consecuencia da inhibición do factor de transcrición NF- $\kappa$ B mediante a activación do proceso autofáxico, podería considerarse como unha estratexia terapéutica. A razón disto débese ao feito de que se inhiben multitude de mediadores inflamatorios que están implicados na súa vía de sinalización e que participan activamente nos diferentes eventos subxacentes á AR.

Para concluír, os datos achegados neste traballo suxiren que a mellora do proceso autofáxico podería considerarse como unha potencial diana terapéutica no tratamento da AR e, así mesmo, apoia o uso de compostos de orixe natural, coma o resveratrol, como estratexia no tratamento desta enfermidade.

## ABSTRACT

Rheumatoid arthritis (RA) is one of the most common chronic and inflammatory diseases of the musculoskeletal system, capable of producing long-term joint damage associated with severe pain, progressive functional disability and even early death; in addition to the high socioeconomic costs that this entails. Although RA frequently shows systemic involvement, its main target is the synovial joints. Thus, the hyperplastic synovial membrane is one of its main pathological features, and it is associated both with the local infiltration and retention of inflammatory immune cells and with the activation and excessive proliferation of resident cells of the synovium. In relation to RA treatment, current drugs present numerous limitations, and consequently, in recent years, the possible therapeutic potential of natural products against this disease has been arousing great interest. In this line, the present work aimed to deepen the prophylactic effect of a compound of natural origin, such as resveratrol, in RA, using an animal model of antigen-induced arthritis in rats (AIA).

To evaluate the effect of resveratrol in the *in vivo* study, it was administered orally during the two months prior to the induction of arthritis and continuing until the day of sacrifice, two days after induction, corresponding to the acute phase of the disease. In the first place, it was observed how resveratrol treatment was able to counteract the cardinal parameters of arthritic pathology (proliferation of the intimal layer, immune cellular infiltrate and cellularity) in the synovial tissue. In addition, it was evaluated how the possible involvement of two of the most relevant cell death mechanisms, type I cell death or apoptosis and/or type II cell death or autophagy, could play a fundamental role in the control of excessive cell proliferation of the synovial tissue of the arthritic joint. For this, the synovial expression of the active caspase-3 and its substrate PARP as intermediates of the apoptotic process and LC3, p62 and beclin-1 as mediators of the autophagic process were analyzed using immunohistochemical techniques; showing how resveratrol is capable of regulating the balance between autophagy and apoptosis, directing it towards autophagy and promoting, more specifically, the non-canonical pathway of autophagy.

Furthermore, there is increasing evidence that a failure in autophagy could modulate inflammatory activity, promoting the development of multiple inflammatory and autoimmune diseases, such as RA. Thus, the serum concentration of three important mediators of inflammation at the systemic level, with great clinical relevance, was

evaluated by means of immunoassays: interleukin (IL)-1 $\beta$ , prostaglandin (PG)E<sub>2</sub> and C-reactive protein (CRP). The results obtained showed how those animals to which resveratrol was administered prophylactically had reduced levels of these markers; in the same way, when carrying out the correlation analysis between the levels of these and the synovial expression of p62, a strong positive correlation was obtained in all cases, highlighting the important relationship that autophagy maintains with the inflammatory process.

Finally, the synovial expression of the transcription factor p65-NF- $\kappa$ B, key in the regulation of inflammation, and also of the markers VEGF and Ang-1, involved in the angiogenesis process, was evaluated, which contributed to obtaining a broader vision of the potential anti-inflammatory properties of resveratrol in the arthritic pathology. Our data showed that resveratrol down-regulated the expression levels of all these proteins in the synovial tissue of the animals in which arthritic disease was induced and, likewise, our results reflected the existence of a strong positive correlation between the synovial expression of p62 and factor p65-NF- $\kappa$ B. Based on the data obtained in the present work, we can suggest that the suppression of the inflammatory pathway, as a consequence of the inhibition of the transcription factor NF- $\kappa$ B through the activation of the autophagic process, could be considered as a therapeutic strategy. The reason for this is due to the fact that a multitude of inflammatory mediators that are involved in its signaling pathway and that actively participate in the different events underlying RA are inhibited.

To conclude, the data provided in this work suggest that the improvement of the autophagic process could be considered as a potential therapeutic target in the treatment of RA and, likewise, supports the use of compounds of natural origin, such as resveratrol, as a strategy in the treatment of this disease.





## ÍNDICE

<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	<b>I</b>
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b> .....	<b>III</b>
<b>ÍNDICE DE ABREVIATURAS</b> .....	<b>IV</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
1. ENVEJECIMIENTO DE LA POBLACIÓN. ....	3
2. LA ARTRITIS REUMATOIDE. ....	4
2.1. DEFINICIÓN DE LA AR. ....	4
2.2. EPIDEMIOLOGÍA DE LA AR. ....	5
2.3. ETIOLOGÍA DE LA AR. ....	5
2.3.1. Factores genéticos. ....	5
2.3.2. Factores ambientales. ....	6
2.4. RESPUESTA AUTOINMUNE. ....	9
2.5. IMPACTO SOCIOECONÓMICO DE LA AR. ....	12
3. MANIFESTACIÓN ARTICULAR DE LA AR. ....	13
3.1. EL TEJIDO SINOVIAL. ....	13
3.2. CARACTERÍSTICAS ANATÓMICAS Y FUNCIONALES DE LA SINOVIAL SANA. ....	14
3.4. TRANSICIÓN DE LA SINOVIAL SANA A LA SINOVIAL ARTRÍTICA: SINOVITIS. ....	16
4. MECANISMOS DE MUERTE CELULAR PROGRAMADA. ....	18
4.1. MUERTE CELULAR PROGRAMADA TIPO I/APOPTOSIS. ....	19
4.1.1. Mediadores de la apoptosis: las caspasas. ....	20
4.1.2. Apoptosis: rutas de actuación. ....	22
4.1.3. Ejecución de la apoptosis. ....	23
4.1.4. Papel de la apoptosis en la sinovial AR. ....	25
4.2. MUERTE CELULAR PROGRAMADA TIPO II/AUTOFAGIA. ....	26
4.2.1. La autofagia: el proceso. ....	27
4.2.2. Papel dual de la autofagia en la patología de la AR. ....	29
4.3. BALANCE ENTRE APOPTOSIS Y AUTOFAGIA. ....	31
5. INFLAMACIÓN Y MEDIADORES INFLAMATORIOS EN LA AR. ....	33
5.1. MEDIADORES INFLAMATORIOS. ....	33
5.1.1. NF- $\kappa$ B. ....	33

5.1.2. Citoquinas.....	36
5.1.3. COX-2 (PGE <sub>2</sub> ).....	39
5.1.4. Proteína C Reactiva.....	40
5.2. INFLAMACIÓN MEDIADA POR INFLAMASOMA.....	40
5.3. ANGIOGÉNESIS.....	42
5.3.1. VEGF.....	43
5.3.2. Angiopoyetina-1.....	44
5.4. RELACIÓN ENTRE EL PROCESO INFLAMATORIO Y LA ACTIVACIÓN DE LA VÍA AUTOFÁGICA.....	44
6. LA FUNCIÓN DEL TRATAMIENTO EN LA AR.....	46
6.1. FÁRMACOS PARA EL TRATAMIENTO DE LA AR.....	46
6.2. BÚSQUEDA DE NUEVAS TERAPIAS.....	48
7. RESVERATROL.....	49
7.1. MECANISMOS DE ACCIÓN DEL RESVERATROL: INFLAMACIÓN Y MUERTE CELULAR.....	52
7.2. RESVERATROL Y AR.....	53
8. MODELOS ANIMALES DE AR.....	53
8.1. MODELOS ANIMALES DE ARTRITIS INDUCIDA.....	54
8.1.1. Artritis inducida por adyuvante.....	54
8.1.2. Artritis inducida por colágeno.....	55
8.1.3. Artritis inducida por antígeno.....	56
8.2. MODELOS DE ARTRITIS ESPONTÁNEA.....	58
<b>JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.....</b>	<b>61</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>67</b>
1.1. MODELO ANIMAL DE ARTRITIS INDUCIDA POR ANTÍGENO (AIA). ...	69
1.1.1. Animales empleados y su estabulación.....	69
1.1.2. Grupos de estudio y tratamiento con resveratrol (RSV).....	69
1.1.3. Inducción de la artritis.....	70
1.1.4. Obtención de muestras.....	71
1.2. EVALUACIÓN MACROSCÓPICA DE LA ARTICULACIÓN ARTRÍTICA.....	73
1.3. EVALUACIÓN MICROSCÓPICA DE LA ARTICULACIÓN ARTRÍTICA. .	73
1.3.1. Tinciones histoquímicas.....	73
1.3.2. Tinciones inmunohistoquímicas.....	74
1.3.4. Inmunofluorescencia.....	75

1.3.5. Análisis y cuantificación de imágenes. ....	76
1.4. ANÁLISIS DE LA PROTEÍNA C REACTIVA. ....	77
1.5. ANÁLISIS DE LA PROTAGLANDINA E <sub>2</sub> . ....	77
1.6. DETERMINACIÓN DE NIVELES SÉRICOS DE CITOQUINAS MEDIANTE MILLIPLEX. ....	78
1.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO. ....	79
<b>RESULTADOS</b> .....	<b>83</b>
1. ESTUDIO <i>IN VIVO</i> DE LA ACTIVACIÓN POR RESVERATROL DE MECANISMOS DE MUERTE CELULAR PROGRAMADA Y SU RELACIÓN CON EL PROCESO INFLAMATORIO EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE ARTRITIS INDUCIDA POR ANTÍGENO. ....	85
1.1. EFECTO DEL RESVERATROL EN EL DESARROLLO DE LA AIA: ANÁLISIS HISTOLÓGICO DE LA MEMBRANA SINOVIAL. ....	85
1.2. MECANISMOS DE MUERTE CELULAR EN EL CONTROL DE LA HIPERPLASIA SINOVIAL: EFECTO DEL RESVERATROL. ....	88
1.2.1. El resveratrol suprime la hiperplasia sinovial al aumentar el flujo autofágico. ....	88
1.2.1.1. El resveratrol induce la aparición de vacuolas autofágicas en la membrana sinovial. Expresión y localización de LC3. ....	88
1.2.1.2. El consumo de p62 refleja el aumento del flujo autofágico inducido por resveratrol. ....	90
1.2.1.3. El resveratrol no induce la vía canónica de la autofagia (dependiente de beclin-1) en el modelo AIA. ....	90
1.2.2. Efecto del resveratrol sobre la activación de mecanismos de muerte celular mediada por apoptosis. ....	93
1.2.2.1. El tratamiento con resveratrol limita la ejecución de la apoptosis mediada por la caspasa-3 activa. ....	93
1.2.2.2. El empleo de resveratrol limita la expresión del sustrato apoptótico PARP. ....	95
1.3. EFECTO PREVENTIVO DEL RESVERATROL SOBRE LA INFLAMACIÓN DURANTE EL DESARROLLO DE AIA Y SU CORRELACIÓN CON LA EXPRESIÓN SINOVIAL DE p62. ....	97
1.3.1. Marcadores clínicos de inflamación sistémica: IL-1 $\beta$ , PGE <sub>2</sub> , y CRP. ....	97
1.3.2. Correlación entre los niveles sistémicos de IL-1 $\beta$ , PGE <sub>2</sub> y CRP y la expresión proteica de p62 en la membrana sinovial. ....	98
1.3.3. Expresión y localización del factor de transcripción NF-kB y su correlación con la expresión sinovial de p62. ....	99

1.4. EFECTO ANTIANGIOGÉNICO DEL RESVERATROL EN LA MEMBRANA SINOVIAL DE UN MODELO EXPERIMENTAL DE ARTRITIS. ....	102
1.4.1. Efecto del resveratrol sobre la formación de nuevos vasos. Expresión y localización de VEGF. ....	102
1.4.2. Efecto del resveratrol sobre la maduración de los vasos sanguíneos. Expresión y localización de angiopoyetina 1. ....	103
1.5. ESTUDIO <i>IN VIVO</i> DEL EFECTO DE UNA DIETA ANTIOXIDANTE CON RESVERATROL EN ANIMALES SANOS. ....	106
1.5.1. Efecto del resveratrol en la estructura sinovial de animales sanos. ....	106
1.5.2. Evaluación del proceso autofágico en animales sanos tratados con resveratrol. ....	107
1.5.3. El uso de resveratrol no induce la apoptosis en animales sanos. ....	108
1.5.4. Niveles sistémicos de IL-1 $\beta$ , PGE <sub>2</sub> y CRP en animales sanos tratados con resveratrol. ....	110
1.5.5. Efecto del tratamiento profiláctico con resveratrol en la expresión del factor de transcripción NF-kB en la membrana sinovial de animales sanos. ....	110
1.5.6. Expresión sinovial de los marcadores angiogénicos VEGF y Ang-1 en animales sanos tratados con resveratrol. ....	111
<b>DISCUSIÓN</b> .....	<b>115</b>
<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>127</b>
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>127</b>
<b>ANEXOS</b> .....	<b>127</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Estimación de la población mundial mayor de edad (65 años o más). .....	3
<b>Figura 2.</b> Activación y desarrollo del proceso inmunopatogénico de la AR.....	11
<b>Figura 3.</b> Anatomía de la articulación sinovial.....	14
<b>Figura 4.</b> Anatomía de la membrana sinovial.....	15
<b>Figura 5.</b> Evolución del proceso patogénico de la AR. ....	17
<b>Figura 6.</b> Activación de las diferentes caspasas implicadas en el proceso de muerte celular programada por apoptosis.....	21
<b>Figura 7.</b> Rutas de señalización apoptóticas. ....	25
<b>Figura 8.</b> Eventos del proceso autofágico a nivel molecular.....	29
<b>Figura 9.</b> Principales dianas moleculares y mecanismos de actuación del factor de transcripción NF- κB. ....	34
<b>Figura 10.</b> Activación del factor de transcripción NF-κB. ....	35
<b>Figura 11.</b> Proceso inflamatorio en la articulación artrítica. ....	38
<b>Figura 12.</b> Representación esquemática del ciclo angiogénico en la sinovitis AR. ....	43
<b>Figura 13.</b> Activación de NF-κB y su implicación en la regulación del complejo inflamasa. ....	45
<b>Figura 14.</b> Estructura química del resveratrol. ....	50
<b>Figura 15.</b> Número de publicaciones por año que mencionan el resveratrol. ....	51
<b>Figura 16.</b> Dianas celulares del resveratrol. ....	52
<b>Figura 17.</b> Cronología y fases del desarrollo del modelo de AIA. ....	57
<b>Figura 18.</b> Cronograma del desarrollo del modelo animal. ....	71
<b>Figura 19.</b> Grupos de estudio y manipulaciones realizadas. ....	71
<b>Figura 20.</b> Vista frontal de una articulación trasera de rata tras ser aislada. ....	72
<b>Figura 21.</b> Evaluación microscópica del efecto del resveratrol sobre el desarrollo de un modelo agudo de AIA. ....	87
<b>Figura 22.</b> El uso de resveratrol induce el flujo autofágico en un modelo agudo de AIA. ....	89
<b>Figura 23.</b> El resveratrol es capaz de reducir la expresión de p62 en un modelo de artritis inducida por antígeno. ....	91
<b>Figura 24.</b> El resveratrol no induce la activación de la vía canónica de la autofagia, dependiente de beclin-1, en un modelo de AIA. ....	92
<b>Figura 25.</b> El tratamiento con resveratrol reduce la expresión del marcador de apoptosis caspasa-3 en un modelo agudo de AIA. ....	94

<b>Figura 26.</b> La expresión del marcador de muerte celular apoptótica, PARP, se reduce por el uso de resveratrol en un modelo de AIA. ....	<b>96</b>
<b>Figura 27.</b> Efecto preventivo del resveratrol en la respuesta inflamatoria sistémica en muestras de un modelo de AIA. ....	<b>98</b>
<b>Figura 28.</b> Correlación entre marcadores de inflamación sistémica y la expresión sinovial de p62 en muestras de un modelo AIA. ....	<b>99</b>
<b>Figura 29.</b> El uso de resveratrol reduce la expresión sinovial del factor de transcripción NF- $\kappa$ B en un modelo agudo de AIA. ....	<b>101</b>
<b>Figura 30.</b> Efecto del resveratrol sobre la neovascularización en el tejido sinovial de un modelo agudo de AIA. ....	<b>104</b>
<b>Figura 31.</b> El resveratrol impide la maduración de nuevos vasos sanguíneos en el tejido sinovial de un modelo agudo de AIA. ....	<b>105</b>
<b>Figura 32.</b> Evaluación microscópica de la membrana sinovial de animales sanos tratados con resveratrol. ....	<b>107</b>
<b>Figura 33.</b> Efecto del resveratrol sobre la expresión sinovial de los marcadores autofágicos LC3, p62 y beclin-1 en animales sanos.....	<b>108</b>
<b>Figura 34.</b> Efecto del resveratrol sobre la muerte celular por apoptosis en la membrana sinovial del grupo SANO/RSV.....	<b>109</b>
<b>Figura 35.</b> El uso de resveratrol es capaz de modular la expresión del factor de transcripción NF- $\kappa$ B en animales sanos. ....	<b>111</b>
<b>Figura 36.</b> Efecto del tratamiento con resveratrol sobre la expresión de marcadores del proceso angiogénico en la membrana sinovial de animales sanos. ....	<b>112</b>
<b>Figura 37.</b> Representación esquemática de los principales hallazgos del estudio.....	<b>126</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Proteínas con un papel dual en apoptosis y autofagia. ....	<b>32</b>
<b>Tabla 2.</b> Lista de anticuerpos empleados en el desarrollo de las tinciones de inmunohistoquímica e inmunofluorescencia. ....	<b>76</b>

## ÍNDICE DE ABREVIATURAS

**AA:** Artritis Inducida por Adyuvante

**ACPAs:** Anticuerpos Antipéptidos Citrulinados (del inglés: *Anti-Citrullinated Proteins Antibodies*)

**ADN:** Ácido desoxirribonucleico

**AIA:** Artritis Inducida por Antígeno

**AINEs:** Antiinflamatorios No Esteroideos

**APAF1:** Factor Activador de Peptidasa Apoptótica 1 (del inglés: *Apoptotic Peptidase Activating Factor 1*)

**AR:** Artritis Reumatoide

**ATG:** Proteínas Relacionadas con la Autofagia (del inglés: *Autophagy-Related Proteins*)

**BCL-2:** familia de proteínas Linfoma de Células B2 (del inglés: *B cell Lymphoma 2*)

**BH3:** del inglés, *BCL-2 Homology 3*

**BID:** Agonista de Muerte con Dominio de Interacción BH3 (del inglés: *BH3 Interacting-Domain Death Agonist*)

**BSA:** Seroalbúmina Bovina (del inglés: *Bovine Serum Albumin*)

**CAD:** ADNasa Activada por Caspasa (del inglés: *Caspase-Activated DNase*)

**CARD:** Dominio Reclutador de Caspasas (del inglés: *Caspase-Recruitment Domain*)

**CEEA:** Comité Ético de Experimentación Animal

**CFA:** Adyuvante Completo de Freund (del inglés *Complete Freund's Adjuvant*)

**CIA:** Artritis Inducida por Colágeno (del inglés: *Collagen-Induced Arthritis*)

**CINC-1:** Quimioatrayente de Neutrófilos 1 Inducido por Citoquinas (del inglés: *Cytokine-Induced Neutrophil Chemoattractant 1*)

**COX:** Ciclooxygenasa

**CRP:** Proteína C Reactiva (del inglés: *C Reactive Protein*)

**DAB:** 3,3'-Diaminobencidina

**DAMPs:** Patrones Moleculares Asociados a Daño (del inglés: *Damage-Associated Molecular Patterns*)

**DAPI:** 4', 6-Diamidino-2-Fenilindol (del inglés: *4',6-Diamidino-2-Phenylindole*)

**DED:** Dominio Efecto de Muerte (del inglés: *Death Effector Domain*)



**DISC:** Complejo de Señalización Inductor de Muerte (del inglés: *Death-Inducing Signaling Complex*)

**EC:** Epítipo Compartido

**EEM:** Error Estándar de la Media

**EPISER:** Estudio de prevalencia de enfermedades reumáticas en la población española desarrollado por la Sociedad Española de Reumatología

**EULAR:** del inglés, *European League Against Rheumatism*

**FADD:** Dominio de Muerte Asociado a Fas (*Fas-Associated Death Domain*)

**FAMEs:** Fármacos Antirreumáticos Modificadores de la Enfermedad

**FR:** Factor Reumatoide

**GCs:** Glucocorticoides

**H-E:** Hematoxilina-Eosina

**HIF-1 $\alpha$ :** Factor Inducible por Hipoxia 1 $\alpha$  (del inglés: *Hypoxia Inducible Factor  $\alpha$* )

**HLA:** Antígeno Leucocitario Humano (del inglés: *Human Leukocyte Antigen*)

**HO:** Hemoxigenasa-1

**HRP:** Peroxidasa de Rábano Picante (del inglés: *Horseradish Peroxidase*)

**H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>:** Agua Destilada

**iCAD:** Inhibidor de la ADNasa Activada por Caspasa

**IFN- $\gamma$ :** Interferón- $\gamma$

**Igs:** Inmunoglobulinas

**I $\kappa$ B:** Inhibidor del Factor de Transcripción NF- $\kappa$ B

**IL:** Interleuquina

**INE:** Instituto Nacional de Estadística

**iNOS:** Óxido Nítrico-Sintasa Inducible (del inglés: *Inducible Nitric Oxide Synthase*)

**l:** litros

**LC3:** del inglés, *Microtubule-Associated Protein 1 Light Chain 3*

**M:** Molar

**mBSA:** Seroalbúmina Bovina Metilada (del inglés: *Methylated Bovine Serum Albumin*)

**MCH:** Complejo Mayor de Histocompatibilidad (del inglés: *Major Histocompatibility Complex*)

**MCP-1:** Proteína Quimioatrayente de Monocitos 1 (del inglés: *Monocyte Chemoattractant Protein-1*)

**ml:** Mililitros

**MMPs:** Metaloproteinasas de Matriz (del inglés: *Matrix Metalloproteinases*)

**mTOR:** Diana de la Rapamicina en Mamíferos (del inglés: *Mammalian Target of Rapamycin*)

**MTX:** Metotrexato

**NF- $\kappa$ B:** Factor Nuclear  $\kappa$ B (del inglés: *Nuclear Factor  $\kappa$ B*)

**ng:** Nanogramo

**nm:** Nanometros

**Nrf2:** del inglés, *Nuclear Factor Erythroid 2-Related Factor 2*

**NQO1:** Quinona Oxidorreductasa 1 (del inglés: *NAD(P)H Dehydrogenase Quinone 1*)

**O<sub>2</sub>:** Oxígeno

**PAD:** Peptidil Arginina Deiminasa

**PARP:** Poli-ADP Ribosa Polimerasa

**PBS:** Tampón Fosfato Salino (del inglés: *Phosphate Buffered Saline*)

**PBST:** PBS pH 7,6 con 0,2% de TWEEN<sup>®</sup>20

**PCNA:** Antígeno Nuclear de Células en Proliferación (del inglés: *Proliferating Cell Nuclear Antigen*)

**PDGF:** Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas (del inglés: *Platelet Derived Growth Factor*)

**pg:** Picogramos

**PGs:** Prostaglandinas

**PGE<sub>2</sub>:** Prostaglandina E<sub>2</sub>

***P. gingivalis:*** *Porphyromonas gingivalis*

**PI3K:** Fosfatidilinositol-3 Quinasa de Clase III (del inglés: *Class III Phosphatidylinositol 3-Kinase*)

**PI3P:** Fosfatidilinositol-3 Fosfato (del inglés: *Phosphatidyl Inositol Triphosphate*)

**PIK3C3:** del inglés, *Phosphatidylinositol 3-Kinase Catalytic Subunit Type 3*

**p62/SQSTM1:** p62/Sequestosoma-1

**ROS:** Especies Reactivas de Oxígeno (del inglés: *Reactive Oxygen Species*)

**rpm:** Revoluciones Por Minuto

**RSV:** Resveratrol

**SIRT:** Sirtuina

**TGF- $\beta$ :** del inglés, *Transforming Growth Factor  $\beta$*

**TLR:** del inglés, *Toll-Like Receptor*

**TNF- $\alpha$ :** Factor de Necrosis Tumoral  $\alpha$  (del inglés: *Tumor Necrosis Factor- $\alpha$* )

**TMB:** 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina

**ULK1:** del inglés, *Like Autophagy Activating Kinase 1*

**VEGF:** Factor de Crecimiento Vasoendotelial (del inglés: *Vascular Endothelial Growth Factor*)

**VPS34:** del inglés, *Vacuolar Protein Sorting 34*

**XXIAC:** Xerencia de Xestión Integrada de A Coruña

**$\mu$ g:** Microgramos

**$\mu$ l:** Microlitros

**$\mu$ m:** Micrómetros

**$^{\circ}$ C:** Grados Centígrados







# INTRODUCCIÓN

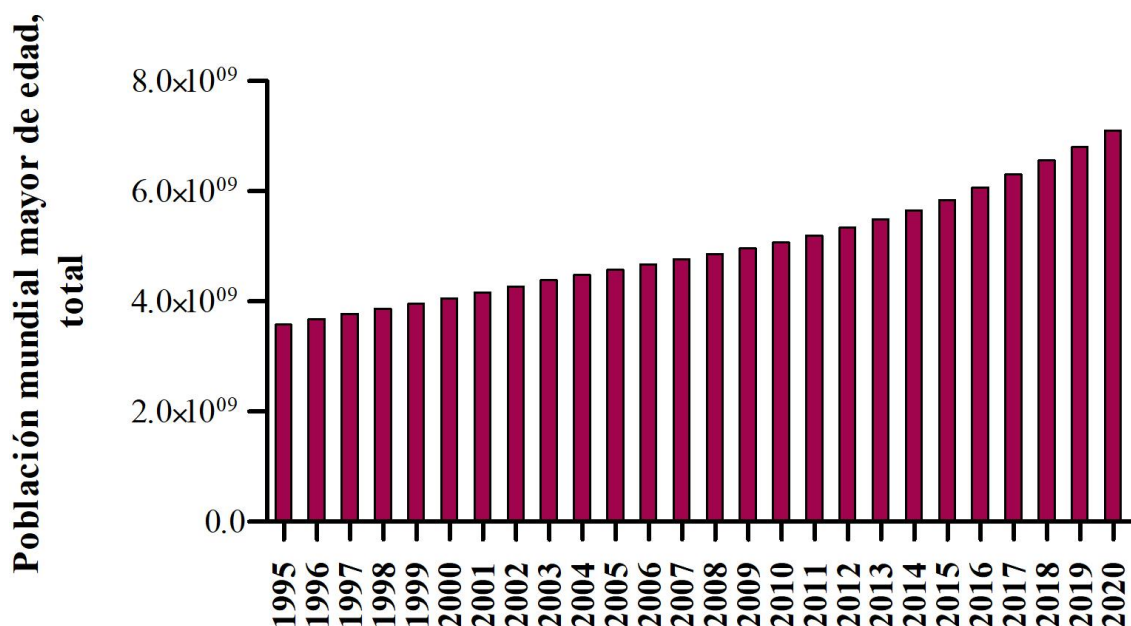






## 1. ENVEJECIMIENTO DE LA POBLACIÓN.

El envejecimiento de la población es un proceso intrínseco de la evolución demográfica, basado en la transformación de un régimen de alta mortalidad y natalidad a otro de niveles bajos y controlados. La disminución de la natalidad y el progresivo aumento de la esperanza de vida de las personas impactan directamente en la composición por edades de la población, al reducir relativamente el número de personas en las edades más jóvenes y engrosar los sectores con edades más avanzadas, considerándose mayores a aquellas personas que tienen 65 años o más. Como consecuencia de esta transición demográfica, la población mundial ha sufrido un aumento progresivo de su tamaño y, simultáneamente, su envejecimiento (**Figura 1**). El envejecimiento de la población se considera uno de los fenómenos de mayor impacto en este siglo, ya que tiene enormes consecuencias económicas, sociales y políticas (1,2).



**Figura 1.** Estimación de la población mundial mayor de edad (65 años o más). La gráfica muestra el aumento progresivo de la población envejecida en el último cuarto de siglo. Datos obtenidos de: <https://datos.bancomundial.org/indicador/SP.POP.65UP.TO?end=2018&start=1960&view=chart>.

Según los datos estadísticos del Padrón Continuo del Instituto Nacional de Estadística (INE) el porcentaje de personas mayores en España es un 19,1% sobre el total de la población, y seguirá aumentando tanto en número como en proporción. De esta forma, hacia 2050 las personas mayores casi habrán duplicado su porcentaje mientras que los niños (0-15 años) y la población en edad laboral (16-64 años) habrán reducido su peso

## **INTRODUCCIÓN**

dentro de la sociedad (2). Además, es importante señalar que, debido a la mayor esperanza de vida de las mujeres, su número y peso relativo en las edades avanzadas será mayor.

Asimismo, el envejecimiento debe entenderse también como un proceso fisiológico que puede definirse como el conjunto de cambios morfológicos, funcionales y psicológicos que se producen en función del tiempo y que conllevan cambios en la estructura y función de los diferentes sistemas, aumentando la vulnerabilidad del individuo al estrés ambiental y a la enfermedad (1); así, el envejecimiento poblacional también se encuentra implicado en un aumento de la prevalencia de enfermedades crónicas y sistémicas relacionadas con la edad, entre ellas, la artritis reumatoide (AR).

## **2. LA ARTRITIS REUMATOIDE.**

### **2.1. DEFINICIÓN DE LA AR.**

La AR es una dolencia incluida dentro del grupo de las enfermedades reumáticas, es decir, el conjunto de trastornos médicos que afectan de manera genérica al aparato locomotor, compuesto básicamente por las articulaciones, los tendones, los músculos y los huesos. Dentro del grupo de las enfermedades reumáticas, la AR se engloba en el conjunto de las artritis inflamatorias, las cuales afectan al sistema inmunitario, y donde la AR se presenta como el tipo de artritis articular inflamatoria crónica más común y más grave (3,4).

En esencia, la AR se define como una enfermedad inflamatoria y sistémica de naturaleza autoinmune que causa la inflamación crónica de las articulaciones móviles (también llamadas articulaciones sinoviales o diartrodiales) siendo la membrana sinovial la primera estructura comprometida. Las articulaciones más lesionadas son generalmente las de las extremidades (en particular, las de los dedos de manos y pies, los tobillos, las rodillas, los hombros y los codos), que con frecuencia se encuentran afectadas de forma simétrica, a ambos lados del cuerpo (3,4). Los signos y síntomas cardinales de la AR son el dolor, hinchazón y rigidez de las articulaciones afectadas, pero con el paso del tiempo es común dado su carácter sistémico, la aparición de algunas manifestaciones extraarticulares; es decir, que afectan a otros sectores del organismo no relacionados con las articulaciones. Todo ello conduce a la destrucción, deformidad y pérdida progresiva de la movilidad articular, ocasionando un marcado deterioro de la capacidad funcional y la calidad de vida (4).

### 2.2. EPIDEMIOLOGÍA DE LA AR.

La prevalencia de la AR es relativamente constante en la población mundial adulta, 0,5%-1%, con un rango de entre 5 a 50 nuevos casos al año por cada 100.000. Aunque tiene una distribución universal, presenta grandes diferencias geográficas en cuanto a su prevalencia, que es mayor en el norte de Europa y América y se observa una reducción de las áreas más urbanas a las rurales (5,6). En España, el último estudio realizado por la Sociedad Española de Reumatología (estudio EPISER 2016) estima que un 0,82% de la población padece AR, lo que extrapolado a la población total supone entre 220.000 y 430.000 personas mayores de 20 años afectadas por esta enfermedad (7,8). Esto implica un incremento respecto a un estudio realizado con anterioridad (estudio EPISER 2000), donde se estimó que la prevalencia de la AR era de un 0,5% (6,9).

En cuanto a su incidencia, la AR se manifiesta más en mujeres que en hombres, de forma que la proporción entre pacientes de ambos sexos en la mayoría de los estudios es de aproximadamente 2-3:1 (mujer:hombre). Esto sugiere, tal y como explicaremos más adelante, que los factores hormonales juegan un papel importante en la aparición y el curso de esta patología (10); y además, la AR puede comenzar en cualquier etapa de la vida, aunque su inicio es más frecuente entre los 40 y 60 años (3).

### 2.3. ETIOLOGÍA DE LA AR.

En la actualidad, las causas que subyacen a la aparición de la patología artrítica siguen sin conocerse en detalle. Dada la naturaleza autoinmune de esta dolencia, se asume que su desarrollo implica una interacción compleja entre factores genéticos y ciertos determinantes ambientales (**Figura 2**). De esta forma, la combinación de dichos factores podría influenciar activamente su aparición y asimismo, marcar el curso de la reacción inmunológica e inflamatoria que se produce dentro de la propia articulación (11).

#### 2.3.1. Factores genéticos.

Los factores genéticos son claramente importantes en la AR, justificando entre un 50-60% el riesgo de su desarrollo (12). Estudios de pedigrí familiar han confirmado la presencia de una concordancia de la enfermedad en familiares de primer grado, entre un 2 y 4%; y en gemelos monozigotos, entre un 12 y 15%. De esta forma, aquellas personas

## INTRODUCCIÓN

con un familiar de primer grado con AR presentan un mayor riesgo de desarrollar la enfermedad que la población general (12,13).

El factor genético que se ha asociado con más fuerza a la AR forma parte del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC; del inglés: *Major Histocompatibility Complex*) clase II. Los genes del MHC clase II (MHC-II) proporcionan las instrucciones necesarias para la síntesis de proteínas presentes en la superficie de ciertas células del sistema inmunitario, donde llevan a cabo la función de reconocimiento antigénico, ya sea de toxinas u otros agentes infecciosos (14). Uno de estos genes, es el gen del antígeno leucocitario humano (HLA; del inglés: *Human Leukocyte Antigen*). En concreto la región HLA-DRB1, donde los alelos DRB1\*0401 y DRB1\*0404, entre otros, codifican para una misma secuencia de cinco aminoácidos (QKRAA: glutamina-lisina-arginina-alanina-alanina) conocida como epítipo compartido (EC) (13,15). Se ha sugerido que el EC confiere una particular susceptibilidad al desarrollo de la AR, ya que motiva la presentación de antígenos “artritogénicos”, promoviendo una respuesta inmune alterada, específica de la articulación (15). Sumado a esto, se ha observado como ciertos antígenos pueden ser modificados en un proceso conocido como citrulinación, que implica la modificación postraduccional del aminoácido arginina a citrulina, en una reacción llevada a cabo por la enzima peptidil arginina deiminasa (PAD); lo que da lugar a la formación de los llamados péptidos citrulinados que presentan una mayor afinidad por el EC (16,17). Todo ello conduce finalmente a una respuesta inmune alterada, con la formación de anticuerpos específicos contra los péptidos citrulinados (5), tal y como detallaremos más adelante.

Aunque en menor medida que el EC, se han identificado otros polimorfismos genéticos que también contribuyen al desarrollo de esta patología. Entre ellos destaca el polimorfismo del gen PTPN22, involucrado en la señalización del receptor de antígeno de células T y B (13,16) y del cual, se ha observado, como la nueva función resultante de su producto proteico conduce a un umbral reducido para la activación inmune de las células T y B, predisponiendo así a la autoinmunidad (18).

### 2.3.2. Factores ambientales.

En el apartado anterior se indicó que los factores genéticos son responsables de aproximadamente el 50% del riesgo de desarrollar AR, lo que significa que los factores

ambientales (así como la interacción entre genes y ambiente) explicarían el resto. Se han estudiado diversos factores ambientales y, aunque las evidencias científicas sobre su implicación en el proceso artrítico no son del todo concluyentes, todo parece indicar que pueden actuar muchos años antes de que la enfermedad se vuelva clínicamente aparente (18). A continuación, se describen los principales factores ambientales que estarían implicados en la etiología de la AR:

- **Tabaco:** de todos los factores ambientales, fumar presenta sin duda, la asociación más fuerte con el riesgo de padecer AR; ya que incrementa dicho riesgo en proporción a la duración e intensidad de la exposición al tabaco, afectando negativamente a su curso clínico. Además, uno de los hallazgos más importantes de los estudios epidemiológicos y de factores de riesgo como el realizado por Costenbader y colaboradores es la interacción aditiva entre los polimorfismos HLA-EC y PTPN22 con el tabaco (19), demostrando que tanto los factores genéticos como los ambientales son importantes para determinar el desarrollo y el resultado clínico de la AR. Asimismo, existen otros factores que pueden suponer un riesgo potencial como son la exposición a la sílice, aceites minerales y otras sustancias presentes en el aire (18).

- **Agentes infecciosos:** desde hace años, la asociación entre los agentes microbianos con el riesgo de padecer AR ha atraído la atención de muchos investigadores. Los estudios publicados en relación a los virus muestran resultados poco concluyentes; sin embargo, sí que se han obtenido resultados tangibles con respecto a la relación entre la infección bacteriana y la AR (11). De hecho, muchos estudios han descrito que la periodontitis crónica, una enfermedad oral inflamatoria, causada entre otros motivos por el infiltrado de la bacteria *Porphyromonas gingivalis*, comparte ciertos mecanismos patológicos con la AR. *P. gingivalis* presenta la capacidad única de llevar a cabo el proceso de citrulinación peptídica mediante la producción de la enzima PAD (20). Así, los péptidos alterados pueden propagarse, provocando una pérdida de la tolerancia inmunológica en la articulación y desencadenando la inflamación articular crónica en individuos susceptibles genéticamente (21). Pero la cavidad oral no es el único lugar del cuerpo colonizado por bacterias. La mayoría de microorganismos presentes en nuestro cuerpo se encuentran en el tracto intestinal, y actúan afectando al balance entre las respuestas inmunes proinflamatorias y antiinflamatorias (20).

## INTRODUCCIÓN

- **Sexo y hormonas:** la llamativa disparidad sexual en la incidencia de la AR podría explicarse, en cierta medida, por las hormonas. Tanto es así que factores hormonales como los estrógenos han mostrado un impacto directo en el sistema inmunitario, regulando al alza la producción de inmunoglobulinas y a la baja la respuesta inmune inflamatoria (22). Por ello, se considera que eventos como la menopausia relacionados con el declive de los estrógenos son factores de riesgo y que los relacionados con la alta exposición a los estrógenos, como la toma de anticonceptivos orales confieren un efecto protector (19,22,23). Sumado a esto, la actividad de la enfermedad suele remitir hasta en un 75% de las mujeres durante el embarazo, mientras que en el periodo postparto se produce una exacerbación de la enfermedad hasta en un 90% (22). Por otro lado, se ha observado una relación directa de los niveles bajos de andrógenos como la testosterona, tanto en hombres como en mujeres, con el desarrollo de la patología AR (18,22).

- **Estilo de vida:** tal y como sucede en otras enfermedades crónicas, la AR puede verse agravada por elecciones inadecuadas respecto al estilo de vida. Es por ello, que numerosos estudios enfatizan el papel fundamental que juegan la nutrición y el ejercicio físico en el desarrollo y curso de esta enfermedad (24). En cuanto a dieta y nutrición, éstos han acaparado una inmensa atención en los últimos años como potenciales herramientas para la prevención y manejo de la AR. En este sentido, se ha observado como los hábitos dietéticos y más concretamente las propiedades de alimentos específicos pueden ejercer tanto como un factor de riesgo, mostrando un efecto proinflamatorio, así como una inducción de resistencia a la insulina y obesidad (como es el caso de carnes rojas, sal o ingesta calórica excesiva) o, por el contrario, pueden contribuir a reducir la inflamación (aceite, pescados grasos, fruta y otros); y además, la dieta constituye uno de los factores de mayor relevancia en relación con la composición de la microbiota, involucrada en el desarrollo de la AR, tal y como se ha explicado anteriormente (25). Por su parte, se ha descrito como el ejercicio físico de intensidad moderada o alta, practicado de forma regular no supone un hábito perjudicial ya sea a nivel de la actividad de la enfermedad o en el daño de las articulaciones, sino que éste ayudaría a mejorar el tono muscular, así como la capacidad cardiovascular (26).

### 2.4. RESPUESTA AUTOINMUNE.

Al igual que muchas otras enfermedades reumáticas, la AR es una enfermedad autoinmune, es decir, durante su desarrollo las células del sistema inmunitario no son capaces de distinguir las moléculas propias de las extrañas y acaban identificando como una potencial amenaza a los tejidos de la propia articulación. Así, además de desencadenar una reacción inflamatoria inoportuna y persistente, las células inmunes fabrican los anticuerpos que atacan a la propia articulación, llamados autoanticuerpos. La AR se asocia típicamente con la presencia serológica de varios autoanticuerpos, pero destacan dos, el factor reumatoide (FR) y los anticuerpos antipéptidos citrulinados (ACPAs; del inglés: *Anti-Citrullinated Proteins Antibodies*) (27). De hecho, se ha descrito que el 50-80% de los individuos que padecen AR tienen uno de estos autoanticuerpos o la presencia simultánea de ambos (5).

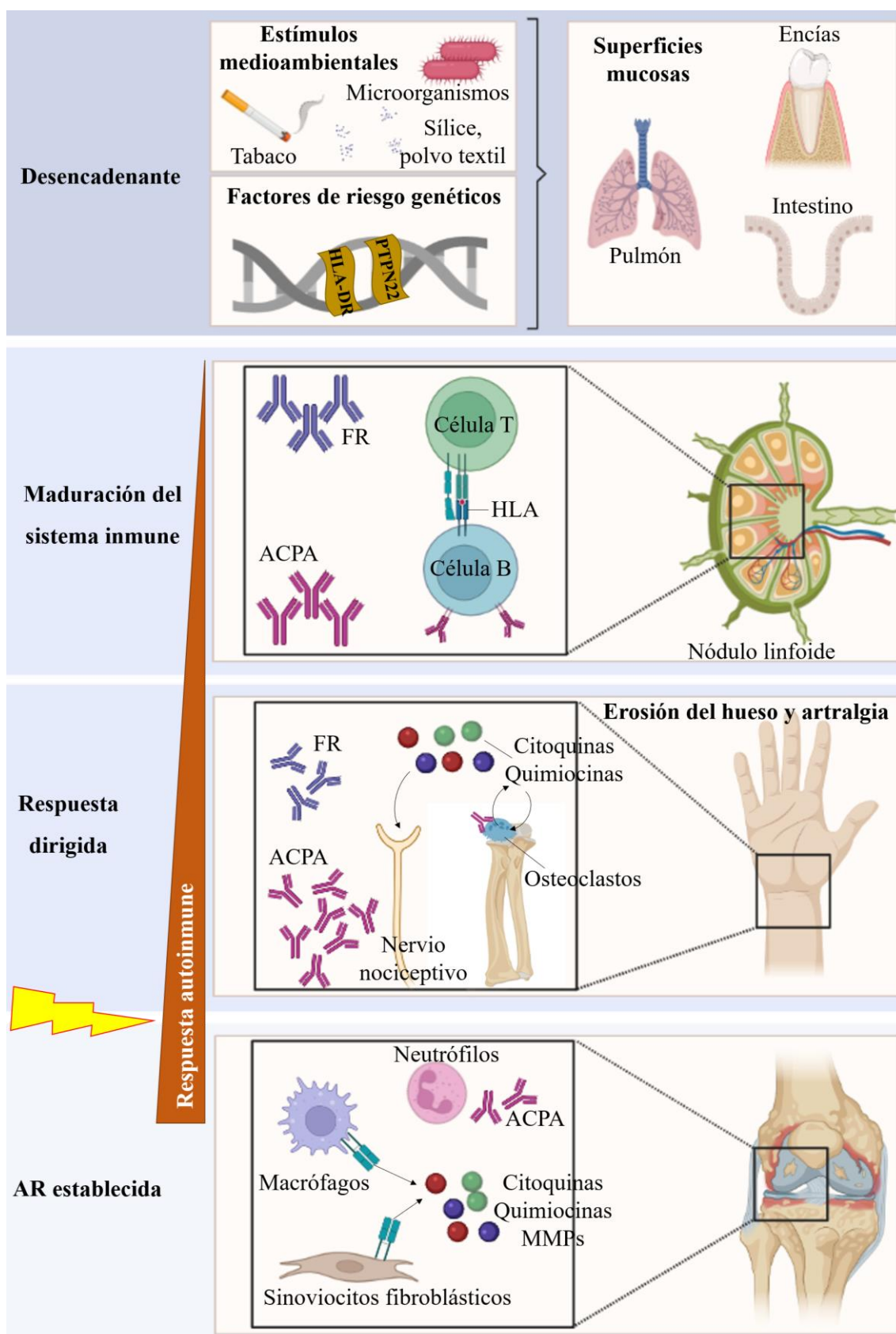
- **Factor reumatoide:** fue el primer autoanticuerpo descrito en AR (27) y desde su descubrimiento, se ha empleado como indicador en el pronóstico de la actividad y progresión de la enfermedad tanto en su forma juvenil como adulta; debido a que los pacientes que presentan un FR sérico positivo persistente suelen mostrar generalmente más anormalidades radiológicas, mayor actividad de la enfermedad, peor capacidad funcional, más nódulos reumatoides y otras manifestaciones extraarticulares que aquellos pacientes con FR negativo persistente (28). Éste se produce localmente por las células B presentes en los folículos linfoides que se desarrollan en la sinovial inflamada, y actúan formando inmunocomplejos contra las inmunoglobulinas (Igs)G que dan lugar a una respuesta inmune mediada por las células T (27). Aunque puede aparecer con distintas isoformas, lo más común es encontrarlo como IgA e IgM, siendo ésta última la forma mayoritaria en AR, ya que se detecta en el 60-80% de los pacientes (27). Estas Igs actúan uniéndose a la región Fc de la IgG, por lo que en el caso del FR el antígeno es en sí mismo un anticuerpo (29).

- **Anticuerpos antipéptidos citrulinados:** junto con el FR, los ACPAs representan uno de los marcadores serológicos clave en el diagnóstico temprano de la AR ya que su aparición puede preceder en años a la aparición de los síntomas y están presentes hasta en el 80% de los pacientes, asociándose con un curso y resultado de la enfermedad más graves que en aquellos individuos ACPA negativos (30). En términos generales, los ACPAs constituyen un grupo de anticuerpos con diferentes especificidades hacia los antígenos

## INTRODUCCIÓN

citrulinados y su formación es específica de esta enfermedad. Numerosas investigaciones han descrito una asociación entre la producción de este tipo de anticuerpos y la presencia del EC, correspondiéndose con una enfermedad articular más agresiva (28). En esta línea, se ha sugerido que su acción podría contribuir al daño articular y la pérdida ósea ya antes del inicio de la inflamación articular en la AR; ya que tienen la capacidad de unirse a la superficie de los osteoclastos en desarrollo y provocar su diferenciación al interactuar con los péptidos citrulinados y, consecuentemente, la erosión del hueso. Asimismo, se ha sugerido que estos autoanticuerpos pueden sensibilizar a los fibroblastos de la membrana sinovial promoviendo su migración (31). En cuanto al proceso inflamatorio, la unión de los ACPAs a sus antígenos diana en el tejido sinovial puede tener un efecto proinflamatorio ya que promueve la formación de complejos inmunes que conducen a la estimulación de células B y T, proceso que puede ser en parte responsable de la cronicidad de esta enfermedad (28).





**Figura 2. Activación y desarrollo del proceso inmunopatogénico de la AR.** La figura muestra de forma esquemática una perspectiva longitudinal de las distintas fases implicadas en el desarrollo de la autoinmunidad en la patología artrítica. Primera fase (desencadenante): diversos estímulos ambientales junto con el genotipo del individuo desencadenan el proceso autoinmune en múltiples superficies mucosas;

## INTRODUCCIÓN

segunda fase (maduración): la respuesta autoinmune madura gradualmente debido a la propagación de epítomos y autoanticuerpos y se restringe a ganglios linfáticos u órganos linfoides periféricos fuera de las articulaciones. Esta fase se encuentra vinculada a la activación de células T dependientes de MHC-II, así como a su interacción con las células B; tercera fase (respuesta dirigida): se desarrollan síntomas como la pérdida ósea y dolor (artralgia) derivados de la actuación sinérgica del FR y los ACPAs; cuarta fase (establecimiento de la AR): se desarrolla la sinovitis crónica y la sintomatología clásica de la AR asociadas a la producción desmesurada de un amplio abanico de moléculas proinflamatorias (citoquinas, quimiocinas, metaloproteinasas de matriz, etc). Las cuatro fases representadas pueden ocurrir de forma secuencial pero también pueden tener lugar de forma simultánea. Imagen tomada y modificada de *The immunopathogenesis of seropositive rheumatoid arthritis: from triggering to targeting* (Malmström V; 2016) (32). Imagen de autoría propia creada con la aplicación BioRender.com.

### 2.5. IMPACTO SOCIOECONÓMICO DE LA AR.

La importancia del impacto de la AR deriva de su elevada prevalencia, su carácter crónico con exacerbaciones y remisiones que originan un elevado consumo de recursos, y su innegable potencial discapacitante. La carga individual es resultado del déficit musculoesquelético, con la consiguiente disminución de la función física, calidad de vida y un riesgo de comorbilidad acumulativa. De esta forma, se ven afectadas muchas facetas de la vida del paciente, como su bienestar físico y emocional, sus relaciones familiares y sociales, y su vida laboral (33,34). La esperanza de vida para pacientes AR parece acortarse entre 3 a 10 años dependiendo de la severidad de la enfermedad y la edad de comienzo de la misma (10). Por su parte, la tasa de mortalidad en pacientes AR se ha reducido en los últimos años debido probablemente a un descenso en las muertes por enfermedades cardiovasculares asociadas, así como una mejora en el manejo y tratamiento de la enfermedad, tal y como indican Abhishek A. y colaboradores (35); a pesar de ello, la AR sigue asociándose con tasas de mortalidad muy elevadas. En cuanto a la carga social, su impacto se debe mayoritariamente al consumo de recursos, directos e indirectos, y a los costes asociados que se corresponden fundamentalmente con la enfermedad y la pérdida de productividad, con el consiguiente impacto socioeconómico (33). Así, diversos estudios llevados a cabo en Europa y EE. UU. estiman un gasto de 4000-6000€ por paciente y por año (sin incluir el coste de los tratamientos biológicos, los cuales detallaremos más adelante) (36). De esta forma, es primordial realizar un esfuerzo por establecer un diagnóstico precoz, iniciar el tratamiento temprano y diseñar nuevas estrategias terapéuticas para poder reducir o prevenir las consecuencias que la AR acarrea para el individuo y la sociedad (34).

### 3. MANIFESTACIÓN ARTICULAR DE LA AR.

La articulación diartrodial sana es una estructura especializada compuesta por varios tejidos conjuntivos (músculos, tendones, ligamentos, cápsula, membrana sinovial, cartílago y hueso) cuya función principal es facilitar la locomoción; por lo que, con el fin de poder mantener su buen funcionamiento, esta estructura necesita autorregularse continuamente mediante mecanismos homeostáticos (37). Así, la membrana sinovial juega un papel clave en el mantenimiento de dicha homeostasis dentro de la articulación. Por ello, durante el proceso artrítico, la estructura articular normal se ve progresivamente comprometida debido a la inflamación de la membrana sinovial, que no es capaz de revertir la situación y, finalmente, lleva a la pérdida de la función articular (38).

A continuación, se detalla la estructura y morfología de la membrana sinovial, con el fin de conocer más en profundidad el fenómeno inflamatorio que se produce dentro de la articulación y conduce a la sinovial a convertirse en un tejido invasor y destructivo.

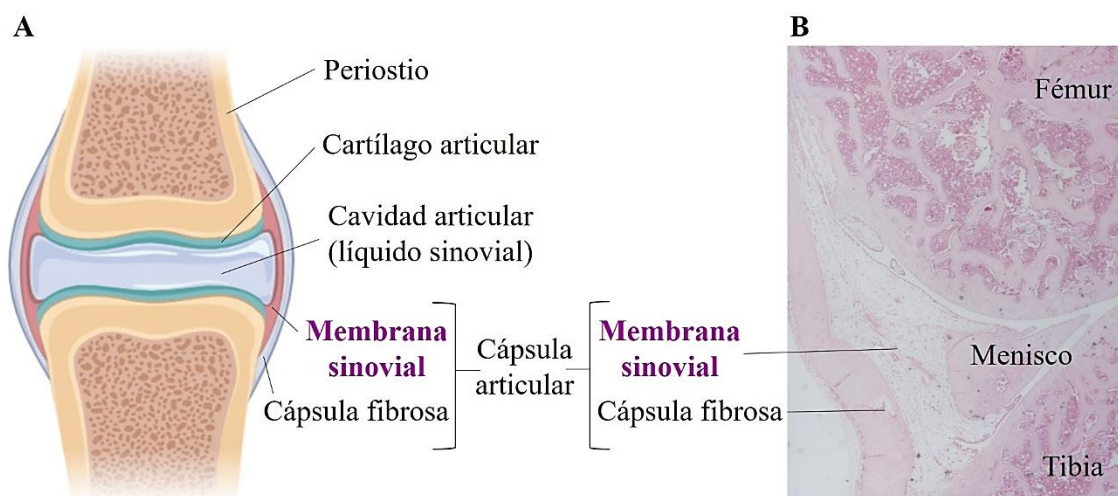
#### 3.1. EL TEJIDO SINOVIAL.

La membrana sinovial es una fina capa especializada de tejido conjuntivo blando que se sitúa entre la cavidad articular (que contiene el líquido sinovial) y a la que limita, y la capa externa de tejido denso, conocida como cápsula fibrosa. Ambas capas constituyen la cápsula articular y la membrana sinovial, tapiza su interior. Ésta se inserta en la interfase hueso-cartílago y se prolonga hacia el periostio extraarticular (**Figura 3**); y también se encuentra tapizando la cara interna de las vainas tendinosas y de las bolsas articulares (37,39).

Dentro de la cápsula articular la membrana sinovial participa activamente regulando numerosas funciones biológicas: actúa como un “embalaje” deformable y no adherente que permite el movimiento continuado entre los tejidos óseos adyacentes; confiere defensa inmunitaria; ejerce cierto control sobre la circulación, la temperatura, la presión, la inervación, etc. Además, se encarga de la elaboración del líquido sinovial, un líquido claro y viscoso cuyo constituyente principal es el ácido hialurónico, y que proporciona la mayor vía de lubricación del cartílago y nutrición de los condrocitos dentro de las articulaciones. La perturbación de algunos de estos parámetros puede ocasionar dolor, disfunción y lesión tisular llegando a destruir la articulación. De este modo, tener un

## INTRODUCCIÓN

mejor conocimiento y comprensión de esta estructura puede ayudar a prevenir o curar algunos de sus trastornos (37,40).



**Figura 3. Anatomía de la articulación sinovial.** (A) Representación gráfica de la estructura de una articulación sinovial de rodilla. (B) Imagen representativa de la sección sagital de una articulación de rodilla de rata. La tinción empleada es hematoxilina y eosina (H-E). Magnificación de 2x. Imagen de autoría propia creada con la aplicación BioRender.com.

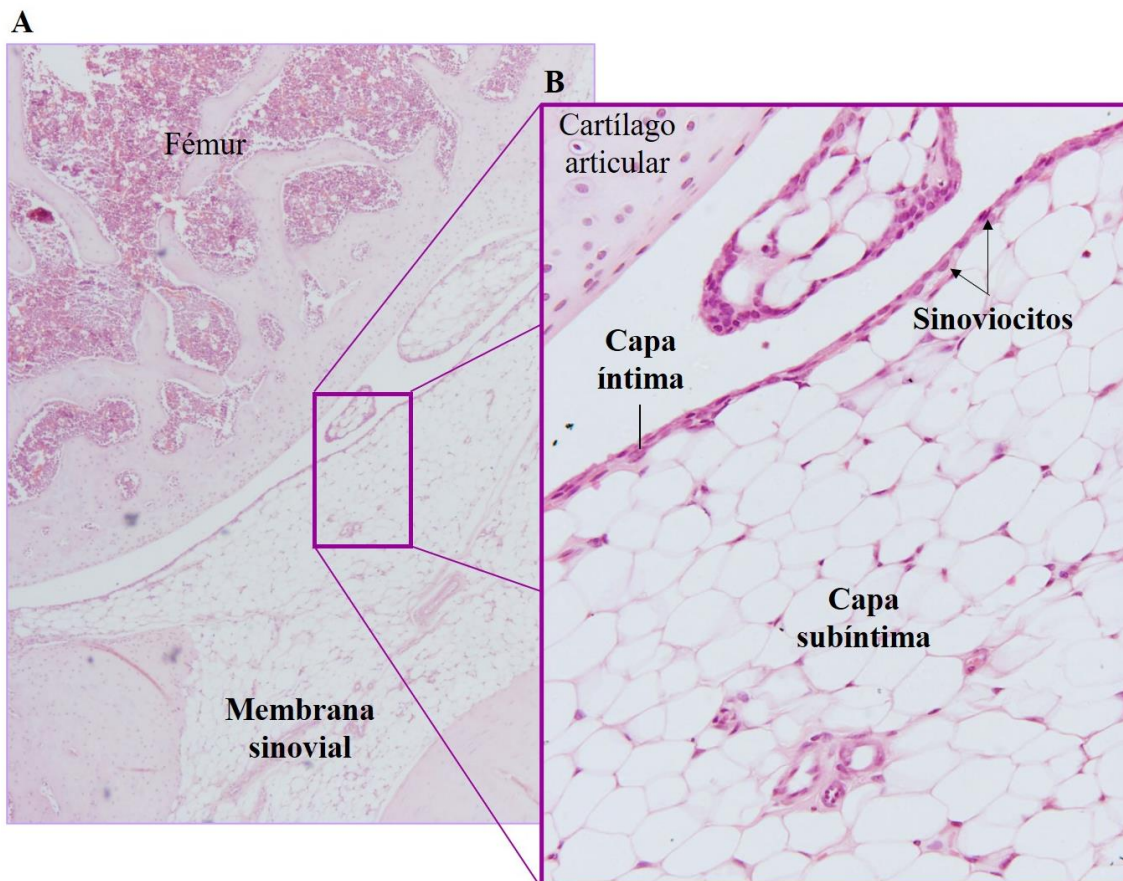
### 3.2. CARACTERÍSTICAS ANATÓMICAS Y FUNCIONALES DE LA SINOVIAL SANA.

La membrana sinovial es un tejido relativamente acelular constituido fundamentalmente por dos capas contiguas bien diferenciadas tanto en anatomía como en función: una capa superficial o íntima, y una capa subyacente o subíntima (**Figura 4**).

- **Capa íntima:** también conocida como capa sinovial, es la capa superficial de la membrana sinovial, por lo que se encuentra en contacto directo con la cavidad articular. Su extensión es de 20-40  $\mu\text{m}$  y habitualmente está formada por 2-3 capas de células conocidas como sinoviocitos, que se dividen principalmente en dos tipos, sinoviocitos de tipo A (células derivadas de los macrófagos) y sinoviocitos de tipos B (células derivadas de los fibroblastos) (41,42). Además, se trata de una estructura poco organizada, avascular y carece de una membrana basal que le ofrezca soporte. Se considera la capa funcional del tejido sinovial, ya que en ella se produce el líquido sinovial (42).

- **Capa subíntima:** es la capa más profunda del tejido sinovial. Presenta una estructura aún más desorganizada que la capa íntima, consistiendo en una malla de tejido conjuntivo laxo que permite el movimiento libre de la membrana. En ella se encuentran fibroblastos

y macrófagos, intercalados y dispersos inmediatamente por debajo de la capa íntima y alrededor de los numerosos vasos sanguíneos, que se apoyan en una red de tejido adiposo abundante (40,42).



**Figura 4. Anatomía de la membrana sinovial.** Imágenes representativas del tejido sinovial de la articulación de rodilla de rata a distintos aumentos. La tinción empleada es H-E. (A) Magnificación de 4x. (B) Magnificación de 20x.

- **Sinoviocitos tipo A:** son los macrófagos que residen de forma constitutiva en la membrana sinovial (38) localizados normalmente en la parte superior de la capa íntima donde conforman una minoría (10-20%) (39). Su función es mantener la homeostasis articular mediante la fagocitosis de bacterias y otros desechos celulares, además de un buen equilibrio entre los niveles de citoquinas proinflamatorias y antiinflamatorias presentes en el líquido sinovial (43). Así, debe destacarse que expresan el MHC-II con un papel fundamental en la presentación del antígeno, por lo que estas células son esenciales durante las etapas iniciales de la respuesta inmune (39).

- **Sinoviocitos tipo B:** son similares a fibroblastos y constituyen aproximadamente el 75% de todas las células en la sinovial sana. Su principal función es la síntesis proteica, ya que

## INTRODUCCIÓN

sintetizan las proteínas de la matriz extracelular y las proteasas necesarias para su renovación, como las catepsinas, las serinas proteasas y las metaloproteinasas de matriz (MMPs; del inglés: *Matrix Metalloproteinases*). Además, controlan la composición del líquido sinovial, mediante la síntesis y secreción de compuestos como el ácido hialurónico y la lubricina, esenciales para la lubricación articular (37,43). A partir de ahora nos referiremos a ellos como sinoviocitos.

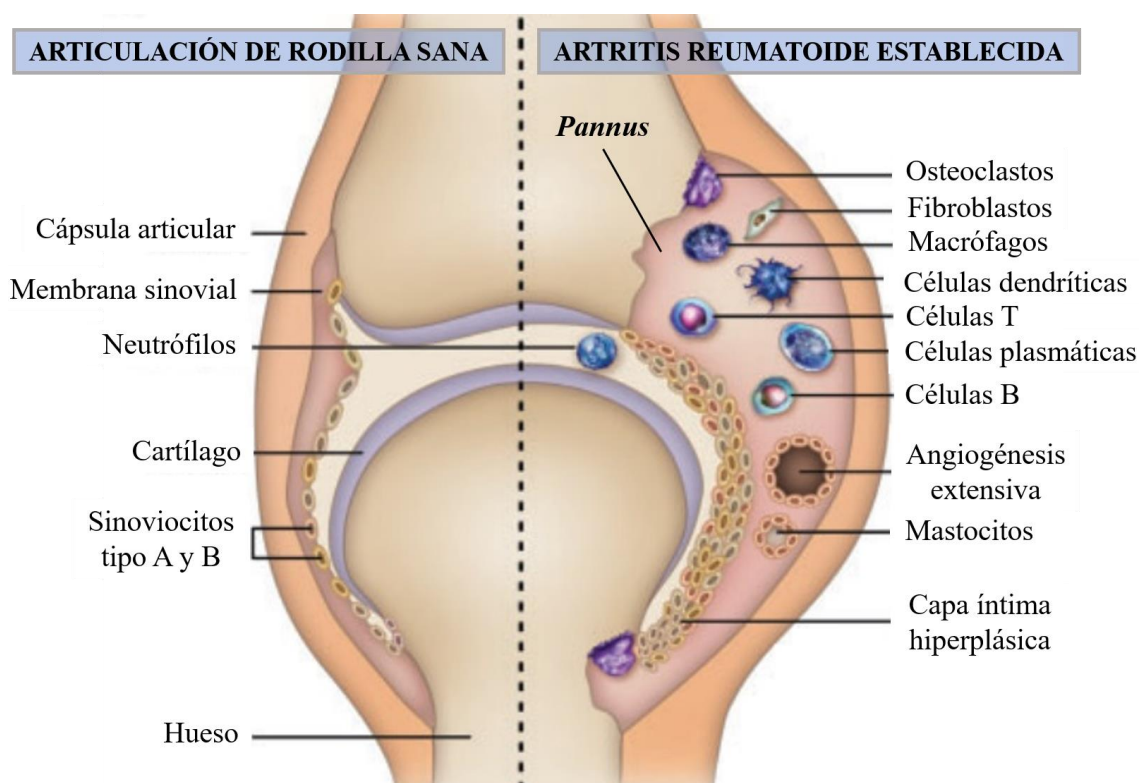
### 3.4. TRANSICIÓN DE LA SINOVIOL SANA A LA SINOVIOL ARTRÍTICA: SINOVITIS.

Histológicamente, la sinovial AR resulta llamativa, ya que se transforma de una estructura relativamente acelular e inactiva a un tejido invasivo en el que se reúnen procesos de neovascularización, hiperplasia celular, afluencia de células inflamatorias, cambios en la expresión de moléculas de adhesión celular y liberación de un amplio abanico de moléculas inflamatorias. En conjunto, estos procesos determinan la inflamación del tejido sinovial o sinovitis, que detallamos a continuación.

Durante las fases más tempranas de la patología artrítica se desencadena una sinovitis aguda, donde la capa íntima y subíntima de la sinovial sufren importantes cambios. Se produce la hiperplasia la capa íntima de la sinovial, expandiéndose entre 10 y 20 capas de profundidad, principalmente debido a que los sinoviocitos se vuelven hipertróficos (43–45). Simultáneamente, la capa subíntima también sufre alteraciones notables en el número y el contenido celular debido a la proliferación e infiltrado de células inflamatorias, así como el aumento de la proliferación y supervivencia de las células residentes, dando lugar a la formación de nuevo tejido (45). Esto contribuye a un proceso de hipoxia local seguida de neoangiogénesis (44), es decir, formación de nuevos vasos sanguíneos. Estos nuevos vasos además de aportar oxígeno, son necesarios para apoyar la proliferación sinovial, permitiendo el infiltrado masivo de células del sistema inmune, que incluyen mayoritariamente células T, células B, monocitos, macrófagos y células plasmáticas (45). A pesar de haber discrepancias en muchos estudios, en su mayoría apuntan a que los macrófagos predominan ampliamente en la sinovial AR (hasta un 80% de las células) quizá debido al reclutamiento de monocitos circulantes desde la médula ósea (37,41). Los macrófagos muestran un fenotipo altamente activado capaz de producir un amplio abanico de citoquinas proinflamatorias, quimiocinas y factores de crecimiento que probablemente, sean a su vez, los responsables de la activación de los sinoviocitos

locales de la capa íntima que adquieren un fenotipo altamente agresivo, produciendo su propio conjunto de mediadores, especialmente citoquinas inflamatorias, prostaglandinas, MMPs, factores de crecimiento y quimiocinas proangiogénicas. Este proceso se repite en bucle perpetuando la sinovitis, reclutando nuevas células a la articulación y contribuyendo a la destrucción de la matriz extracelular.

Así, con el paso del tiempo, la sinovitis se hace crónica. La membrana sinovial se engrosa y se va formando un tejido nuevo localmente invasivo característico de la AR ya establecida denominado *pannus*. El *pannus* está principalmente compuesto por macrófagos, osteoclastos y sinoviocitos activos que le confieren la capacidad de degradar el cartílago articular llegando a erosionar el hueso (41). Los distintos eventos que convergen durante el proceso de transición de la sinovial normal a la sinovial artrítica se reflejan en la **Figura 5**.



**Figura 5. Evolución del proceso patogénico de la AR.** Representación esquemática y comparativa entre la membrana sinovial de una articulación de rodilla sana y de una AR establecida. En la transición entre ambas se encuentran involucrados diversos tipos celulares y la consecución de múltiples eventos que como resultado final dan lugar a la formación del *pannus* característico de la AR crónica. Imagen obtenida y modificada del artículo *Understanding the dynamics: pathways involved in the pathogenesis of rheumatoid arthritis* (Choy E; 2012) (46).

## INTRODUCCIÓN

### 4. MECANISMOS DE MUERTE CELULAR PROGRAMADA.

En el apartado anterior se ha detallado como la proliferación de las células residentes de la sinovial junto con la inflamación crónica y el infiltrado descontrolado de células del sistema inmune da lugar a la formación de un tejido anormal conocido como *pannus* invasivo o sinovial. Sumado a todos estos eventos, se ha sugerido que un ratio reducido de muerte celular programada podría ser una explicación de por qué finalmente se desarrolla el *pannus* invasor (47). Pero, ¿qué es la muerte celular programada?

La muerte celular es un proceso fisiológico involucrado en el mantenimiento de la homeostasis tisular durante el desarrollo normal de las diferentes estructuras, el proceso natural de envejecimiento o en caso de lesión, y actúa estableciendo un equilibrio entre la cantidad de células nuevas y aquellas que son eliminadas por ya no ser útiles, estar dañadas o ser potencialmente dañinas. De esta forma, una muerte celular defectuosa puede desembocar en un escenario patológico (48,49). Tanto es así, que la proliferación celular incontrolada resulta en el desarrollo de enfermedades como el cáncer o la AR, mientras que un nivel excesivo de muerte celular puede desembocar en enfermedades como el Alzheimer o el Parkinson. Para poder desarrollar tratamientos efectivos para estas enfermedades, caracterizadas por anomalías en la regulación de la muerte celular, es necesario comprender las diferentes maneras en que las células pueden perder su viabilidad y eventualmente morir (48).

De esta forma, que las células puedan morir ocasionalmente no es un hecho que cause gran asombro, pero, ¿cómo es posible que las células puedan morir en lo que parece ser una forma “programada”? Basándose en el aspecto característico de las células cuando mueren en diferentes circunstancias, en 1972, Kerr J. y colaboradores propusieron que la muerte tanto de algunas células normales, así como algunas patológicas, son suicidios (50). Es decir, las células participan de forma activa en su propia destrucción mediante la activación de diferentes mecanismos moleculares como consecuencia de la exposición a estímulos específicos. Este proceso, en el que diferentes mecanismos genéticos y bioquímicos intervienen de forma controlada en la muerte de la célula hasta alcanzar el denominado “punto de no retorno” es ahora conocido como muerte celular programada (51) e inicialmente se le acuñó el término apoptosis (50).

Tras reconocer inicialmente a la apoptosis como un mecanismo de muerte celular programada, las alteraciones morfológicas que presentan las células muertas junto con los



mecanismos por los cuales se eliminan éstas y sus fragmentos se han empleado durante años para clasificar la muerte celular en tres tipos diferentes: muerte celular tipo I o apoptosis, muerte celular tipo II o autofagia y muerte celular tipo III o necrosis (52,53); pero el último Comité de Nomenclatura de Muerte Celular de 2018, propone una clasificación más actualizada y completa, centrada en aspectos morfológicos, moleculares y funcionales del proceso de muerte celular. Así, se han llegado a identificar hasta 12 tipos distintos de muerte celular (54) que se pueden ejecutar siguiendo rutas de señalización distintas o superpuestas, llegando a compartir un mismo proceso molecular (49,55). En este trabajo, analizaremos con minuciosidad la apoptosis y la autofagia, dos de las modalidades de muerte celular programada que han recibido más atención hasta el momento, tratando de profundizar en sus mecanismos de actuación y regulación.

### 4.1. MUERTE CELULAR PROGRAMADA TIPO I/APOPTOSIS.

La apoptosis o muerte celular programada tipo I es la forma más común de muerte celular (56). Morfológicamente, exhibe una serie de alteraciones muy organizadas que incluyen la contracción citoplasmática, la condensación de la cromatina, la fragmentación nuclear y la formación de vesículas en la membrana plasmática (50,54). Todos estos eventos culminan con la formación de pequeñas vesículas conocidas como “cuerpos apoptóticos” que encierran los componentes intracelulares (56). Estos compartimentos pueden ser fácilmente captados por células vecinas con actividad fagocítica y degradados dentro de los lisosomas (54), por lo que suponen un mecanismo estratégico para contener posibles moléculas asociadas a daño (DAMPs; del inglés: *Damage-Associated Molecular Patterns*) y prevenir así, una respuesta inmune no deseada (56).

Hasta la fecha, se han descrito dos vías principales de señalización que pueden desencadenar la ejecución de la muerte celular apoptótica: la vía extrínseca, en la que se encuentra involucrada la interacción clásica entre ligando y receptor (conocido como receptor de muerte) en la superficie celular y la vía intrínseca o mitocondrial (55). Ambas rutas de señalización implican la activación de una familia de enzimas denominadas caspasas (57). Antes de adentrarnos en los mecanismos que caracterizan a cada una de las vías de actuación que presenta la apoptosis, pondremos en contexto qué son las caspasas.

## INTRODUCCIÓN

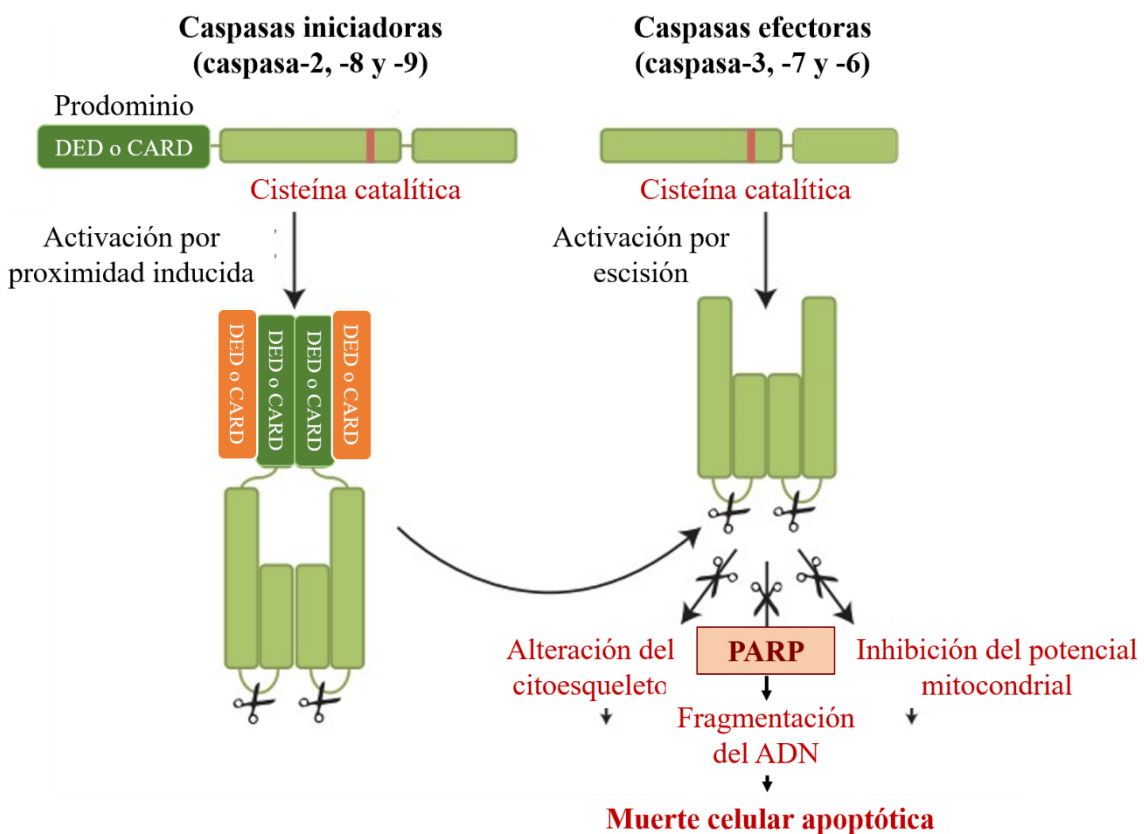
### 4.1.1. Mediadores de la apoptosis: las caspasas.

La apoptosis implica la activación de caspasas, encargadas de iniciar y ejecutar todos los eventos que dan lugar a las alteraciones morfológicas que caracterizan a este tipo de muerte celular. A día de hoy se conocen 14 tipos de caspasas diferentes (58); si bien, comparten algunas propiedades. Son proteasas dependientes de cisteína que presentan una gran especificidad por los residuos de ácido aspártico de sus sustratos y todas ellas son sintetizadas como proenzimas inactivas a las que se conoce como procaspasas. Las procaspasas presentan una única cadena compuesta por tres dominios definidos; el dominio amino-terminal de tamaño variable y dos subunidades catalíticas, una grande (p20) que contiene el centro activo con cisteína y una pequeña (p10) (59,60). Estas procaspasas se convierten en su forma activa a través de la proteólisis en los residuos internos de Asp, de forma que las caspasas pueden llevar a cabo su autoactivación o bien, pueden ser activadas por otras caspasas (59).

Tal y como se muestra en la **Figura 6**, las caspasas implicadas en la apoptosis se han clasificado en iniciadoras o efectoras atendiendo a su activación y al papel que juegan en la cascada de señalización de este proceso (55).

- **Caspasas iniciadoras:** son las caspasas -2, -8, -9 y -10. Se encuentran como monómeros inactivos en las células y su activación se realiza mediante proximidad, al contrario de lo que sucede con las caspasas efectoras que requieren la escisión de la proteína. Estas caspasas son reclutadas por moléculas adaptadoras en plataformas de activación que fuerzan a los monómeros a estar muy próximos. La proximidad provoca cambios conformacionales que dan como resultado la formación de sitios activos. La interacción entre las proteínas adaptadoras y las caspasas involucran dominios presentes en ambas moléculas: el dominio reclutador de caspasas (CARD; del inglés: *Caspase-Recruitment Domain*) o el dominio efector de muerte (DED; del inglés: *Death Effector Domain*). En algunos casos, pero no en todos, es necesario la posterior autoescisión de las propias caspasas con el fin de estabilizar a la enzima activa madura. Las caspasas iniciadoras y su activación definen la vía de señalización de la apoptosis, tal y como veremos más adelante.

- **Caspasas efectoras:** son las caspasas -3, -7 y -6. Son las encargadas de efectuar la destrucción asociada a la apoptosis. Al contrario que las caspasas iniciadoras, se sintetizan como dímeros inactivos carentes de dominios de interacción con otras proteínas. Su activación se produce tras la escisión proteolítica de las que serán las subunidades grande y pequeña de la enzima madura. Tras la escisión, los nuevos extremos se pliegan en la interfaz del dímero y promueven cambios conformacionales que dan lugar a la creación de dos sitios activos en la caspasa madura. La escisión de la caspasa-6 es mediada por las caspasas-3 y -7, mientras que la activación de estas dos, es función de las caspasas iniciadoras. Una vez activadas, estas caspasas efectúan la destrucción celular mediante la escisión de sus sustratos.



**Figura 6.** Activación de las diferentes caspasas implicadas en el proceso de muerte celular programada por apoptosis. Imagen tomada y modificada del artículo *Cell Death Signaling* (Green DR; 2015) (55).

Asimismo, existe un tercer grupo de caspasas que experimentan su activación durante las respuestas inflamatorias y que trataremos en detalle más adelante.

## INTRODUCCIÓN

### 4.1.2. Apoptosis: rutas de actuación.

Los mecanismos moleculares que subyacen a la apoptosis han sido investigados de forma exhaustiva en las últimas décadas y a día de hoy se conocen dos vías de señalización principales que median este tipo de muerte celular: la vía extrínseca y la vía intrínseca o mitocondrial de la apoptosis. Ambas rutas se detallan a continuación y aparecen representadas en la **Figura 7**.

- **Vía extrínseca o de receptor de muerte:** esta ruta se inicia en la membrana plasmática, cuando un ligando extracelular como FasL, el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ; del inglés: *Tumor Necrosis Factor- $\alpha$* ) o el ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF (TRAIL), entre otros, se unen a sus respectivos “receptores de muerte” transmembrana en la superficie celular. A partir de ahora pondremos como ejemplo la vía iniciada por el ligando FasL y su receptor Fas, ya que la secuencia de eventos que caracterizan la vía extrínseca se encuentra bien caracterizada siguiendo este modelo (61). La unión del receptor Fas con su ligando estimula el reclutamiento del adaptador de proteínas citoplasmático FADD (del inglés: *Fas-Associated Death Domain*) que se une Fas a través del dominio de muerte. A continuación, FADD se asocia con la pro-caspasa-8 o -10 (aunque la participación de ésta última en la apoptosis aún no está del todo clara) promoviendo la formación del complejo de señalización inductor de muerte (DISC; del inglés: *Death-Inducing Signaling Complex*), que desencadena la activación autoproteolítica de las caspasas reclutadas, cuyas unidades catalíticas se liberan al citoplasma (54,62). Dependiendo del contexto, la caspasa-8 activa es suficiente para llevar a cabo la activación de las caspasas efectoras y dirigir el proceso hacia la fase de ejecución de la apoptosis; sin embargo, en ocasiones la cantidad es demasiado pequeña y las mitocondrias cumplen la función de “amplificadores” de la señal apoptótica, tal y como explicaremos en la ruta mitocondrial de la apoptosis (61).

- **Vía intrínseca o mitocondrial/ apoptosoma:** las mitocondrias juegan un papel indiscutible en la muerte celular por apoptosis. Diversas fuentes de estrés celular como la privación de nutrientes o el daño en el ADN son capaces de dirigir la muerte celular a través de la vía mitocondrial de la apoptosis. Esta vía requiere de la permeabilización de la membrana externa de la mitocondria impulsada por efectores proapoptóticos de la familia BCL-2 (del inglés: *B cell Lymphoma 2*), principalmente BAX y BAK, que inician la cascada de señalización que conduce a la muerte celular. La apoptosis mediada por la

mitocondria requiere que a través de la permeabilización de su membrana externa se liberen proteínas solubles desde el espacio intermembrana al citosol. Entre estas proteínas del espacio intermembrana, el citocromo c, un componente esencial de la cadena de transporte de electrones, se une a la molécula adaptadora del factor activador de peptidasa apoptótica 1 (APAF1; del inglés: *Apoptotic Peptidase Activating Factor 1*), formando un complejo al que se conoce como apoptosoma. El apoptosoma, a su vez, se une y activa a la caspasa-9 iniciadora que, seguidamente, escinde y activa las caspasas efectoras. La permeabilización de la membrana mitocondrial también provoca la liberación de otras proteínas, entre las que se incluyen SMAC y OMI, que bloquean el inhibidor de la caspasa-9 XIAP, lo que facilita la apoptosis. Asimismo, tal y como se mencionó en el apartado anterior, cuando la cantidad de caspasa-8 es insuficiente para mediar la muerte celular, la vía apoptótica extrínseca se cruza con la vía mitocondrial. Para ello, la caspasa-8 media en la escisión del agonista de muerte con dominio de interacción BH3 (del inglés: *BCL-2 Homology 3*) (BID; del inglés: *BH3 Interacting-Domain Death Agonist*), miembro de la familia BCL-2 que genera tBID que se transloca a la mitocondria, induciendo de forma potente la permeabilización de su membrana (63).

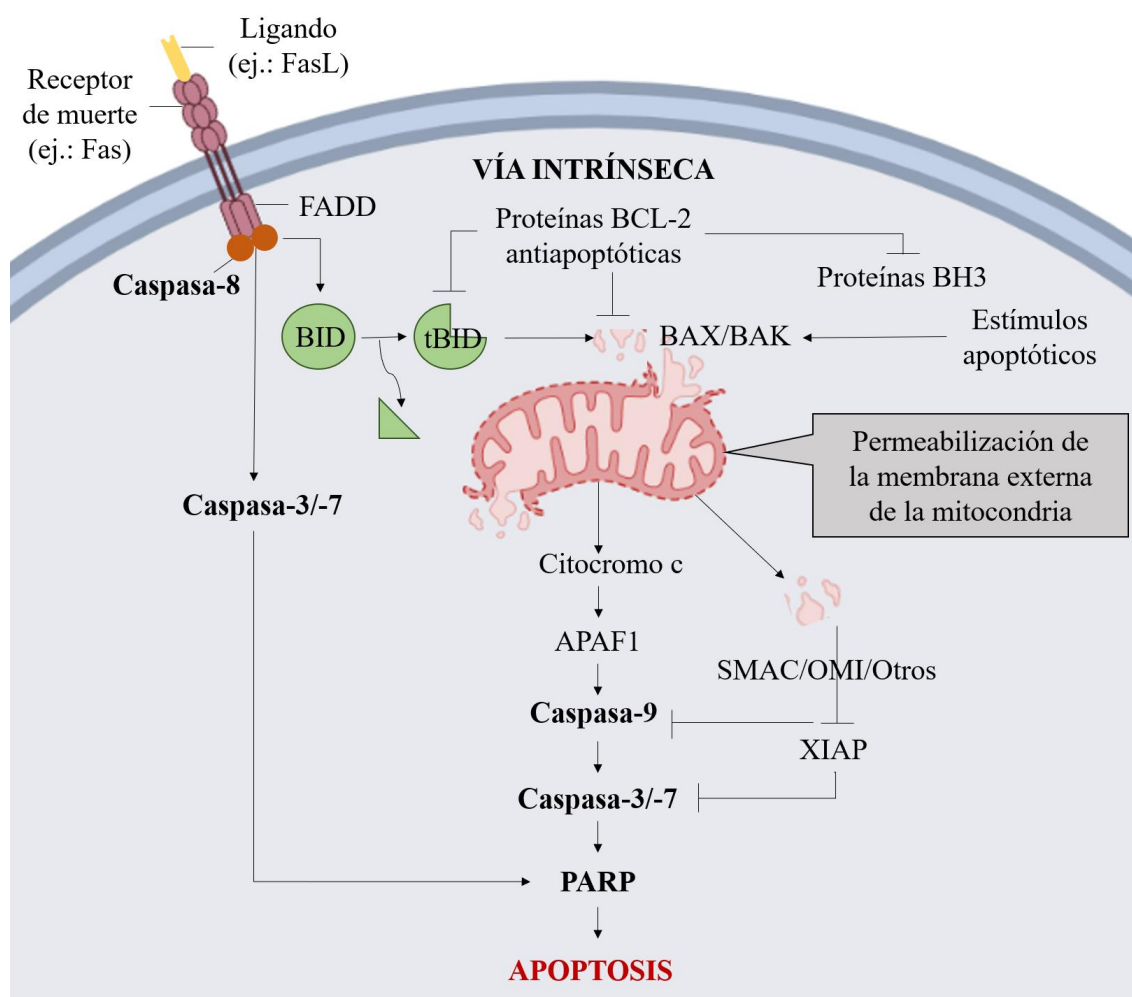
### 4.1.3. Ejecución de la apoptosis.

A pesar de que las dos rutas de la apoptosis son muy diferentes, ambas tienen en común una última fase de ejecución de la muerte celular que se caracteriza por ser irreversible y que implica la activación de las caspasas-3 y -7 efectoras (**Figura 7**). Tras su activación, estas caspasas inician la degradación de al menos 1000 proteínas diferentes dando lugar a una ganancia o pérdida de función de las mismas que finalmente, conduce a los cambios bioquímicos y morfológicos característicos de la apoptosis (55,64). Entre los sustratos de las caspasas efectoras, también conocidos como “sustratos de muerte”, se encuentran los filamentos intermedios de clase V nucleares, cuya escisión se encuentra involucrada en la condensación de la cromatina y la contracción del núcleo; el inhibidor de la ADNasa CAD (del inglés: *Caspase-Activated DNase*), iCAD, cuya escisión provoca la liberación de la endonucleasa que se transloca al núcleo donde lleva a cabo la fragmentación del ADN y, asimismo, las proteínas citoesqueléticas actina, plectina, Rho quinasa-1 y gelsolina, que al ser escindidas conducen a la fragmentación celular, a la formación de vesículas celulares y a la formación de los cuerpos apoptóticos (64). De igual forma, durante el proceso apoptótico uno de los sustratos con mayor relevancia es la poli-ADP

## INTRODUCCIÓN

ribosa polimerasa (PARP). El sustrato PARP es degradado por la caspasa-3, de su forma nativa de 116 kDa en un producto de 85 kDa que actúa como un marcador temprano de la apoptosis y que solo existe en células apoptóticas (65). PARP es una proteína nuclear multifuncional que está implicada en la detección y señalización de daños en las cadenas de ADN y, por lo tanto, se encuentra implicado en su reparación cuando el nivel de daño es muy pequeño, promocionando así la supervivencia de la célula. Por el contrario, en un contexto donde existe un elevado daño en el ADN, PARP actúa promoviendo la muerte celular por apoptosis. Así, la caspasa-3 reconoce la señal de localización nuclear de su sustrato PARP y lo escinde haciéndolo inactivo, lo que conduce a la consiguiente fragmentación del ADN (66), tal y como se refleja en la **Figura 6**. Por lo tanto, dado su nivel de implicación en el proceso, tanto la caspasa-3 activa como su sustrato PARP se consideran ejecutores clave de la muerte celular por apoptosis, cuyas vías de señalización se esquematizan en la **Figura 7**.

### VÍA EXTRÍNSECA



**Figura 7. Rutas de señalización apoptóticas.** Imagen representativa de las dos vías de ejecución de la apoptosis: la vía extrínseca (o de receptor de muerte) y la vía intrínseca (o mitocondrial). La vía extrínseca necesita que se produzca la unión entre un ligando y su receptor de muerte, provocando la activación de la caspasa-8 y ésta, a su vez, escinde y activa las caspasas-3 y -7. La vía intrínseca es inducible por múltiples estímulos; éstos, producen la activación de las proteínas BH3 que, a su vez, activan a BAX y BAK, desencadenando la permeabilización de la membrana externa mitocondrial. La liberación de distintas proteínas mitocondriales (citocromo c) da lugar a la formación del apoptosoma, el reclutamiento de caspasa-9 y finalmente, la activación de las caspasas-3 y -7 ejecutoras. Imagen tomada y modificada del artículo *Mitochondria as multifaceted regulators of cell death* (Bock FJ; 2020) (63). Imagen de autoría propia creada con la aplicación BioRender.com.

#### 4.1.4. Papel de la apoptosis en la sinovial AR.

En el apartado 4 se hizo una breve referencia a como un ratio alterado de muerte celular podría contribuir activamente al desarrollo de la sinovitis y, finalmente, la formación del *pannus* sinovial; es decir, la hiperplasia sinovial podría ser consecuencia de un proceso apoptótico alterado en un contexto de proliferación celular desmedida, como la observada en la sinovial artrítica. A este respecto, Korb A. y colaboradores señalaron que los sinoviocitos artríticos experimentan cambios fundamentales durante el curso de la enfermedad, adoptando un fenotipo activado “similar a un tumor” asociado a la adquisición de resistencia frente a la apoptosis (47). De esta forma, numerosos eventos que confluyen en el ambiente sinovial de la AR promueven la supervivencia de los sinoviocitos y obstaculizan su eliminación a través de la apoptosis (41). Una de las posibles explicaciones que se ha sugerido a este fenómeno es que la presencia de infiltrado celular inmune confiere a los sinoviocitos, y viceversa, una baja sensibilidad frente a los mediadores endógenos que regulan el equilibrio entre la supervivencia y la apoptosis, sesgando de esta forma el equilibrio hacia la supervivencia celular. A ello, se suman los elevados niveles de mediadores proinflamatorios que se observan en la sinovial y contribuyen, en gran medida, a favorecer la supervivencia de los sinoviocitos activos (41,67). Asimismo, se ha demostrado como las células presentes en la sinovial AR muestran una expresión incrementada de las proteínas antiapoptóticas de la familia BCL-2 (BCL-2 y MCL-1) que actuarían restringiendo la susceptibilidad a la vía intrínseca de la apoptosis (41,68). En concordancia, se ha observado en estudios *in vitro* con sinoviocitos artríticos que la estimulación de estas células con mediadores proinflamatorios como TNF- $\alpha$  o la interleuquina (IL)-1 $\beta$  incrementa la expresión de BCL-2 y, por lo tanto, las protege de la muerte celular en un ambiente inflamatorio. Además, en ocasiones esta expresión se encuentra localizada en los agregados linfoides, lo que podría sugerir un mecanismo protector de las células T y B frente a la muerte celular (68).

## INTRODUCCIÓN

En esta línea, la supervivencia de los linfocitos T asegura que tanto las células no inmunes, como los sinoviocitos, así como las células inmunes entre las que se incluyen las células B, macrófagos, células dendríticas, mastocitos o neutrófilos continúen sobreviviendo en la sinovial AR donde perpetúan el proceso inflamatorio crónico de la AR (67,69).

### 4.2. MUERTE CELULAR PROGRAMADA TIPO II/AUTOFAGIA.

Originalmente la autofagia se identificó como una estrategia para la supervivencia celular durante la falta de nutrientes u otras situaciones de estrés, pero se ha observado como es capaz de mediar en la muerte de la célula dependiendo del contexto en el que se encuentra. De esta forma, la muerte celular por autofagia no es apoptótica ni necrótica, por lo que es independiente de caspasas y se conoce como muerte celular programada tipo II (*versus* muerte celular programada tipo I o apoptosis).

La muerte celular por autofagia es el resultado de la inducción desmedida del proceso autofágico como consecuencia de un daño intracelular o una cantidad de orgánulos no funcionales excesivamente elevados; por lo que una vez es llevado al límite y ha alcanzado el “punto de no retorno”, concluye con la muerte de la célula. Ésta se caracteriza morfológicamente por la acumulación de vesículas citoplasmáticas (se produce la destrucción de grandes cantidades de citoplasma) resultando en una atrofia celular irreversible y el consecuente colapso de funciones celulares cruciales (70–72). Este tipo de muerte se trata de un proceso regulado y catabólico dependiente de la actuación lisosomal, que facilita por tanto que las células eliminen componentes celulares que están dañados o han dejado de ser funcionales (mitocondrias, retículo endoplasmático, peroxisomas), proteínas que están mal plegadas o patógenos, para así poder conservar la homeostasis celular (71). Hasta el momento, se han identificado tres formas principales de autofagia: macroautofagia, en la nos centraremos a partir de ahora y referiremos a ella como autofagia, microautofagia y autofagia mediada por chaperona; a pesar de sus diferencias, todas ellas presentan un punto en común, la degradación de los componentes citosólicos en el lisosoma (57,73).



### 4.2.1. La autofagia: el proceso.

El comienzo de la autofagia tiene lugar cuando en un contexto de estrés celular, como podría ser la escasez de nutrientes, se inactiva la diana del inductor autofágico rapamicina, mTOR (del inglés: *Mammalian Target of Rapamycin*). Cuando mTOR es inhibido se desencadena el proceso autofágico, caracterizado por una serie de eventos consecutivos mediados todos ellos por diferentes proteínas autofágicas conocidas por las siglas ATG (del inglés: *Autophagy-Related Proteins*) en levaduras (74). Uno de los eventos más tempranos en el proceso de autofagia es el ensamblaje y activación del complejo proteico ULK1 (del inglés: *unc-51 Like Autophagy Activating Kinase 1*) tras la fosforilación de la quinasa activadora del proceso autofágico ULK1, homólogo de ATG1. Simultáneamente, se produce el inicio de la formación de membranas de aislamiento únicas conocidas como fagóforos, proceso también conocido como nucleación. Dicho fagóforo está formado a partir de contribuciones de membrana de diferentes orgánulos, incluyendo el retículo endoplasmático, el aparato de Golgi y la mitocondria. Una vez activo, el complejo ULK1 se transloca al fagóforo promoviendo el ensamblaje de un complejo multiproteico con actividad fosfatidilinositol-3 quinasa de clase III (PI3K; del inglés: *Class III Phosphatidylinositol 3-Kinase*) (75). Este complejo contiene, entre otras, a la subunidad catalítica de la fosfatidilinositol-3 quinasa (PIK3C3; del inglés: *Phosphatidylinositol 3-Kinase Catalytic Subunit Type 3*) también conocida como VPS34 (del inglés: *Vacuolar Protein Sorting 34*) y a beclin-1 (homólogo de ATG6) (76). VPS34 cataliza la conversión del fosfatidilinositol al fosfatidilinositol-3 fosfato (PI3P; del inglés: *Phosphatidyl Inositol Triphosphate*), esencial para la expansión de la membrana y el reclutamiento de nuevas proteína ATG, y su interacción con beclin-1 promueve su actividad catalítica y por tanto, incrementa los niveles de PI3P en la membrana, impulsando así la nucleación de la membrana de aislamiento (73,75).

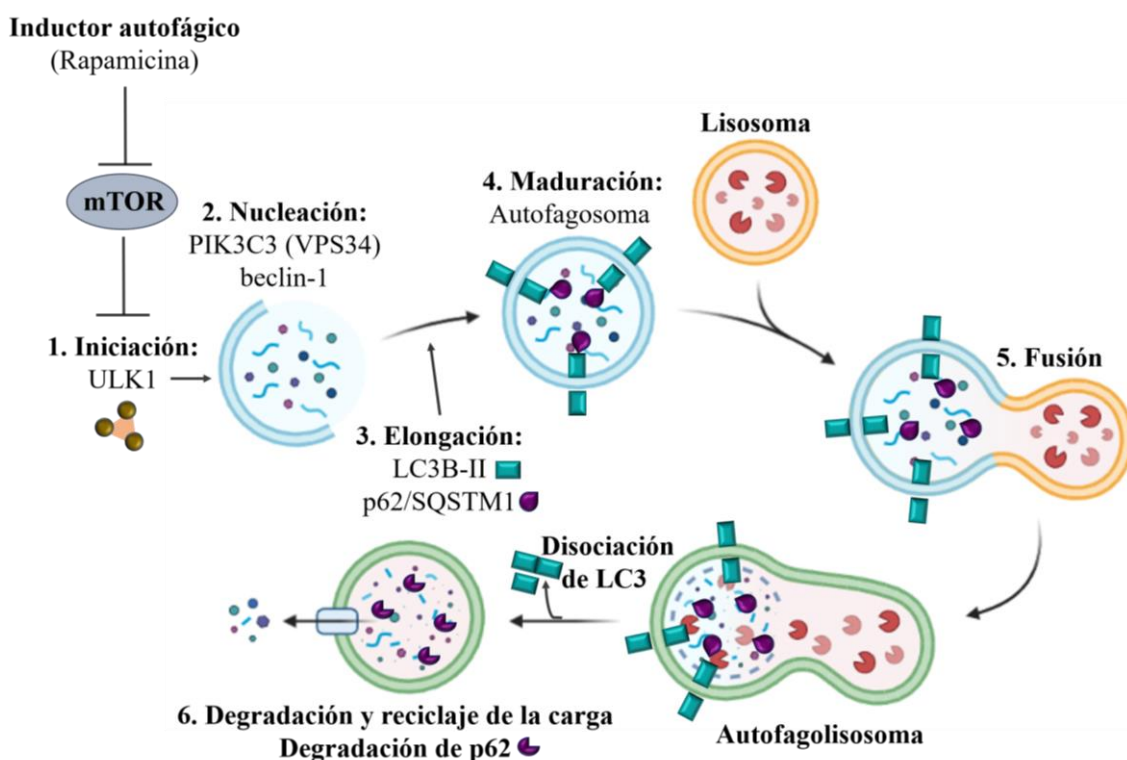
Tras la nucleación, el siguiente evento a tener en cuenta es la elongación; proceso en el que el fagóforo va envolviendo el contenido citoplasmático hasta su cierre, dando lugar a la formación de los autofagosomas (vesículas citoplasmáticas de doble membrana), que son característicos del proceso autofágico y aparecen en gran número. Para que un autofagosoma llegue a término es necesario el procesamiento del homólogo de ATG8, LC3 (MAP1LC3/ LC3; del inglés: *Microtubule-Associated Protein 1 Light Chain 3*), y más concretamente, LC3B. Esta proteína citoplasmática se expresa en la mayoría de las células y tras la inducción de la autofagia es escindida por ATG4 obteniendo así la forma

## INTRODUCCIÓN

soluble LC3B-I; y seguidamente, ésta se activa y conjuga con fosfatidiletanolamina, generando la forma finalmente procesada, LC3B-II. Ésta última es reclutada e integrada en la membrana del fagóforo en crecimiento gracias a la acción de ATG5 y ATG12 y se encuentra tanto en la cara interna como externa del que será el autofagosoma, donde juega un papel fundamental en la hemifusión de las membranas y en la selección de la carga citosólica que va a ser eliminada. La síntesis y procesamiento de LC3 aumentan durante la autofagia, por lo que se considera un indicador clave de los niveles de flujo autofágico en las células, ya que se encuentra presente durante y tras la formación de los autofagosomas (73,75). A medida que el autofagosoma crece, moléculas "adaptadoras" interactúan simultáneamente con LC3-II y los sustratos autofágicos promoviendo así su reclutamiento al autofagosoma y su posterior absorción y degradación selectivas. Una de las moléculas mejor caracterizadas a este respecto es p62/sequestosoma-1 (p62/SQSTM1), una molécula adaptadora multifuncional propuesta como sustrato selectivo de su receptor, LC3, que además de estar implicado en multitud de vías de señalización, promueve el recambio de los agregados citosólicos poliubiquitinizados a través de su dominio de unión a ubiquitina (70,73,77).

Una vez que el autofagosoma cargado madura y se cierra, se produce finalmente su fusión con el lisosoma, en una estructura conocida como autofagolisosoma, donde se produce la degradación de la carga celular por las hidrolasas lisosómicas (71,73). Para que se produzca dicha fusión es necesaria la acidificación lisosomal; de este modo inhibidores como la Cloroquina o la Bafilomicina A pueden provocar que el proceso autofágico no llegue a término ya que inhiben la etapa final de fusión al afectar a la acidificación del lisosoma (75). De esta forma, para que el proceso autofágico se complete, la carga citoplasmática debe ser degradada por diferentes enzimas lisosómicas como las catepsinas, que también pueden degradar la membrana interna del autofagosoma (73); asimismo, se ha observado que p62/SQSTM1 también es reconocido y degradado preferentemente durante el proceso autofágico, ya que en un contexto de deficiencia autofágica, este sustrato se acumula de forma considerable (77). Finalmente, los aminoácidos y los subproductos de la degradación lisosómica son exportados de nuevo al citoplasma, donde pueden reutilizarse para constituir nuevas macromoléculas o para el mantenimiento metabólico (73). El conjunto de eventos que caracterizan al proceso autofágico se resumen en la **Figura 8**.

Es importante destacar que varios autores han descrito una vía “no canónica” de autofagia. Este término se emplea para distinguir un proceso en el que la formación y maduración de los autofagosomas es independiente de beclin-1; pero esto no significa que no se pueda llevar igualmente a término el proceso autofágico mediante una ruta en la que seguirían implicados VPS34, ATG5 y LC3 (72,78,79).



**Figura 8. Eventos del proceso autofágico a nivel molecular.** La autofagia se organiza clásicamente en cinco etapas: (1) Iniciación del proceso autofágico con la formación del complejo ULK1; (2) Formación del fagóforo y nucleación. Se requiere el ensamblaje del complejo PI3K (PI3C3 y beclin-1); (3) Elongación. Reclutamiento de LC3 procesado a la membrana del fagóforo en crecimiento e interacción del adaptador p62/SQSTM1 con la carga citosólica. (4) Maduración. El fagóforo encierra la carga celular dando lugar al autofagosoma de doble membrana ya maduro. (5) Fusión. El autofagosoma y el lisosoma se fusionan dando lugar al autofagolisosoma. (6) Degradación proteolítica por enzimas lisosomales. La carga aleatoria o selectiva junto con el sustrato autofágico p62 es degradada y las moléculas resultantes son expulsadas para su posterior reciclaje y utilización en los distintos procesos celulares. Imagen de autoría propia creada con la aplicación BioRender.com.

### 4.2.2. Papel dual de la autofagia en la patología de la AR.

En el apartado 3.2. explicamos como en la mayoría de las circunstancias, la autofagia promueve la supervivencia celular adaptando a las células a condiciones de estrés, pero al mismo tiempo, este proceso también ha sido considerado como una muerte celular programada cuando se produce en exceso, conociéndose como muerte celular por

## INTRODUCCIÓN

autofagia. Este complejo comportamiento dual de la autofagia ha sido muy debatido en cáncer donde se han observado un gran número de evidencias que indican que la autofagia actuaría como un mecanismo supresor de tumores especialmente en las etapas iniciales de la formación del tumor (80), pero también posee la capacidad de proteger a diversas células tumorales de la apoptosis inducida por quimioterapia, tanto en estudios *in vitro* e *in vivo* (75,80). Sin embargo, y como acabamos de comentar, la inducción persistente de autofagia, también es responsable de inducir muerte celular. De este modo, la autofagia comúnmente sirve como un adaptador entre la supervivencia y la muerte celular (81) pero, ¿Qué papel desempeña la autofagia en la sinovial artrítica?

Al igual que en otras enfermedades autoinmunes, la autofagia desempeña un papel dual en la AR (49,82) mostrando un efecto tanto terapéutico como patogénico (83,84). Sumado a que una apoptosis deficiente de las células inflamatorias procedentes del torrente circulatorio y de los sinoviocitos residentes contribuye a su acumulación en la sinovial y a la persistencia de la AR (85), se ha descrito como en la sinovial de pacientes AR los niveles de autofagia se encuentran muy incrementados, correlacionándose con una enfermedad más severa (86). Además, una autofagia incrementada en las células T CD4+ tiene como resultado la hiperactivación de las células T y también contribuye a su resistencia a la apoptosis (69); y en la misma línea, niveles bajos de oxígeno en la articulación inflamada están inversamente relacionados con un incremento de la autofagia y consecuentemente de la inflamación sinovial y del daño oxidativo, dada la implicación de este tipo de muerte celular en la activación de la función inmune (87). Sin embargo, otros estudios han sugerido que el estrés severo en el retículo endoplasmático de sinoviocitos artríticos conduce a la muerte celular a través de la formación de vesículas autofágicas. En particular, Kato M. y colaboradores explican que: “en contraste con el fenotipo resistente a apoptosis del sinoviocito AR, se ha identificado un potencial talón de Aquiles en estas células al inducir la muerte celular por autofagia” (82); además, como ya hemos mencionado, se ha sugerido un papel crucial de la autofagia en la inflamación al prevenir la excesiva activación del complejo inflamasoma y en consecuencia de la citoquina maestra IL-1 $\beta$  (88). Asimismo se ha demostrado como el tratamiento combinado con los fármacos everolimus (inhibidor de mTOR) y metotrexato es eficiente en pacientes que han tenido una respuesta inadecuada a la monoterapia con metotrexato (89). Por todo ello, la autofagia parece estar relacionada con la AR, pero los datos que existen sobre dicha relación a día de hoy siguen siendo muy contradictorios.

### 4.3. BALANCE ENTRE APOPTOSIS Y AUTOFAGIA.

Apoptosis y autofagia se estudiaron durante mucho tiempo como dos mecanismos totalmente aislados que representaban dos estados celulares mutuamente excluyentes; en cambio, la constante acumulación de evidencias en la pasada década ha sugerido que estas dos modalidades de muerte celular programada podrían estar a menudo interconectadas por complejas redes de proteínas. Así, dependiendo del contexto que rodea a la célula, las dos vías principales de muerte celular cooperan en una interacción equilibrada que promueve la supervivencia o bien, la muerte de la célula. La interacción entre los componentes de ambas vías indica un complejo balance que suele iniciarse por los mismos estímulos, ejemplo de ello sería el estrés metabólico a través de la privación de factores de crecimiento o la limitación de nutrientes (53).

A pesar de que son muchas las proteínas implicadas en la interacción existente entre apoptosis y autofagia (**Tabla 1**), en este apartado nos centraremos en aquellas que son cruciales a la hora de dirigir el destino de la célula hacia su supervivencia o su muerte. Ejemplo de ello es el complejo formado por las proteínas de la familia BCL-2 y beclin-1. BCL-2, BCL-xL y MCL-1 están bien caracterizadas por papel en la inhibición de la apoptosis derivada de su capacidad para antagonizar a BAX y BAK, también miembros de la familia BCL-2. Numerosos estudios han descrito la capacidad de las proteínas antiapoptóticas BCL-2 para unirse a beclin-1 a través de su dominio homólogo BH3, previniendo el ensamblaje del autofagosoma y, por tanto, inhibiendo la autofagia; sin embargo, las proteínas BCL-2 mantienen su actividad antiapoptótica intacta. Este papel dual de las proteínas BCL-2 en la inhibición tanto de la apoptosis como de la autofagia las hace ideales como dianas quimioterapéuticas (90–93). Asimismo, se ha descrito como beclin-1 puede interactuar con otros miembros de la ruta de señalización de la apoptosis. Así, durante la apoptosis puede llevarse a cabo la escisión de beclin-1 por las caspasas-3, -7 o -8, suprimiendo su actividad autofágica; pero, los fragmentos resultantes pueden translocarse a la mitocondria sensibilizando a las células a las señales proapoptóticas y generando un bucle amplificador que induce una muerte celular apoptótica masiva (94,95). En este sentido, también se ha observado como la escisión por caspasas de ATG5 y puede contribuir a modular la ruta mitocondrial de la apoptosis (53). Por el contrario, resulta llamativo que la inhibición de BID, miembro de la familia de proteínas BCL-2 con capacidad proapoptótica, tiene la capacidad de proteger a las células

## INTRODUCCIÓN

cancerosas de la apoptosis e inducir la autofagia mediante un incremento de la expresión de beclin-1 (93).

Sumado a todo lo anterior, se ha sugerido que los autofagosomas de forma inesperada pueden servir como plataforma para la formación de complejos que incluyen componentes de la vía extrínseca de la apoptosis, como por ejemplo la caspasa-8. Ésta sería reclutada al autofagosoma mediante su interacción con p62 y LC3, donde se activaría y sería liberado al citoplasma para desencadenar la muerte celular por apoptosis (96).

**Tabla 1. Proteínas con un papel dual en apoptosis y autofagia.**

<b>Proteína</b>	<b>Papel en apoptosis</b>	<b>Papel en autofagia</b>
<b>Proteínas apoptóticas</b>		
BCL-2/BCL-xL	Antiapoptótico	Interacciona con beclin-1 e inhibe la autofagia
BAX/BAK	Proapoptótico	Proautofágico. Interrumpe la interacción BCL-2-beclin-1
PUMA	Proapoptótico	Proautofágico
<b>Proteínas autofágicas</b>		
mTOR	Regula la apoptosis	Su forma inactiva está implicada en la iniciación del proceso autofágico
Beclin-1	Su forma escindida induce la vía mitocondrial	Nucleación del autofagosoma
p62	Procesamiento y activación de la caspasa-8	Se une a LC3 y promueve la degradación de agregados poliubiquitinizados
ATG5	Su forma escindida induce la vía mitocondrial	Se conjuga con ATG12 implicándose en la elongación del autofagosoma

ATG12	Promueve la vía mitocondrial mediante la inactivación de las proteínas BCL-2	Se conjuga con ATG5 implicándose en la elongación del autofagosoma
-------	--	--

### 5. INFLAMACIÓN Y MEDIADORES INFLAMATORIOS EN LA AR.

La AR es una enfermedad típicamente inflamatoria donde marcadores como la proteína C reactiva o las citoquinas proinflamatorias TNF- $\alpha$  o IL-6 se encuentran en niveles muy elevados tanto en el líquido sinovial como en el suero de los pacientes artríticos y su concentración en sangre se correlacionan con el grado de severidad de la enfermedad (28); además, no es desacertado el afirmar que si existe un verdadero sello distintivo de la AR, sería la inflamación crónica de la sinovial. En ella, tienen lugar eventos como la hiperplasia e hipertrofia celular, probablemente consecuencia de una muerte celular defectuosa, pero también un incremento en el número de vasos sanguíneos y el infiltrado de células inflamatorias, principalmente linfocitos T y B. Además, se producen los factores proinflamatorios que pueden ser liberados a la circulación sistémica. Cómo se inicia y mantiene esta sinovitis crónica aún es objeto de debate, pero se cree que los linfocitos son los encargados de dirigir la respuesta inmune celular que da lugar al inicio de la enfermedad (97). Los linfocitos T y B se encuentran en abundancia en la sinovial AR y allí, estimulan a las células residentes, monocitos, macrófagos y sinoviocitos para producir una gran batería de mediadores proinflamatorios, que a través de complejas vías de señalización activan a genes asociados a la respuesta inflamatoria que incluyen nuevas citoquinas, quimiocinas, MMPs y factores angiogénicos que se encuentran involucrados en todos los aspectos de la inflamación, perpetuándola y conduciéndola a la destrucción articular.

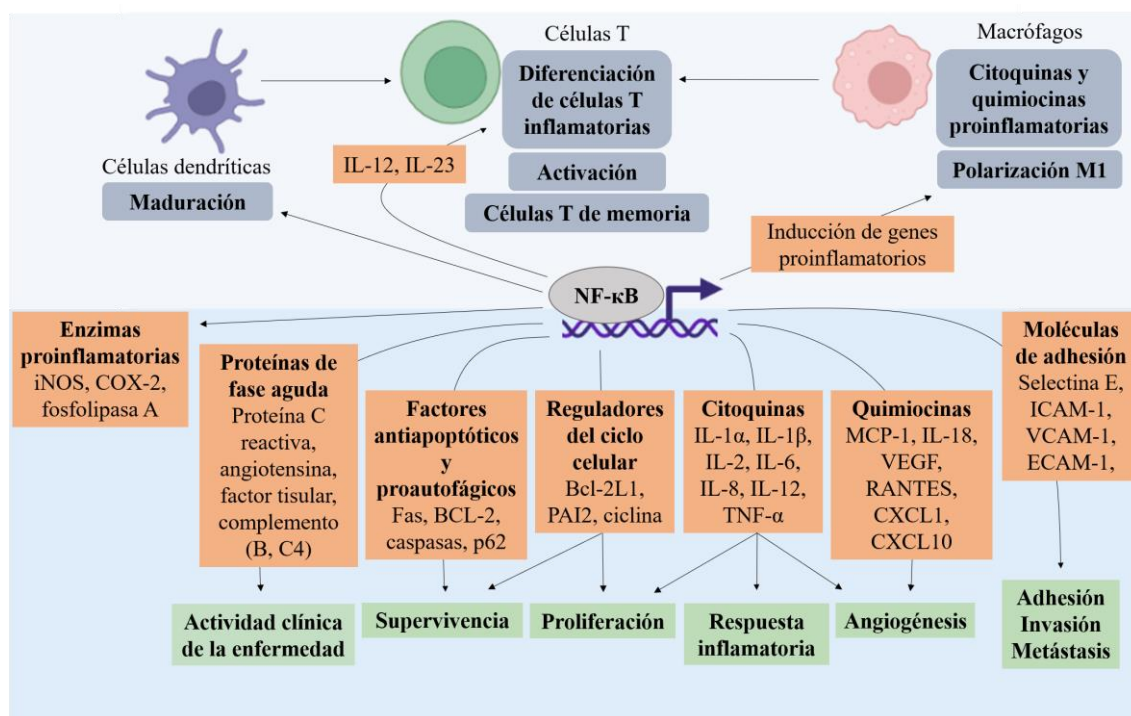
#### 5.1. MEDIADORES INFLAMATORIOS.

##### 5.1.1. NF- $\kappa$ B.

El factor nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B; del inglés: *Nuclear Factor  $\kappa$ B*) es el término generalmente empleado para describir varios complejos formados por cinco subunidades de la familia de proteínas Rel: Rel (c-Rel), RelA (p65), RelB, NF- $\kappa$ B1 (p50 y su precursor p105) y NF- $\kappa$ B2 (p52 y su precursor p100). Todos ellos se activan en respuesta a diversas situaciones dañinas como por ejemplo la presencia de mediadores inflamatorios y, en

## INTRODUCCIÓN

consecuencia, se unen a su secuencia consenso de ADN (98). Tras la unión, NF- $\kappa$ B controla la expresión de una gran variedad de genes involucrados en las respuestas inmunes e inflamatorias, no solo aumentando la producción de citoquinas, quimiocinas y moléculas de adhesión, sino también regulando la proliferación celular, la apoptosis, la morfogénesis y la diferenciación (99), tal y como se refleja en la **Figura 9**.

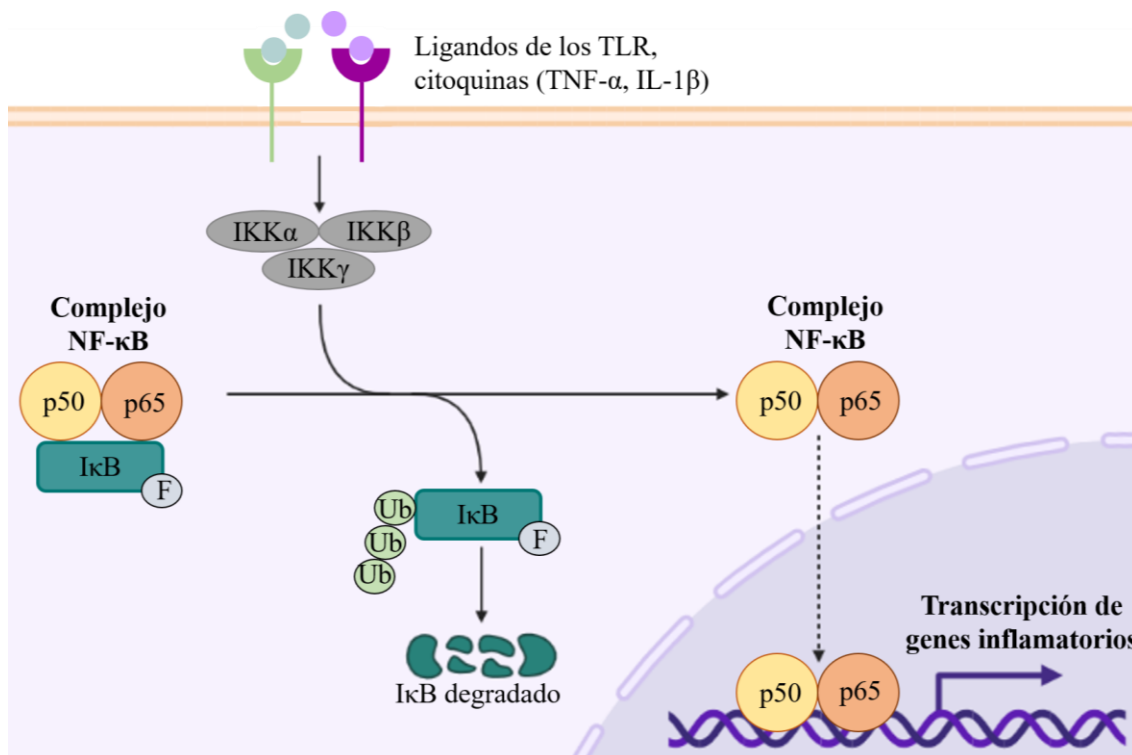


**Figura 9.** Principales dianas moleculares y mecanismos de actuación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B. Imagen esquemática realizada a partir los datos aportados por Liu T. *et al.*, 2017 (99) y Li J. *et al.*, 2020 (100). Imagen de autoría propia creada con la aplicación BioRender.com.

El factor de transcripción NF- $\kappa$ B depende principalmente de dos vías de señalización, la vía canónica o clásica y la no canónica o alternativa; ambas igual de importantes en la regulación de las respuestas inmunes e inflamatorias a pesar de sus diferencias en los mecanismos de señalización (99). A grandes rasgos, NF- $\kappa$ B se encuentra secuestrado e inactivo en el citoplasma debido a la unión de p65 u otras subunidades como p50 con su inhibidor (I $\kappa$ B) (101), impidiendo que pueda iniciar la transcripción de los genes diana. La estimulación de distintos receptores en la membrana celular, incluyendo receptores de citoquinas proinflamatorias como TNF- $\alpha$  o IL-1 $\beta$ , receptores de células inmunes T y B y TLR (del inglés: *Toll-Like Receptor*) conduce a la fosforilación, ubiquitinación y degradación proteosomal de los I $\kappa$ Bs. Una vez liberada, la subunidad p65 permite la translocación de NF- $\kappa$ B al núcleo, donde se une a su secuencia específica de ADN y



ejecuta su función como factor de transcripción, activando la transcripción de los distintos genes (98,99,102). En la **Figura 10**, se muestra de forma resumida el proceso de activación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B.



**Figura 10. Activación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B.** Tras la unión de distintos ligandos (DAMPs, PAMPs, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , etc...) a sus respectivos receptores, se produce el reclutamiento y activación de un complejo catalítico con actividad quinasa formado por diversas subunidades (IKKs; del inglés: *I $\kappa$ B Kinase*). Este complejo lleva a cabo la fosforilación (F) y ubiquitinización (Ub) de I $\kappa$ B, que se encuentra unido al complejo NF- $\kappa$ B (formado por las subunidades p50 y p65, entre otras) en el citoplasma, inhibiéndolo. Tras la degradación de I $\kappa$ B por el proteasoma, el complejo NF- $\kappa$ B es liberado pudiendo translocarse al núcleo, donde se une a su secuencia consenso y permite la activación de la transcripción de diversos genes involucrados en los procesos inflamatorios e inmunes. Imagen de autoría propia creada con la aplicación BioRender.com.

En AR, el factor de transcripción NF- $\kappa$ B se encuentra altamente activado y representa uno de los principales mediadores inflamatorios ya que interviene en la inducción de numerosas citoquinas proinflamatorias como IL-1 $\beta$ , IL-6 o TNF- $\alpha$  en monocitos, macrófagos y también en sinoviocitos. A su vez estas citoquinas son capaces de activar el factor NF- $\kappa$ B en otras células inmunes como linfocitos T y B y en los sinoviocitos, induciendo así la expresión de citoquinas y quimiocinas inflamatorias adicionales, lo que conduce a un bucle inflamatorio, con un mayor reclutamiento de células inflamatorias del sistema inmune y la propagación de la inflamación (99). Otro papel importante de NF- $\kappa$ B en la AR es favorecer la hiperplasia sinovial al promover la proliferación celular e

## INTRODUCCIÓN

inhibir la apoptosis, suponiendo un nexo de unión entre el proceso inflamatorio y la tasa reducida de muerte celular (41,102). Además, contribuye a la destrucción tisular ya que está implicado en la síntesis de MMPs y factores de crecimiento vasoendotelial como VEGF (del inglés: *Vascular Endothelial Growth Factor*) lo que favorece, en gran medida, la capacidad invasiva característica de la sinovial AR (100).

### 5.1.2. Citoquinas

Las citoquinas son pequeñas proteínas capaces de regular diversos procesos biológicos cruciales como la proliferación, la diferenciación, la inflamación, la reparación de tejidos y el control de la respuesta inmune (103). Concretamente en AR, su producción está mediada por las numerosas poblaciones celulares de la sinovial y es fundamental para el proceso patogénico de la enfermedad; es por ello, que no sorprende que estas proteínas se encuentren de forma abundante en el suero y tejido sinovial de los pacientes (15,104). Éstas son responsables de la inflamación y destrucción articular que se produce durante el curso de la enfermedad y, aunque sus patrones pueden variar con el tiempo, existe un predominio constante de las citoquinas proinflamatorias sobre las antiinflamatorias (15,103). De esta forma, tal y como se muestra en la **Figura 11**, son muchas las citoquinas implicadas en la AR, entre las que destacan TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-12, IL-17 y el interferón (IFN)- $\gamma$ . En este apartado nos centraremos únicamente en el papel que juegan dos de las citoquinas proinflamatorias maestras, TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , dentro del proceso patogénico de la AR.

- **TNF- $\alpha$** : es una proteína polipeptídica con numerosas propiedades, aunque el aspecto más estudiado de TNF- $\alpha$  es su habilidad para promover la inflamación. Concretamente en AR, TNF- $\alpha$  desempeña un papel fisiopatológico fundamental, ya que actúa como un potente estimulador autocrino, activando a la propia célula, pero también como un gran inductor paracrino sobre una considerable cantidad de células en el espacio articular, donde promueve la síntesis de otras citoquinas inflamatorias entre las que se incluyen la IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-8, amplificando y perpetuando el proceso inflamatorio (28,104). Así, se ha observado que esta citoquina se encuentra muy elevada tanto en el líquido sinovial de pacientes con AR como en la sinovial inflamada, donde puede ser producida y liberada por diversas poblaciones celulares como los macrófagos, monocitos, sinoviocitos, células T y B y neutrófilos. Además, su liberación por las células precursoras de osteoclastos estimula la maduración de los osteoclastos, lo que conduce a la sinovitis y a la pérdida

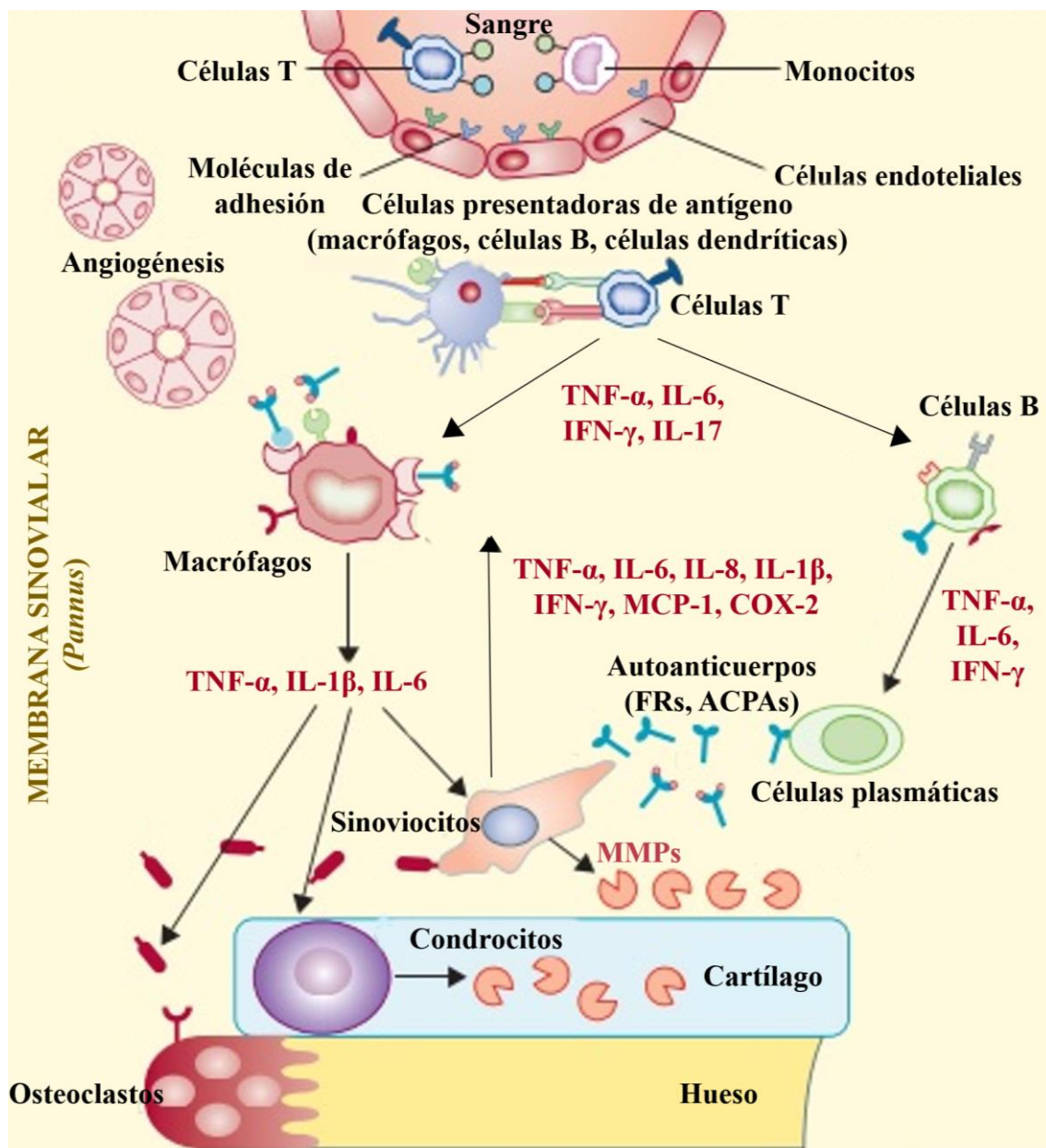
ósea inicial. Asimismo, entre otras funciones de TNF- $\alpha$ , también se incluyen la estimulación de células endoteliales para que expresen moléculas de adhesión que permitan la acumulación leucocitaria y la producción y liberación de quimiocinas implicadas en el reclutamiento de células inmunitarias y en la angiogénesis (104). Debido a la implicación de TNF- $\alpha$  en la patología artrítica, existen numerosos fármacos biológicos dirigidos a bloquear su acción inhibiendo la unión con su receptor o la propia molécula, mediante anticuerpos anti-TNF- $\alpha$ ; y en la actualidad, se han convertido en una estrategia fundamental como terapia antiinflamatoria (15).

- **IL-1 $\beta$** : la familia de las IL-1 se ha asociado desde hace ya muchos años con los procesos definidos clásicamente como inflamación e inmunidad innata (105). En AR, la IL-1, y más concretamente la IL-1 $\beta$ , es producida mayoritariamente por macrófagos y monocitos, aunque también puede ser liberada por células endoteliales, células B y células T activas, sinoviocitos y condrocitos, expresándose de forma abundante en la membrana sinovial (28). Como citoquina proinflamatoria una de sus funciones más destacadas es inducir la liberación de otros mediadores proinflamatorios como TNF- $\alpha$  y diversas quimiocinas y prostaglandinas por parte de condrocitos y fibroblastos; así como la liberación de MMPs. Asimismo, esta citoquina se encuentra implicada en la reabsorción del hueso mediante su efecto en la diferenciación y activación de los osteoclastos y se ha observado *in vivo* como su inyección en diversos modelos animales es capaz de destruir el cartílago articular. Por todo ello, la IL-1 $\beta$  es reconocida como una de las moléculas más importantes en la patogénesis de la AR ya que contribuye activamente a exacerbar la inflamación, perpetuando así el proceso de daño articular (97,106). En este sentido, anakinra es uno de los fármacos biológicos encaminado a neutralizar la acción proinflamatoria de la IL-1 al actuar como antagonista de su receptor (107).

La constante estimulación y recepción de señales para la producción de las citoquinas TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  termina por desencadenar la inflamación crónica dentro de las articulaciones. La acción conjunta de estas citoquinas con IL-6, inducen a las células sinoviales y condrocitos a la liberación de prostaglandinas, especies reactivas de oxígeno (ROS; del inglés: *Reactive Oxygen Species*) y colagenasas que degradan el colágeno y proteoglicanos del cartílago. Asimismo, se ha observado cómo estas citoquinas promueven la generación de osteoclastos, capaces de descomponer el hueso. De esta forma, la estimulación y activación de macrófagos y sinoviocitos en la sinovial AR puede

## INTRODUCCIÓN

ser la causante de la alarmante deformación ósea que sufren los casos más severos de la AR (28).



**Figura 11. Proceso inflamatorio en la articulación artrítica.** Representación gráfica de los principales tipos celulares y mediadores inflamatorios que intervienen en la patogénesis de la AR. Imagen obtenida y modificada de Smolen JS. *et al.*, 2016 (34).

### 5.1.3. COX-2 (PGE<sub>2</sub>).

La ciclooxigenasa (COX), también conocida como prostaglandina-endoperoxido sintasa es una enzima clave en la síntesis de prostaglandinas (PGs) (108). Las PGs son importantes mediadores lipídicos sintetizados a partir del ácido araquidónico libre, ya sea constitutivamente en los tejidos donde desempeña una función de mantenimiento (a partir de COX-1) o en respuesta a traumatismos u condiciones inflamatorias o patológicas (a partir de COX-2) (108,109). En este apartado nos centraremos en la enzima COX-2 por ser la principal sintetizadora de PGs, más concretamente de la prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), y por su estrecha relación con la respuesta inflamatoria en diversas condiciones patológicas, especialmente en la AR.

En la sinovial AR, COX-2 puede ser liberada abundantemente por varias células, entre la que se incluyen monocitos, macrófagos, sinoviocitos y células endoteliales inducidas por diferentes factores proinflamatorios, aunque resultados opuestos se han observado en las células presentes en el líquido sinovial de pacientes AR, donde la expresión de esta enzima se asemeja a la observada en pacientes control (110,111); aunque esto último puede deberse al empleo de fármacos antiinflamatorios que inhiben COX-2 (111). Como ya se ha mencionado, una de las funciones más relevantes de COX-2 es llevar a cabo la síntesis enzimática de la PGE<sub>2</sub> (109) en respuesta a factores proinflamatorios característicos de la artritis como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6. La PGE<sub>2</sub> es capaz de promover el dolor, la inflamación y la activación de cascadas de señalización que controlan la angiogénesis y la proliferación celular mediante la inhibición de la apoptosis y la potenciación de la capacidad metastática (108). Para ello, mediante la interacción con los sinoviocitos AR, la PGE<sub>2</sub> promueve la liberación de IL-6 y MMP-1, lo que contribuye a mantener el círculo inflamatorio que caracteriza a la patogénesis de la AR. A su vez, la PGE<sub>2</sub> también juega un papel crucial en la respuesta inmune, ya que el bloqueo de esta vía disminuye sustancialmente a la producción de anticuerpos. Esto se debe, principalmente, a su capacidad para regular la proliferación, activación y supervivencia de las células B (111). Tal y como hemos mencionado, actualmente existen fármacos antiinflamatorios dirigidos específicamente a inhibir la síntesis y actividad enzimática de COX-2 y, por tanto, la síntesis y liberación de la PGE<sub>2</sub> (109). A este respecto y sorprendentemente, son varios los estudios *in vitro* e *in vivo*, que demuestran que la inhibición de la PGE<sub>2</sub> se encuentra implicada en una intensificación de la expresión de la

## INTRODUCCIÓN

proteína quimioatrayente de monocitos 1 (MCP-1; del inglés: *Monocyte Chemoattractant Protein-1*) (112,113).

### 5.1.4. Proteína C Reactiva.

La respuesta de fase aguda es una reacción específica al proceso inflamatorio y se encuentra muy asociada a la síntesis de ciertas glicoproteínas plasmáticas en el hígado, como la proteína C reactiva (CRP; del inglés: *C Reactive Protein*) (114) inducida por la interacción mutua de las citoquinas TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6 (115); aunque cada vez existen más evidencias de que la CRP puede sintetizarse a partir de macrófagos, linfocitos o el tejido vascular normal (28). Desde los años 70, la medida de este reactante de fase aguda en sueros de pacientes AR se ha empleado en la práctica clínica como una determinación objetiva e indirecta de la presencia y gravedad de la inflamación, de ahí su relevancia desde el punto de vista diagnóstico y también como pronóstico (28,115). De esta forma, niveles elevados de la CRP se correlacionan con una mayor actividad clínica de la enfermedad (rigidez matutina, dolor, fatiga y discapacidad), alteraciones estructurales en el tejido sinovial y progresión radiológica de la AR (115,116). Asimismo, se ha observado que existe una correlación entre los niveles de esa proteína con la respuesta a diferentes tratamientos, de forma que esta puede afectar a la decisión de qué tratamiento emplear a fin de buscar la máxima eficacia (117).

### 5.2. INFLAMACIÓN MEDIADA POR INFLAMASOMA.

Los inflamasomas son un grupo de grandes plataformas proteicas conocidas principalmente por su habilidad para controlar la activación de la caspasa-1 inflamatoria. Cada inflamasoma se define por su proteína sensora (PRR; del inglés: *Pattern-Recognition Receptor*) capaz de formar una plataforma para la activación de la procaspasa-1 en respuesta a la detección citosólica de patrones moleculares exógenos asociados a patógenos (PAMPs; del inglés: *Pathogen-Associated Molecular Patterns*) y señales endógenas de peligro (DAMPs; del inglés: *Damage-Associated Molecular Patterns*) liberados por células que están dañadas o moribundas, desencadenando una importante respuesta inflamatoria (118). A día de hoy se han descrito cinco miembros de la familia de las PRRs capaces de provocar la oligomerización de los inflamasomas pero, en este trabajo, nos centraremos en NLRP3 (del inglés: *Nucleotide-Binding Oligomerization Domain-Like Receptor Pyrin Domain-Containing-3*) ya que es uno de

los receptores mejor caracterizados por su relevancia en muchas enfermedades inflamatorias y autoinmunes como la AR, así como en el proceso de envejecimiento (49,106,118). Tras recibir un estímulo, este receptor participa en el ensamblaje y activación del inflamasoma, también conocido como NLRP3, mediante la unión de dicho receptor con la proteína adaptadora ASC (del inglés: *Apoptosis-Associated Speck-Like Protein Containing a Caspase-Recruitment Domain*) y el reclutamiento del zimógeno procaspasa-1. La activación de la procaspasa-1 es autocatalítica y se produce mediante proximidad tras su reclutamiento en el complejo inflamasoma dando lugar a la forma activa de la proteína efectora, la caspasa-1; ésta última es capaz de escindir e inducir la secreción de las proteínas pro-IL-1 $\beta$  y pro-IL-18 dando lugar a sus formas maduras, biológicamente activas, que son secretadas al espacio intercelular. La IL-1 $\beta$  y la IL-18 son las encargadas de ejecutar la respuesta inflamatoria mediada por el inflamasoma, la cual se ha relacionado con el proceso patogénico de enfermedades como el Alzheimer, diabetes, aterosclerosis o enfermedades autoinmunes como la gota. Asimismo, se ha descrito como la caspasa-1 se encuentra implicada en una forma de muerte celular inflamatoria conocida como piroptosis (118).

NLRP3 es activado tras su exposición a un amplio abanico de estímulos incluyendo aquellos de procedencia mitocondrial como el ATP, ROS, cardiolipina o fragmentos de ADN mitocondrial oxidados y otros estímulos como la nigericina, toxinas bacterianas como el lipopolisacárido LPS, virus o alcohol; pero se cree que para que esta activación tenga lugar se requieren dos señales, tal y como se refleja en la **Figura 13**: una primera señal en la que se induce la transcripción de los genes de la pro-IL-1 $\beta$  y pro-IL-18 así como de NLRP3 dependiente de la activación de la ruta de señalización de NF- $\kappa$ B en respuesta a la unión de distintos ligandos como citoquinas proinflamatorias a sus receptores y una segunda señal, en la que los propios estímulos extra- o intracelulares desencadenan el ensamblaje del complejo inflamasoma (49,119).

En los últimos años, el número de estudios que se han centrado en discernir cuál es el papel que juega el inflamasoma dentro del complejo proceso que subyace a patología artrítica ha ido en aumento. Sin embargo, aún no está del todo claro cuán importante es su contribución al desarrollo de la enfermedad. Hasta el momento, numerosos modelos animales llevados a cabo en roedores aportan datos sólidos que respaldan la implicación de la activación del complejo NLRP3 en la AR (120). Así, se ha observado como una modificación genética que predispone al desarrollo de la artritis en ratones tiene como

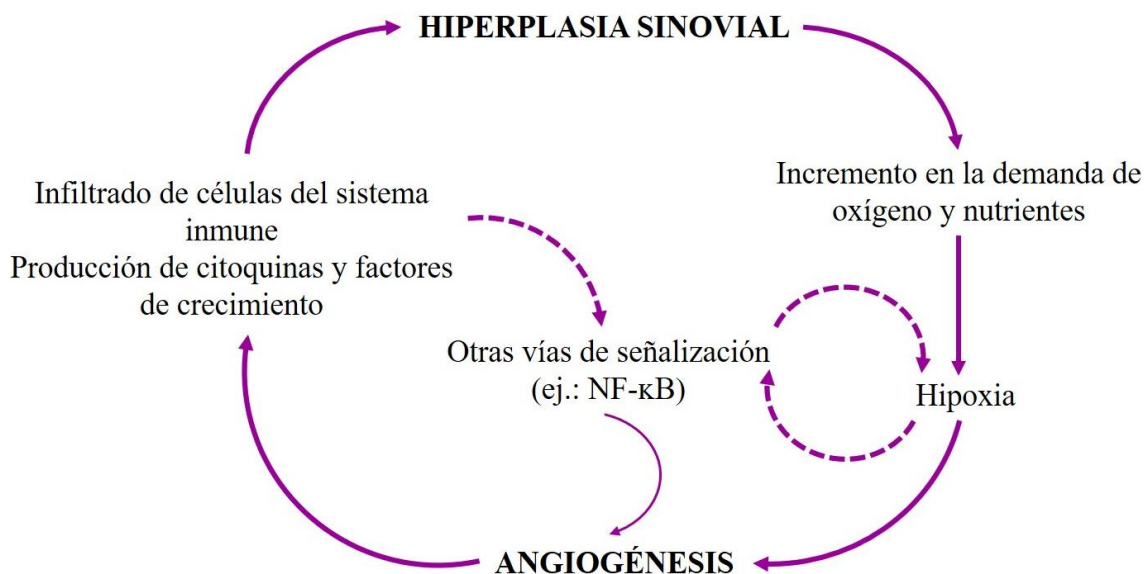
## INTRODUCCIÓN

resultado una mayor activación del complejo inflammasoma y asimismo, la ausencia de un complejo funcional produce mejoras notables en la enfermedad (121). Siguiendo esta línea, recientemente Guo C. y colaboradores han demostrado que existe una mayor expresión de NLRP3, caspasa-1 e IL-1 $\beta$  en el tejido sinovial de ratones a los que se les indujo la artritis y que dicha expresión, se mostró reducida al tratar a los animales con el inhibidor selectivo de NLRP3, MCC950. Además, también se confirmó la expresión incrementada de NLRP3 y caspasa-1 en la sinovial de pacientes AR (106). Sumado a esto, interesantemente, se ha asociado una mayor activación del complejo inflammasoma a macrófagos y células inmunitarias de la sangre periférica (106,122).

### 5.3. ANGIOGÉNESIS.

Al proceso involucrado en la formación de nuevos capilares a partir de los vasos sanguíneos preexistentes se conoce como angiogénesis. Son numerosos los procesos fisiológicos en los que la angiogénesis se encuentra implicada, pero destacan sus implicaciones patológicas, ya que incluyen el desarrollo de enfermedades como el cáncer, vasculitis, aterosclerosis o la AR inflamatoria (123). En la AR, la estructura vascular participa activamente en el proceso invasor y destructivo. De hecho, hay un mayor número y densidad de vasos sanguíneos en la sinovial AR, necesarios para irrigar la expansión del tejido sinovial y desarrollar su naturaleza hiperplásica e invasiva. La hiperplasia sinovial conduce a una mayor demanda celular de oxígeno y nutrientes dentro de la membrana sinovial; esto da lugar al establecimiento de un ambiente hipóxico que impulsa, a su vez, la expresión de factores angiogénicos sensibles a la hipoxia (como es el caso de VEGF) pudiendo interactuar también con cascadas de señalización inflamatoria como la de NF- $\kappa$ B. Así, los vasos sanguíneos recién formados suministran el oxígeno y los nutrientes necesarios para el metabolismo y la división celular, proporcionan una vía de entrada a leucocitos, además de múltiples citoquinas, quimiocinas y factores de crecimiento, perpetuando así aún más el ciclo angiogénico en el tejido sinovial que parece ser fundamental en el mantenimiento y promoción de la AR (**Figura 12**) (124,125).





**Figura 12. Representación esquemática del ciclo angiogénico en la sinovitis AR.** La proliferación celular desmesurada durante la hiperplasia sinovial asociada a la AR promueve un escenario hipóxico, lo que impone una demanda adicional de vasculatura. Esto impulsa el proceso de angiogénesis y, por lo tanto, el infiltrado celular y la hiperplasia. Imagen inspirada en Thairu N. *et al.*, 2011 (124).

La angiogénesis que se produce en el tejido inflamado es dependiente del balance de numerosos mediadores proangiogénicos y antiangiogénicos, incluidos factores de crecimiento, citoquinas, quimiocinas, moléculas de adhesión celular y MMPs. En este estudio, nos centraremos en dos factores de crecimiento que participan de forma activa en la perpetuación y mantenimiento de la angiogénesis.

### 5.3.1. VEGF.

El factor de crecimiento vasoendotelial, VEGF, es el principal regulador de las vías de señalización que conducen finalmente a la angiogénesis, ya que se encuentra asociado con los procesos tempranos de permeabilización vascular, proliferación, migración y formación de los nuevos tubos vasculares, así como con la mitogénesis y prevención de la apoptosis en las células del endotelio vascular (126,127). Su síntesis a partir de los macrófagos y fibroblastos de la sinovial AR es inducida por la acción conjunta de numerosas citoquinas como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-18, TGF- $\beta$  (del inglés: *Transforming Growth Factor  $\beta$* ) o el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF; del inglés: *Platelet Derived Growth Factor*) (126); a ello, se suma la hipoxia de la sinovial como un importante regulador de la expresión de VEGF a través del factor inducible por hipoxia 1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ; del inglés: *Hypoxia Inducible Factor  $\alpha$* ) (127). Así, se ha demostrado como

## INTRODUCCIÓN

la inhibición de la ruta de señalización NF- $\kappa$ B es capaz de suprimir la expresión de VEGF en los sinoviocitos AR (128).

### 5.3.2. Angiopoyetina-1.

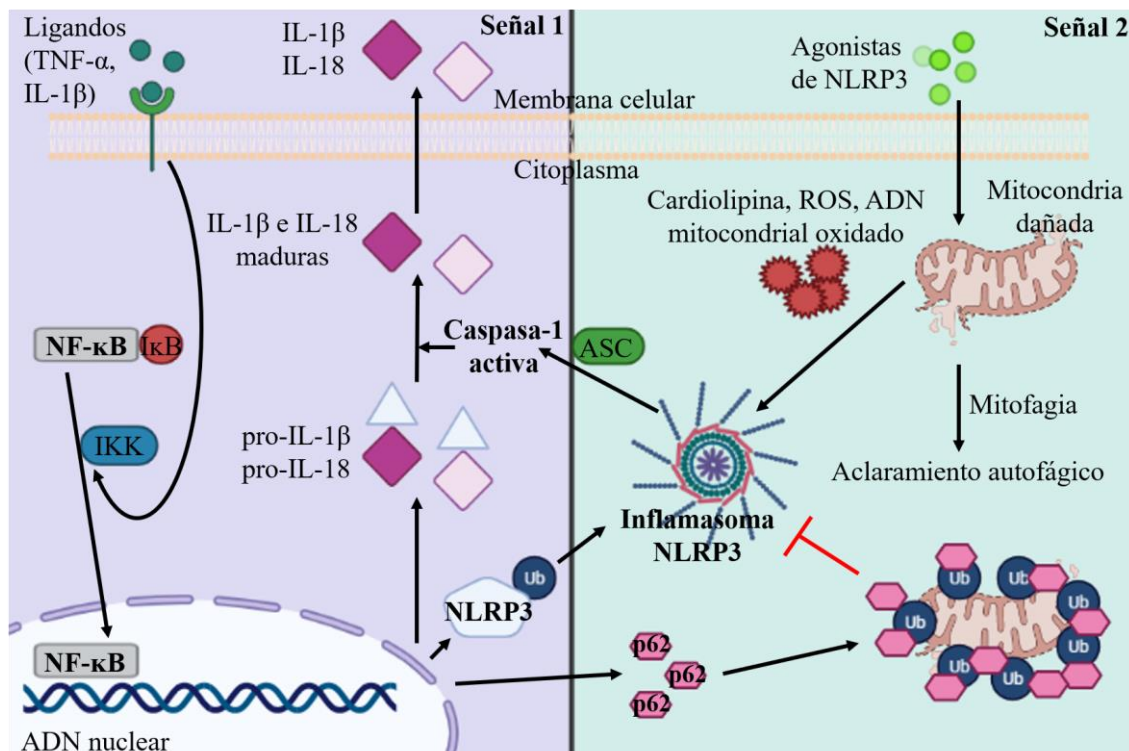
La angiopoyetina-1 (Ang-1) se considera otro importante regulador de la angiogénesis ya que juega un papel fundamental en las últimas etapas del desarrollo de la vasculatura. Esto se debe a su implicación en el control de la estabilización y maduración de los nuevos vasos en respuesta a la interacción con VEGF; mientras que su antagonista, Ang-2, actúa inhibiendo la maduración y promoviendo la regresión (129). En la sinovial AR, Ang-1 es expresado por los sinoviocitos y se une a su receptor de superficie Tie-2 en las células endoteliales, lo que causa la migración y supervivencia de estas células mediante la inhibición de la apoptosis y la promoción de la activación endotelial al inhibir la expresión y secreción de Ang-2 (130). Asimismo, su expresión está limitada por la acción de ciertas citoquinas sobre los sinoviocitos; ejemplo de ello, es el aumento que experimenta en sus niveles de expresión cuando los sinoviocitos son estimulados con TNF- $\alpha$  a través de la vía de señalización NF- $\kappa$ B (128,131).

### 5.4. RELACIÓN ENTRE EL PROCESO INFLAMATORIO Y LA ACTIVACIÓN DE LA VÍA AUTOFÁGICA.

Numerosos estudios han puesto de manifiesto que la disfunción autofágica contribuye negativamente al proceso de envejecimiento y al desarrollo de numerosas patologías humanas; ya que además de verse implicada en los procesos de supervivencia o muerte celular como hemos visto anteriormente, la autofagia se encuentra involucrada en diversas funciones del sistema inmune como la presentación de antígenos, el desarrollo de linfocitos o la liberación de citoquinas por las células inmunes (132). En este apartado, nos centraremos en la estrecha relación que existe entre dos procesos *a priori* independientes, la inflamación y la autofagia.

La forma en la que la autofagia es capaz de mediar sobre el proceso inflamatorio es consecuencia, en gran medida, de su capacidad para regular la activación del complejo inflamasoma (133). Así, se ha observado en múltiples modelos tanto *in vitro* como *in vivo* cómo las proteínas autofágicas, LC3 o beclin-1, son reguladoras clave de la respuesta inflamatoria mediada por la activación de la caspasa-1 y la liberación de sus productos

catalíticos IL-1 $\beta$  e IL-18 (132). Siguiendo esta línea, Zhong Z. y colaboradores describieron como NF- $\kappa$ B, activador clave de la inflamación debido a su capacidad para inducir la expresión de la pro-IL-1 $\beta$  y NLRP3, también es capaz de prevenir la inflamación excesiva y la activación del complejo inflammasoma en un contexto de daño mitocondrial regulando la acumulación de p62/SQSTM1 (134). Esta proteína autofágica lleva a cabo la eliminación de las mitocondrias dañadas y, por tanto, aquellas moléculas derivadas del daño, como por ejemplo, el ADN mitocondrial o las ROS, evitando así la activación de la vía inflammasoma y limitando el bucle inflamatorio que podría desencadenarse de la liberación de las citoquinas IL-1 $\beta$  e IL-18 (134,135). Por lo tanto, la autofagia podría ser clave en la modulación del proceso inflamatorio, al reducir mayoritariamente las posibles consecuencias que la disfunción mitocondrial pueda tener sobre determinadas patologías degenerativas o asociadas al envejecimiento (136) (**Figura 13**).



**Figura 13. Activación de NF- $\kappa$ B y su implicación en la regulación del complejo inflammasoma.** La activación del complejo inflammasoma requiere dos señales. Una primera señal que da lugar a la activación de NF- $\kappa$ B y la transcripción de los genes NLRP3, pro-IL-1 $\beta$  y pro-IL-18; y una segunda señal (agonistas de NLRP3) que permite la activación del complejo inflammasoma mediante su ensamblaje y la consecuente maduración y liberación de IL-1 $\beta$  e IL-18. Asimismo, NF- $\kappa$ B también es capaz de regular la excesiva activación del complejo inflammasoma, regulando la acumulación de p62, intermediario en el proceso de eliminación de las mitocondrias dañadas. Imagen creada tomando como referencia el artículo *NF- $\kappa$ B signaling in inflammation* (Liu T; 2017) (99). Imagen de autoría propia creada con la aplicación BioRender.com.

## INTRODUCCIÓN

### 6. LA FUNCIÓN DEL TRATAMIENTO EN LA AR.

Actualmente no existe cura para la AR. Debido a las complejas causas y mecanismos que contribuyen a la aparición de esta enfermedad y a su carácter crónico, no es de extrañar que los tratamientos para combatirla sean igual de complejos y dilatados en el tiempo.

Dado que la inflamación articular está en el vértice de los eventos patológicos y, a su vez, conduce a la aparición de síntomas clínicos como el daño articular, la discapacidad o la comorbilidad, revertir dicha inflamación debe de considerarse como el principal objetivo terapéutico en la AR (34) y así, poder minimizar su avance, las lesiones articulares asociadas y mejorar tanto la función física como la calidad de vida de los pacientes (34,137).

#### 6.1. FÁRMACOS PARA EL TRATAMIENTO DE LA AR.

El número de recursos terapéuticos disponibles para hacer frente a la AR han aumentado enormemente en los últimos treinta años, dividiéndose principalmente en tres tipos: fármacos antiinflamatorios no esteroideos, glucocorticoides y fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad. Estos últimos, a su vez, se dividen en aquellos que tienen un origen sintético o un origen biológico (137).

- **Antiinflamatorios no esteroideos (AINEs):** considerados como la primera línea de tratamiento frente a la AR, son particularmente útiles durante las primeras semanas en las que el paciente presenta síntomas debido a su efecto analgésico y antiinflamatorio (138); sin embargo, no se consideran fármacos modificadores de la enfermedad, ya que no interfieren en el progreso del daño articular (34). Los AINEs constituyen el 5% de todos los medicamentos prescritos e incluyen, entre muchos otros, la aspirina, ibuprofeno, naproxeno, diclofenaco o meloxicam (139). Aunque pueden diferir considerablemente en su clase química, todos ellos comparten mecanismo de actuación: inhiben la actividad enzimática de las enzimas COX (COX-1 y COX-2), y consecuentemente, la síntesis de las PGs (138). Sin embargo, son muchos los estudios que advierten sobre las múltiples complicaciones médicas que puede conllevar el empleo de estos fármacos (139).

- **Glucocorticoides (GCs):** los GCs son un tipo de corticoesteroides muy empleados en el tratamiento de enfermedades inflamatorias como la AR y otras enfermedades

autoinmunes. En la terapia frente a la AR, los GCs juegan un papel central como tratamiento sintomático cuando se producen brotes severos de la enfermedad debido, principalmente, a que poseen una acción rápida y eficaz, además de unas fuertes propiedades antiinflamatorias e inmunosupresoras capaces de reducir el daño articular. Esto es así, debido a que inhiben la transcripción de diversos genes inflamatorios interactuando directamente con los distintos factores de transcripción, lo que deriva en una disminución en la producción de diversas moléculas de naturaleza proinflamatoria (140,141). En contrapartida, el uso prolongado de los GCs se relaciona con graves efectos secundarios como la osteoporosis, candidiasis, pancreatitis o úlceras gástricas (141); asimismo, el uso de prednisona se ha asociado con un incremento en el riesgo de mortalidad (142). Por lo tanto, para optimizar el resultado del tratamiento lo más recomendable es emplear estos fármacos a dosis bajas, durante cortos periodos de tiempo y como terapia adyuvante de otros fármacos, a fin de maximizar su efectividad (143,144).

**- Fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad (FAMEs):** dentro de este tipo fármacos se encuentran determinados agentes clasificados en base a su origen y modo de acción en sintéticos y biológicos (145). En términos generales, todos ellos están destinados a inhibir el daño articular, suprimir la respuesta en fase aguda, disminuir los niveles de autoanticuerpos y contribuir a un mejor funcionamiento articular a largo plazo (146). Aunque los resultados de los FAMEs únicamente son reconocibles pasadas semanas o meses del inicio del tratamiento, una vez hacen efecto y dado que sus resultados van más allá del mero tratamiento sintomático, es probable que se suprima el tratamiento complementario con AINEs o GCs (145).

Las recomendaciones emitidas por el EULAR (del inglés: *European League Against Rheumatism*) indican que ha de emplearse como primera línea estratégica de tratamiento un fármaco convencional de origen sintético, el metotrexato (MTX), junto con dosis bajas de GCs, e ir reduciendo éstos últimos poco a poco hasta suprimirlos por completo (144). Aunque el MTX se ha convertido en el fármaco de rigor para la AR, entre otras cosas, porque actúa de forma sinérgica optimizando la eficacia de los FAMEs biológicos, existen otros fármacos convencionales con resultados similares, entre los que se incluyen la sulfasalazina, la leflunomida o los antimaláricos cloroquina e hidroxicloroquina (empleados cuando la enfermedad es muy leve ya que tienen pocos efectos estructurales) (34). Cuando el tratamiento con los FAMEs convencionales falla, y aparecen factores asociados a un mal pronóstico, ha de tenerse en cuenta el empleo de FAMEs biológicos

## INTRODUCCIÓN

o dirigidos (137). Éstos se desarrollaron con el objetivo de inhibir dianas moleculares o celulares específicas que intervienen directamente en la patogénesis de la enfermedad AR (107,147); y hasta el momento, han logrado cambiar la perspectiva, el tiempo y los resultados del tratamiento (147). En España, son al menos 9 los fármacos biológicos aprobados para tratar la AR, con distintos mecanismos de acción: la inhibición de TNF- $\alpha$  (etanercept, infliximab, adalimumab, certolizumab y golimumab), la inhibición del receptor de IL-6 por anticuerpos monoclonales (tocilizumab), antagonistas del receptor de la IL-1 (anakinra), el bloqueo de la co-estimulación de las células T (abatecept) y, anticuerpos dirigidos a la depleción de las células B (rituximab). Además, como ya hemos mencionado, la administración de este tipo de fármacos se recomienda en combinación con una FAME sintético, fundamentalmente MTX, siempre que sea posible. Con ello, se pretende buscar una mayor eficacia por su efecto sinérgico y, asimismo, evitar el desarrollo de anticuerpos antifármaco que pueden causar una pérdida de eficacia de los fármacos biológicos (148).

### 6.2. BÚSQUEDA DE NUEVAS TERAPIAS.

En el apartado anterior, hicimos referencia a los diferentes tratamientos empleados en la actualidad para hacer frente a la AR. Estos tratamientos son prescritos extensamente a los pacientes, pero es una realidad que su uso trae consigo inevitables aspectos negativos, como los efectos secundarios no deseados, el elevado coste económico y en muchas ocasiones, la carencia de eficacia. De esta forma y a pesar de que los agentes biológicos han mejorado notablemente tanto el pronóstico como la calidad de vida de los pacientes, actualmente alrededor de un 30-40% de los sujetos no responden al tratamiento y siguen sin conocerse las causas que subyacen a esta resistencia (149). Además, debido al carácter crónico de la AR, los pacientes necesitan ser tratados durante toda su vida, por lo que estos inconvenientes adquieren gran importancia. Por todo ello, puede afirmarse que en la AR no existe un tratamiento eficaz a largo plazo.

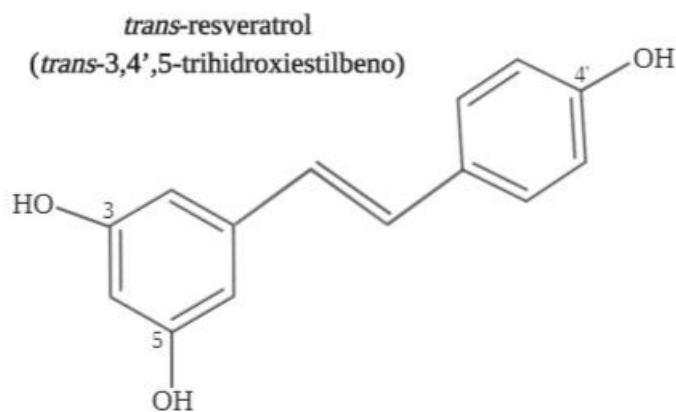
Debido a estas limitaciones, está suscitando gran interés el posible potencial terapéutico de los productos naturales frente a multitud de enfermedades que afectan a la población, y la AR no es una excepción. Tanto es así, que un número cada vez mayor de pacientes ha comenzado a recurrir a los productos naturales para aliviar sus síntomas y dolencias. Sin embargo, también existe una gran corriente de escepticismo dentro de la población y de la comunidad sanitaria acerca del empleo de estos productos. La razón de

esta desconfianza se debe a las dificultades para evaluar la eficacia de estos productos, así como a la desinformación acerca de sus mecanismos de acción; por lo que definir los mecanismos de actuación de los distintos productos naturales es una prioridad (150). Hasta ahora, se conoce que éstos pueden controlar la inflamación característica de la AR actuando sobre diferentes vías, por ejemplo, inhibiendo moléculas efectoras (citoquinas y quimiocinas proinflamatorias), regulando la respuesta inmune mediada por las células T o mediante la modulación de la interacción osteoinmune y la salud del sistema óseo. En este sentido, los compuestos naturales que reúnan las propiedades anteriores pueden servir como potenciales agentes terapéuticos para el tratamiento de la AR, ya sea solos, o empleados en combinación con determinados fármacos antiartríticos habituales con el fin de obtener una acción sinérgica (150). A continuación, detallaremos uno de los productos naturales mejor estudiados en el tratamiento de la AR y en el cual centraremos nuestra investigación: el resveratrol.

### 7. RESVERATROL.

El resveratrol (*trans*-3,4',5-trihidroxiestilbeno) es un polifenol natural aislado por primera vez en 1939 por Takaoka de las raíces del eléboro blanco (*Veratrum grandiflorum* O. Loes), y años más tarde, en 1963, de las raíces de *Polygonum cuspidatum*, una planta empleada en la medicina tradicional oriental. Desde entonces, se ha descrito la presencia de este compuesto en más de 70 especies de plantas y en múltiples productos de origen natural entre los que se incluyen bayas, frutos secos como nueces o cacahuetes, la piel de la uva y sus derivados como el vino tinto, y otras fuentes vegetales (151). A pesar de que el resveratrol (RSV) puede encontrarse en la naturaleza en sus dos formas isoméricas (*cis* y *trans*), se ha observado que solo la forma *trans* (**Figura 14**) participa en la mayoría de actividades biológicas debido a su mayor disponibilidad y a su gran estabilidad y, por tanto, es la forma predominante en fuentes dietéticas y suplementos alimenticios (152).

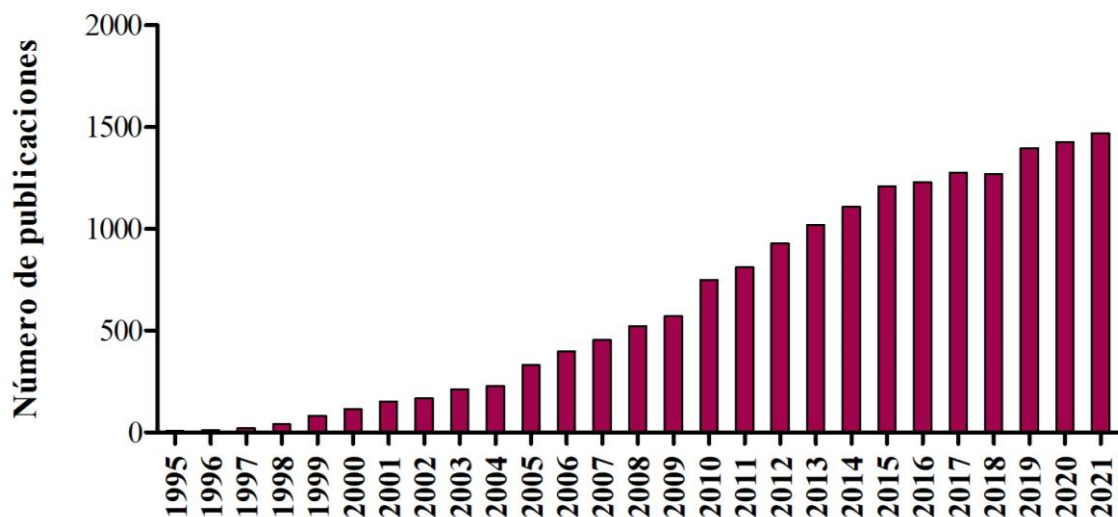
## INTRODUCCIÓN



**Figura 14.** Estructura química del resveratrol.

Inicialmente, se identificó al RSV como una fitoalexina producida en las plantas en respuesta a diversas situaciones de estrés ambiental, ya sea daño mecánico, infección microbiana, radiación UV, temperatura u otras condiciones patogénicas (151); pero ganó poca atención hasta que en 1992, Renaud S. publicó un artículo titulado “*Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease*” en el que se sugirió que la baja incidencia de enfermedades cardiovasculares en la población francesa, cuya dieta mostraba un elevado contenido de grasas saturadas, se debía presumiblemente al consumo de vino tinto (153). El vino tinto contiene una concentración promedio en su forma *trans* de 1,9 mg/L pudiendo alcanzar los 14,3 mg/L (154), y es generalmente mayor que la encontrada en el vino blanco (155). Así, el RSV se promocionó como un ingrediente activo en el vino tinto, responsable de la reducción de los lípidos en la sangre. A partir de ese momento, el RSV ha atraído una inmensa atención y se ha estudiado en profundidad debido a los diferentes efectos beneficiosos que aporta para la salud, incluyendo entre muchos otros, antiinflamatorios, antioxidantes, anticancerígenos, cardioprotectores, neuroprotectores, antidiabéticos, etc (156–162). Por este motivo, tal y como se muestra en la **Figura 15**, en los últimos años se ha producido un enorme auge en los estudios científicos que investigan las múltiples propiedades del RSV (163).

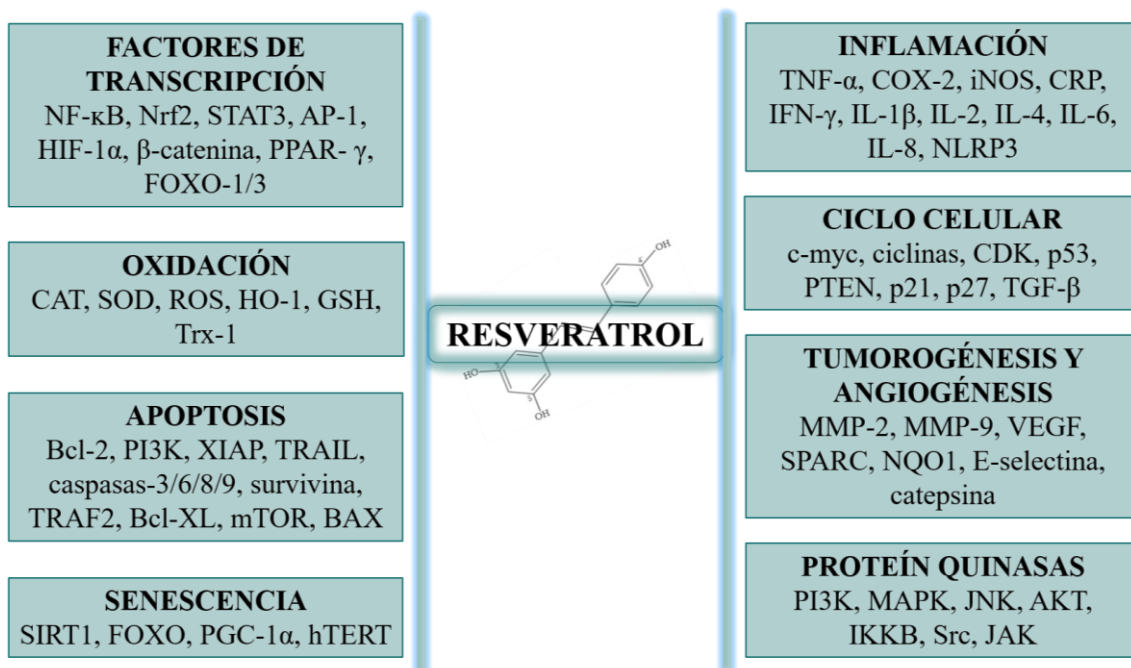




**Figura 15.** Número de publicaciones por año que mencionan el resveratrol. La gráfica es el resultado de introducir el término de búsqueda “resveratrol” en la base de datos *Pubmed*.

Así pues, una de las razones principales por las que el RSV ha logrado captar la atención de la comunidad científica, confirmándose como un compuesto de gran interés y relevancia, se debe principalmente al efecto que ejerce sobre múltiples dianas moleculares, ya que actúa modulando la expresión de diversos factores de transcripción, genes, proteínas y enzimas implicadas en multitud de rutas celulares (**Figura 16**). Dicha acción polifacética del RSV contribuye a regular un amplio abanico de alteraciones asociadas a una enfermedad, a generar menos efectos secundarios, y a eliminar el inconveniente de la resistencia a los fármacos que presentan aquellos que están dirigidos a una única diana específica (164).

## INTRODUCCIÓN



**Figura 16. Dianas celulares del resveratrol.** Imagen representativa del amplio abanico de procesos celulares y moléculas diana sobre las que se conoce que el resveratrol ejerce su acción. Imagen esquemática realizada a partir los datos aportados por Harikumar KB. *et al.*, 2008 (151) y Raj P. *et al.*, 2014 (165).

### 7.1. MECANISMOS DE ACCIÓN DEL RESVERATROL: INFLAMACIÓN Y MUERTE CELULAR.

Los efectos de esta fitoalexina son el resultado, en gran medida, de la activación de múltiples rutas antiinflamatorias, entre las que destacan las sirtuinas, más concretamente la Sirtuina (SIRT)1 y factores de transcripción como Nrf2 (del inglés: *Nuclear Factor Erythroid 2-Related Factor 2*), un mediador clave de la expresión de numerosas enzimas antioxidantes (166,167). Asimismo, múltiples estudios han coincidido en indicar que gran parte del poder antiinflamatorio que ejerce el RSV podría deberse a su capacidad para modular la expresión del factor NF-κB, reduciendo su translocación al núcleo o bien su actividad transcripcional. Dicha regulación puede deberse a que el RSV reduce la expresión y por tanto la capacidad de varios estímulos proinflamatorios como TNF-α o IL-1β para desencadenar la translocación de NF-κB al núcleo, además de influenciar indirectamente la activación de NF-κB mediante la interacción física de la SIRT1 con la subunidad p65 (168); en consecuencia, la expresión de las enzimas derivadas de la ruta de señalización de NF-κB como la óxido nítrico-sintasa inducible (iNOS; del inglés: *Inducible Nitric Oxide Synthase*), COX-2 y diversas MMPs, entre muchas otras, también se puede ver alterada (164,169,170). Esto, a su vez, contribuye a controlar procesos

cruciales que puedan derivar de la inflamación, como la transición epitelio-mesenquimal, en enfermedades como el cáncer (170).

En los últimos años, numerosos estudios *in vitro* e *in vivo* también han hecho hincapié en la capacidad que posee el RSV para inducir apoptosis y suprimir el crecimiento de tumores y la proliferación de diversas células cancerígenas (171,172); del mismo modo, algunos autores han reportado el efecto protector del RSV al inducir autofagia (173,174). Incluso se ha observado como el RSV es capaz de controlar la inflamación, inhibiendo el inflammasoma NLRP3 a través de un aumento del flujo autofágico y la eliminación de las mitocondrias dañadas (88).

### 7.2. RESVERATROL Y AR.

Respecto al efecto del resveratrol sobre la AR en los últimos años también se han incrementado el número de publicaciones que ponen de manifiesto los beneficios derivados del tratamiento con este compuesto tanto *in vitro* como *in vivo*. Estudios desarrollados en células artríticas han demostrado que el resveratrol tiene la capacidad de inducir tanto la ruta de señalización SIRT1/Nrf2 como la expresión de las proteínas antioxidantes sobre las que actúan, la hemoxigenasa-1 (HO-1) y la quinona oxidoreductasa 1 (NQO1; del inglés: *NAD(P)H Dehydrogenase Quinone 1*), entre otras, resultados que también fueron confirmados *in vivo* (175). En un modelo preclínico de artritis inflamatoria experimental desarrollado en conejos se demostró que la inyección intraarticular de resveratrol ayudó a reducir los principales signos inflamatorios de la patología artrítica (destrucción del cartílago articular, pérdida de proteoglicanos e hiperplasia sinovial) (176); asimismo, en una publicación previa de nuestro grupo se detalló como la administración oral de resveratrol fue capaz de reducir la expresión de los principales marcadores de proliferación sinovial e infiltrado inflamatorio en un modelo experimental de artritis (156). Estas modulaciones pueden deberse a que el resveratrol actúa inhibiendo la expresión de las citoquinas maestras en el proceso inflamatorio de la sinovial como son TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  y MMP-3 (177).

### 8. MODELOS ANIMALES DE AR.

Durante décadas se ha hecho un gran esfuerzo para abordar los mecanismos fisiopatológicos que subyacen a la AR inflamatoria; aun así, éstos continúan siendo

## **INTRODUCCIÓN**

grandes desconocidos, dificultando el desarrollo efectivo de nuevos fármacos. Es por ello, que para que una enfermedad como la AR sea entendida completamente, se necesita desarrollar modelos animales que imiten o reflejen ciertas semejanzas con las fases de la enfermedad en humanos (178). A pesar de las limitaciones inherentes a todos los modelos animales, numerosos modelos en roedores han contribuido de forma significativa al avance en la comprensión de los mecanismos patogénicos que dan lugar a la AR inflamatoria, así como a la identificación y validación de nuevas vías y dianas implicadas en el desarrollo de la enfermedad articular en su fase temprana, intermedia y tardía (179). Asimismo, también son útiles a la hora de evaluar la eficacia y seguridad de agentes de uso profiláctico o terapéutico, por lo que su empleo es de gran relevancia en los estudios preclínicos. Aunque se pueden emplear una gran variedad de especies, los roedores, rata y ratón, son más comunes en el estudio del desarrollo y progresión de la enfermedad debido al bajo costo, la homogeneidad del fondo genético, la facilidad de manejo y la posibilidad de emplear un número muestral más amplio. Dependiendo de la técnica empleada, los modelos animales de AR pueden clasificarse en dos grandes categorías: modelos de artritis inducida y modelos de AR espontánea o genéticos (178).

### **8.1. MODELOS ANIMALES DE ARTRITIS INDUCIDA.**

En este tipo de modelos, la enfermedad es provocada experimentalmente mediante la administración de agentes artritogénicos. En comparación con los modelos de AR espontánea, las ventajas de los modelos inducidos son la rentabilidad, la reducción de la necesidad de cría y la reproducibilidad de los protocolos existentes. En contrapartida, la enfermedad generalmente se desarrolla rápido, limitando las ventanas fisiológicas para el estudio del inicio y progresión de la AR. Además, la incidencia, persistencia y cronicidad de la artritis dependerán del modelo empleado (180). A continuación, se detallan los modelos de artritis inducida más utilizados en la actualidad.

#### **8.1.1. Artritis inducida por adyuvante.**

El primer modelo animal descrito para la AR fue el modelo de artritis inducida por adyuvante (AA). En él, la artritis puede inducirse de forma reproducible en cepas de rata susceptibles mediante inyección intradérmica en la base de la cola o inyección intraarticular en las patas traseras de un agente inflamatorio no específico e inmunoestimulante denominado adyuvante. Típicamente se emplea como estímulo el

adyuvante completo de Freund (CFA; del inglés *Complete Freund's Adjuvant*), una mezcla de micobacterias (*Mycobacterium butyricum*) inactivadas por calor suspendidas en una solución acuosa con aceites minerales. A pesar de que existen diferentes tipos de adyuvantes, se ha observado que el CFA induce una artritis más severa y sistémica que la inducida por los demás adyuvantes que carecen de antígeno como pueden ser el adyuvante incompleto de Freund, el pristano o el escualeno, entre otros. Los síntomas suelen observarse pocos días después de la administración del estímulo, alcanzando el pico de gravedad a las pocas semanas, normalmente seguido de un periodo de remisión; pero la enfermedad puede reactivarse mediante la administración repetida de los adyuvantes. A pesar de que el estímulo desencadenante de la AA no es en sí un antígeno, la enfermedad resultante suele asociarse con una susceptibilidad ligada al MHC y es dependiente de la activación de las células T y de la producción de autoanticuerpos, lo que refleja una patofisiología autoinmune (181).

### **8.1.2. Artritis inducida por colágeno.**

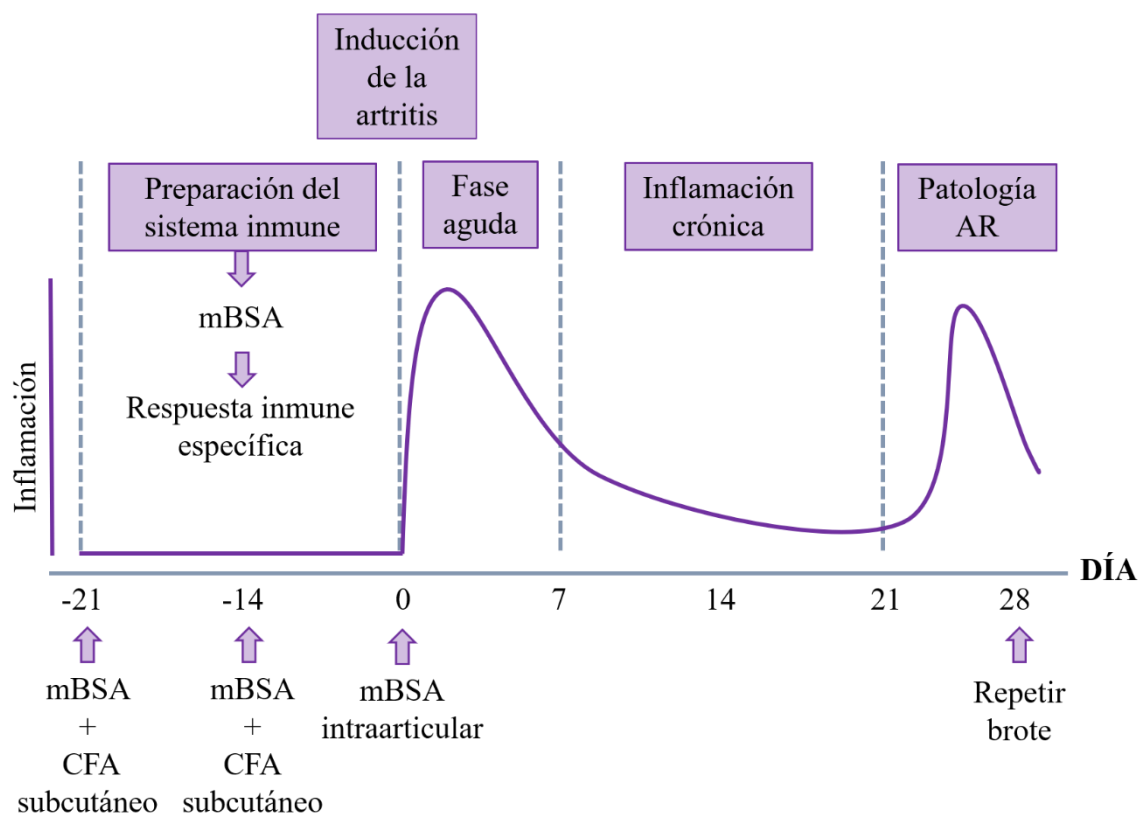
El modelo de artritis inducida por colágeno (CIA; del inglés: *Collagen-Induced Arthritis*) se consigue tras inmunizar a los animales con una emulsión de CFA y colágeno tipo II, proteína esencial en el cartílago articular. Normalmente, la inmunización se realiza mediante una única inyección intradérmica en la base de la cola, pero en ocasiones se realiza una segunda inmunización a los 14-21 días, para asegurar o amplificar la incidencia de la CIA. Esta incidencia puede alcanzarse en el 80-100% de los casos y el tiempo de aparición de las manifestaciones clínicas de la enfermedad suele ser de 21-28 días tras la inmunización (182). La CIA suele provocarse en cepas de ratones susceptibles genéticamente y la enfermedad resultante comparte numerosas características con la AR en humanos, razón por la cual es el modelo de artritis inducida más estudiado (179,182). Con este modelo se consigue una respuesta inmunitaria en la que están implicadas tanto las células T como las células B frente al colágeno tipo II y, además, la susceptibilidad se encuentra relacionada con la expresión de genes específicos del MHC-II y la generación de autoanticuerpos. Asimismo, en los últimos años, el modelo de CIA ha sido de gran ayuda en el desarrollo de las nuevas terapias biológicas como la terapia anti-TNF- $\alpha$  (182). Sin embargo, este modelo presenta ciertos inconvenientes en cuanto a la variabilidad en su incidencia y severidad, así como la inconsistencia entre grupos, reflejo de la gran

## INTRODUCCIÓN

sensibilidad al medio ambiente, a las condiciones de mantenimiento y al estrés de los animales (179).

### 8.1.3. Artritis inducida por antígeno.

El modelo de artritis inducida por antígeno (AIA) se desarrolló por primera vez en conejos por Dumonde y Glynn hace más de 60 años (183) y en la actualidad se trata de un modelo muy valorado, ya que podría ser el análogo experimental más cercano a la AR, desarrollándose también en otras especies como ratas, ratones y cerdos (184). Para el desarrollo de la artritis en este modelo, se prepara el sistema inmune de los animales mediante inyecciones subcutáneas sucesivas de un antígeno catiónico, normalmente seroalbúmina bovina metilada (mBSA; del inglés: *Methylated Bovine Serum Albumin*) emulsionada con CFA en el lomo de los animales y, posteriormente, se induce la enfermedad mediante la inyección intraarticular del mismo antígeno, en una o ambas articulaciones de rodilla. Asimismo, se pueden inducir brotes controlados de la enfermedad mediante la reexposición al antígeno, simulando así los episodios de exacerbación y remisión que se observa en los pacientes con AR (178,185). Con el modelo AIA se consigue una respuesta inflamatoria aguda y de rápida progresión (186), dado que la inflamación de las articulaciones ya es demostrable a las 6 horas tras practicarse la inducción de la artritis, y se mantiene en un pico máximo de inflamación durante aproximadamente 48 horas después de la misma (187). En la **Figura 17** se refleja de forma esquemática el protocolo estándar para el desarrollo del modelo AIA.



**Figura 17. Cronología y fases del desarrollo del modelo de AIA.** Los animales son inmunizados antes de recibir la inyección intraarticular que permite el desarrollo de la artritis. En este modelo se genera una respuesta rápida y exacerbada, que corresponde a la fase aguda de la enfermedad. Imagen inspirada en Jones GW. *et al.*, 2018 (188).

La respuesta inflamatoria obtenida en el modelo AIA conduce a la destrucción articular; esto se debe a que la mBSA tiene la capacidad de unirse al cartílago, cargado negativamente, quedando así retenida en la articulación y haciendo que el daño quede más localizado. De esta forma, en contraste a los modelos de poliartritis autoinmune de AA o CIA y a diferencia de la AR, la AIA es una enfermedad monoarticular, en la que la artritis queda confinada a las articulaciones inyectadas (178). Por otro lado, el proceso histopatológico resultante tiene muchas similitudes con la enfermedad AR en humanos ya que se suceden eventos de hiperplasia de la capa íntima de la sinovial, infiltración perivascular de linfocitos y células plasmáticas, folículos linfoides, formación del *pannus* y erosiones articulares (185). En investigación, este modelo resulta muy interesante ya que permite estudiar una inflamación mediada por complejos inmunes seguida de respuestas dependientes de las células T tanto en la inducción como en la persistencia de la enfermedad, además de estudiar aspectos genéticos de la susceptibilidad y resistencia (184); sin embargo, no se produce la rotura de la tolerancia típica de la patología AR, lo que puede limitar la aplicabilidad de este modelo a la AR (179).

## INTRODUCCIÓN

### 8.2. MODELOS DE ARTRITIS ESPONTÁNEA.

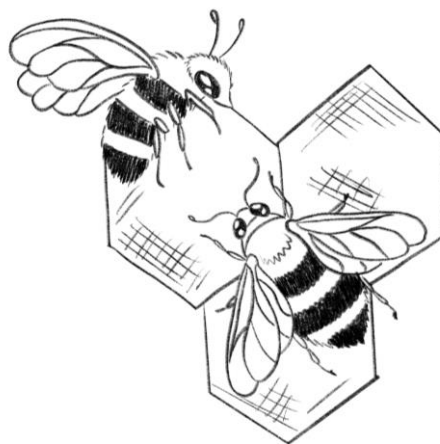
Sumado a los modelos de artritis inducida, el desarrollo de la artritis puede ocurrir espontáneamente en ciertas cepas de ratones modificados genéticamente, es decir, ratones deficientes (*knockout*) o transgénicos para un gen de interés específico. Estos modelos aportan una información muy valiosa acerca del papel que desempeñan determinados genes en el proceso inflamatorio y sirven como herramienta para estudiar el efecto de distintas terapias en ratones propensos a desarrollar inflamación en las articulaciones de forma espontánea (178). Como ejemplo de este tipo de modelos se incluyen los ratones transgénicos portadores del transgén de TNF- $\alpha$  humano que con tres o cuatro semanas de edad comienzan a desarrollar una sinovitis espontánea mediada por los sinoviocitos articulares que sobreexpresan la citoquina. Este modelo pone en manifiesto la importancia de TNF- $\alpha$  en la patogénesis de la AR y es muy empleado en el desarrollo de inhibidores del mismo (189). Asimismo, es muy común el empleo de los ratones K/BxN. Estos desarrollan espontáneamente a las 3-4 semanas de edad una artritis severa y simétrica que recuerda en muchos aspectos a la AR en humanos; la progresión de la artritis en este tipo de ratones es dependiente del MHC-II y necesita de la presencia de células B (178). Por último, los ratones *knockout* del antagonista del receptor de IL-1 $\beta$  también desarrollan una inflamación sinovial espontánea a partir de las 5 semanas de edad e interesantemente, suele acompañarse de una gran producción de anticuerpos contra el colágeno de tipo II y autoanticuerpos como el FR, pero no es común el empleo de este modelo para el estudio de la AR (189).







# JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS





## JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

Como se ha descrito anteriormente, la inflamación crónica e hiperplasia del tejido sinovial son dos procesos clave en el desarrollo de la patología artrítica, ya que causan el daño progresivo de las articulaciones sinoviales, asociado con un gran deterioro de la calidad de vida de los afectados y un alto grado de incapacitación. A pesar de que aún se desconoce la causa exacta por la que tiene lugar la proliferación anormal de la sinovial, se ha sugerido que una baja tasa de muerte celular programada podría ser una posible respuesta a esta incógnita.

Los fármacos actuales están dirigidos a la reducción de la actividad inflamatoria, con el fin de evitar o prevenir el daño articular, el dolor y la discapacidad, pero, debido al carácter crónico de esta enfermedad, el tiempo de tratamiento es dilatado, aumentando el riesgo de padecer efectos secundarios, y también el coste. Además, en ocasiones los pacientes se vuelven no respondedores frente al tratamiento, por lo que no logran alcanzar una baja actividad de la enfermedad. Todo ello ha provocado que en los últimos años la investigación este dirigida a encontrar compuestos naturales con un potencial efecto terapéutico. El resveratrol es un polifenol natural presente en la dieta cotidiana, cuyos efectos beneficiosos han sido demostrados en múltiples patologías crónicas y, concretamente en AR, se ha demostrado por nuestro grupo y otros que este compuesto posee gran potencial antiproliferativo, inmunomodulador, antiinflamatorio y antioxidante, pero aún se desconoce si el resveratrol puede ejercer su acción mediante la activación de mecanismos de muerte celular.

Es por ello, que la finalidad de este estudio es profundizar en los mecanismos por los cuales una dieta antioxidante con resveratrol es capaz de regular la proliferación anormal de la membrana sinovial y el proceso inflamatorio asociado. En concreto, valoraremos si estos procesos pueden ser controlados a través de la activación de mecanismos de muerte celular programada (apoptosis y/o autofagia) en las células sinoviales residentes e infiltrantes; así como moderar la activación del complejo inflamasoma, evitando de este modo, las graves consecuencias que el exceso de celularidad produce en la articulación sinovial artrítica. De ser así, nos puede ayudar a encontrar nuevas dianas terapéuticas y a definir estrategias dietéticas dirigidas al tratamiento de enfermedades reumáticas.

## JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

En base a los antecedentes e hipótesis expuestos, se ha propuesto el siguiente **objetivo general** para este trabajo:

1. Estudiar *in vivo* los efectos de una dieta antioxidante con resveratrol sobre el control de la hiperplasia sinovial a través de mecanismos de muerte celular programada (tipo I-apoptosis y/o tipo II-autofagia) y la respuesta inflamatoria asociada a mediadores inflamatorios en la fase aguda de un modelo animal de artritis inducida por antígeno (AIA).

Para la consecución del objetivo anteriormente mencionado, se llevarán a cabo los siguientes **objetivos específicos**:

- 1.1. Confirmar microscópicamente la capacidad del resveratrol de reducir los principales signos de la sinovitis, hiperplasia e inflamación, en el tejido sinovial de un modelo de AIA.
- 1.2. Evaluar el efecto del resveratrol en el control de la hiperplasia sinovial a través de la activación de mecanismos de muerte celular mediada por autofagia en el tejido sinovial: estudio de la expresión de LC3, p62, y beclin-1.
- 1.3. Analizar el efecto del resveratrol sobre la activación de mecanismos de muerte celular mediada por apoptosis en el tejido sinovial: estudio de la expresión de caspasa-3 activa y PARP.
- 1.4. Estudiar el efecto preventivo del resveratrol sobre la inflamación sistémica y su correlación con el marcador autofágico p62 en el tejido sinovial. Niveles de IL-1 $\beta$ , PGE<sub>2</sub> y PCR.
- 1.5. Evaluar el efecto preventivo del resveratrol sobre el desarrollo de la inflamación sinovial mediada por NF- $\kappa$ B, y su correlación con el marcador autofágico p62.
- 1.6. Evaluar el posible efecto anti-angiogénico del resveratrol: estudio de la expresión de VEGF y Ang-1.







# MATERIALES Y MÉTODOS





### 1. ESTUDIO *IN VIVO* DEL EFECTO DEL RESVERATROL EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE ARTRITIS REUMATOIDE.

#### 1.1. MODELO ANIMAL DE ARTRITIS INDUCIDA POR ANTÍGENO (AIA).

##### 1.1.1. Animales empleados y su estabulación.

Para llevar a cabo el modelo experimental de AIA se utilizaron 24 ratas Lewis hembra de 7-8 semanas de edad y un peso medio de 146 gramos, obtenidas de las instalaciones de *Janvier Labs (Le Genest-Saint-Isle, Francia)*. Todos los animales se mantuvieron a lo largo del tiempo de estudio en condiciones ambientales estándar ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ , humedad relativa del 70-80%, ciclos de luz de 12 horas diarias y acceso a pienso y agua *ad libitum*).

Previamente al desarrollo de este estudio, todos los protocolos experimentales fueron supervisados y aprobados por el Comité Ético de Experimentación Animal (CEEA) de la Xerencia de Xestión Integrada de A Coruña (XXIAC) (código CEEA: P038.2, certificado adjunto en apartado Anexos).

##### 1.1.2. Grupos de estudio y tratamiento con resveratrol (RSV).

Tras una semana de aclimatación, los animales fueron divididos aleatoriamente en cuatro grupos, formados todos ellos por 6 animales:

- **Grupo SANO:** (n=6), a los que no se les indujo artritis ni recibieron ningún tratamiento.
- **Grupo SANO/RSV:** (n=6), a los que no se les indujo artritis y se les administró una dosis diaria de RSV.
- **Grupo AIA:** (n=6), a los que se les indujo artritis y no se les administró ningún tratamiento.
- **Grupo AIA/RSV:** (n=6), a los que se les indujo artritis y se les administró una dosis diaria de RSV.

Para evaluar el posible efecto preventivo del RSV, comenzamos su administración dos meses antes de la inducción de la artritis y se continuó hasta el día del sacrificio, tal y como se muestra en la **Figura 18**. El RSV (*Sigma Aldrich, EE.UU.*) fue preparado diariamente en el momento de ser administrado a cada animal de los grupos RSV

## MATERIALES Y MÉTODOS

(SANO/RSV y AIA/RSV), mediante sondaje orogástrico, en una dosis de 12,5 mg/kg disuelto en 100 µl de agua. Para que los animales de los cuatro grupos fuesen sometidos a las mismas manipulaciones, se administró también 100 µl de agua a los animales de los grupos SANO y AIA.

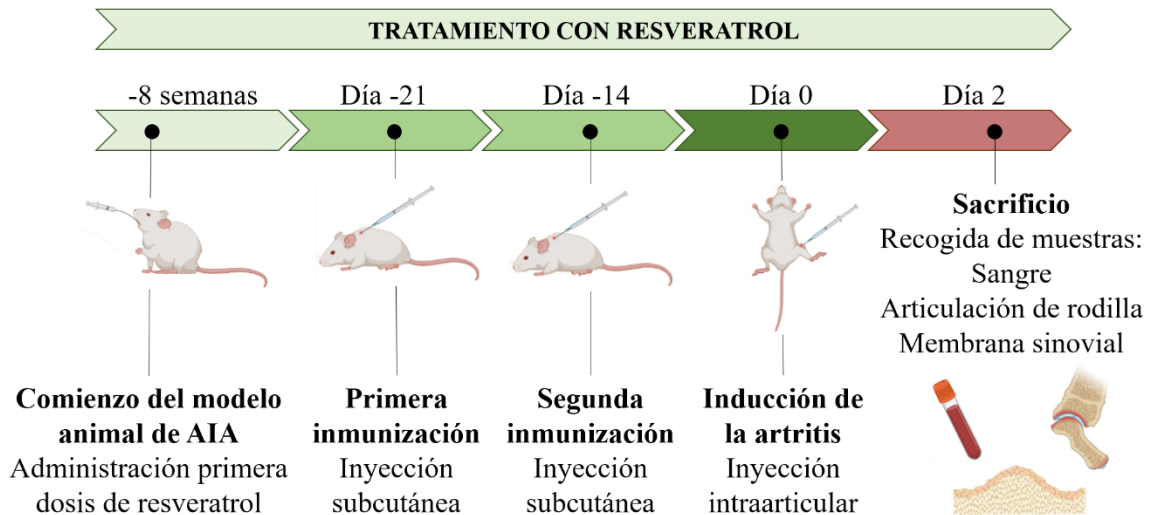
### 1.1.3. Inducción de la artritis.

- **Inmunización:** Para la inmunización de los animales se empleó como antígeno la seroalbúmina bovina metilada (mBSA; del inglés: *Methylated Bovine Serum Albumin*; *Sigma-Aldrich*) emulsionada con adyuvante completo de Freund (CFA; del inglés: *Complete Freund's Adjuvant*; *Sigma-Aldrich*). El procedimiento consistió en la inyección subcutánea en el lomo de los animales de 1 ml de una solución formada por 500 µg de mBSA disuelta en 500 µl de suero salino y emulsionada con 500 µl de CFA, repartiéndose en 5-6 inyecciones. La inmunización se realizó dos veces, en los días 21 y 14 previos a la inducción de la artritis y en todos los animales de los cuatro grupos.

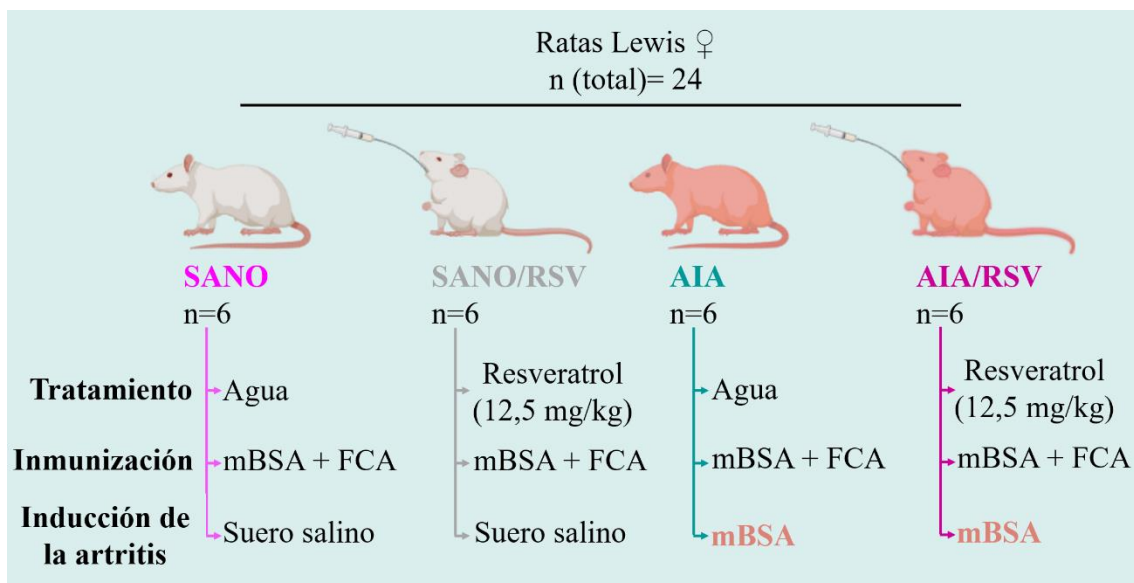
- **Inducción de la artritis:** Para la inducción de la artritis, se inyectaron 500 µg de mBSA disuelta en 50 µl de suero salino en el interior de la cavidad intraarticular de ambas rodillas de los animales de los grupos AIA y AIA/RSV. Por su parte, las ratas pertenecientes a los grupos SANO y SANO/RSV recibieron una inyección de 50 µl de suero salino en ambas rodillas. Este proceso se realizó transcurridos 14 días de la última inmunización (día 0).

- **Sacrificio:** Dos días después de la inducción de la artritis (día 2), coincidiendo con la fase aguda de la enfermedad, se llevó a cabo el sacrificio de todos los animales. Para ello, los animales fueron previamente anestesiados empleando sevoflurano al 5% (*Baxter*, EE.UU.) y O<sub>2</sub> al 100%, 2 L/minuto, y la eutanasia se realizó mediante exanguinación al realizar la extracción de sangre. Para asegurar la muerte, se inyectó a los animales 1 ml de cloruro de potasio vía intravenosa, directamente al corazón.

En las **Figuras 18 y 19** mostradas a continuación, se representa de forma esquemática el cronograma que se ha asumido para llevar a cabo el desarrollo del modelo animal de AIA, donde se indica el momento en el que se realizaron cada una de los procedimientos empleados durante la duración del mismo, así como los grupos de animales que han sido objeto de estudio en este trabajo.



**Figura 18. Cronograma del desarrollo del modelo animal.** El RSV comenzó a administrarse dos meses antes de la inducción de la AR (inyección intraarticular, día 0) y hasta el día del sacrificio animal (día 2). La fase de inmunización se llevó a cabo los días 21 y 14 previos a la inducción de la artritis. Imagen de autoría propia creada con la aplicación BioRender.com.



**Figura 19. Grupos de estudio y manipulaciones realizadas.** Imagen de autoría propia creada con la aplicación BioRender.com.

#### 1.1.4. Obtención de muestras.

En el día del sacrificio, se recogieron muestras de sangre, tejido sinovial y articulación completa de rodilla, de todos los animales de los cuatro grupos.

- **Sangre:** Una vez anestesiados los animales con sevoflurano, se procedió a abrir la cavidad peritoneal para localizar la vena cava. Una vez localizada, se realizó la extracción de sangre empleando jeringas *safePICO* de 4 ml (*Radiometer*, España), conteniendo

## MATERIALES Y MÉTODOS

heparina sólida. La sangre extraída fue trasvasada a tubos *Vacurette*<sup>®</sup> con aditivos activadores de la coagulación y gel (*Labolan*, España). Esta sangre se utilizó para la obtención del suero de cada animal, mediante la centrifugación a 3.000 rpm durante 10 minutos. Los sueros se almacenaron a -80°C hasta su utilización. Estas muestras se emplearon tanto en la determinación de marcadores sistémicos de inflamación mediante ELISA o con la técnica de inmunoensayos múltiples, Milliplex.

Una vez extraída la sangre y realizada la eutanasia de los animales, se procedió a la obtención de las muestras de tejido.

- **Membrana sinovial:** Se extrajo el tejido sinovial de las articulaciones de la rodilla derecha de los animales. Para ello, se realizó una incisión en la piel, dejando expuesta la articulación. A continuación, se realizó un corte a nivel de la tibia para poder acceder a la cavidad articular y localizar la membrana sinovial, que se aisló e incluyó inmediatamente con medio de congelación *Tissue-Tek*<sup>®</sup> *O.C.T.*<sup>™</sup> *Compound* (*Sakura Finetek Europe B.V.*, Holanda). Posteriormente, se sumergió en isopentano (*VWR International*, EE.UU.) enfriado con nitrógeno líquido para permitir la congelación inmediata del tejido, que fue almacenado a -80°C.

- **Articulación de la rodilla:** Se extrajo la articulación de la rodilla izquierda de todos los animales. Para ello, se seccionó la pata lo más próxima a la articulación y se extrajeron los tejidos de alrededor (músculos y tendones), delimitándola todo lo posible (**Figura 20**).



**Figura 20.** Vista frontal de una articulación trasera de rata tras ser aislada.

Una vez extraídas todas las articulaciones, se fijaron en formaldehído al 4% durante 24 horas y se descalcificaron con una solución de ácido fórmico (*Honeywell Fluka*<sup>TM</sup>, EE.UU.) al 40% y citrato sódico al 20% en una proporción 1:1 durante 4 días. Tras su descalcificación, se procedió a tallar las muestras sagitalmente, dividiéndolas en dos mitades, que fueron posteriormente incluidas en parafina empleando un procesador automático de tejidos *STP 120* (*MYR especialidades médicas*, España), siguiendo un protocolo comercial específico. Finalmente, el bloque de tejido incluido en parafina se seccionó en cortes de 4  $\mu\text{m}$  de grosor con un microtomo *Leica RM 2155* (*Leica Microsystems*, Alemania). Estas muestras fueron empleadas en los estudios histológicos.

### 1.2. EVALUACIÓN MACROSCÓPICA DE LA ARTICULACIÓN ARTRÍTICA.

La severidad de la AR se evaluó mediante la medida del diámetro articular en las dos rodillas de cada animal en el día 0 (previamente a la inyección intraarticular) y en los días 1 y 2 posteriores, lo que permitió realizar un seguimiento de la evolución y grado del proceso inflamatorio en la articulación. Para realizar la medida, se empleó el calibre digital *S\_Cal WORK* (*Sylvac*, España). Para llevar a cabo la evaluación, se anestesió a los animales con sevoflurano (5% para su inducción y reducción al 3% para su mantenimiento) y O<sub>2</sub> al 100%, 2 l/minuto, y se colocaron tumbados sobre su lomo. A continuación, se flexionó ligeramente la rodilla a medir y se procedió a realizar seis medidas consecutivas del diámetro articular. Estas medidas fueron realizadas siempre por la misma persona para evitar introducir variabilidad en la técnica. El valor final del diámetro articular se expresó en milímetros y se corresponde a la media de las seis mediciones.

### 1.3. EVALUACIÓN MICROSCÓPICA DE LA ARTICULACIÓN ARTRÍTICA.

#### 1.3.1. Tinciones histoquímicas.

Para evaluar a nivel microscópico el proceso artrítico en las articulaciones que fueron previamente incluidas en parafina, se realizó la tinción histoquímica hematoxilina-eosina (H-E). Esta tinción permite visualizar las distintas estructuras que componen la articulación, el estado general en el que se encuentran y analizar la presencia de infiltrado celular. El protocolo que se siguió para realizar la técnica fue el siguiente:

## MATERIALES Y MÉTODOS

- **H-E:** Para el desparafinado de las secciones, se comenzó colocándolas en una estufa a 60°C durante 30 minutos para posteriormente sumergirlas en xilol durante 10 minutos. A continuación, se procedió a hidratar los cortes en una batería de alcoholes (etanol) de gradación decreciente (100°, 96°) y un aclarado final con agua corriente. Seguidamente, las secciones se sumergieron en hematoxilina de Harris (*Bio-Optica*, Italia) durante 5 minutos, se aclararon con agua corriente para obtener el viraje crómico y se contratiñeron con eosina (*Panreac*, Barcelona) durante 5 minutos. Finalmente, se llevó a cabo la deshidratación de las muestras empleando una batería creciente de alcoholes (96°, 100°) y un último pase en xilol. El montaje se realizó con *DePeX* (*Sigma-Aldrich*).

### 1.3.2. Tinciones inmunohistoquímicas.

Para evaluar la expresión de los distintos mediadores inflamatorios y marcadores de proceso de muerte celular programada tipo I/apoptosis y tipo II/autofagia se realizaron tinciones inmunohistoquímicas. En un primer paso de desparafinado, las secciones se colocaron en una estufa a 60°C durante 10 minutos, seguido de un tratamiento con xilol durante otros 10 minutos. Posteriormente, se procedió a hidratar los cortes en una batería de alcoholes de gradación decreciente (100°, 96°, 80° y 70°) y un aclarado final en agua destilada (H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>), durante 2 minutos en cada uno. Seguidamente, se realizó un lavado con tampón fosfato salino (PBS; del inglés: *Phosphate Buffered Saline*) pH 7,6; *MP Biomedicals*, EE.UU.). Para el desenmascaramiento del antígeno, necesario para detectar la señal de los anticuerpos, las secciones para SQSTM1/p62 (*R&D Systems*, EE.UU.), beclin-1 (*Cell Signaling Technology*, EE.UU.), PARP (*BD Biosciences Pharmingen*, Suiza) y VEGF (*Santa Cruz Biotechnology*, EE.UU.) se sometieron a calor en una olla a presión sumergidos en la solución comercial con EDTA 1X (*Target Retrieval Solution, pH 9, 3-in-1*; *Dako*, Dinamarca) durante 15 minutos; mientras que las secciones para angiopoyetina-1 (*Santa Cruz Biotechnology*) y la subunidad p65 del factor de transcripción NF-κB (*Santa Cruz Biotechnology*) se trataron con ácido fórmico al 10% durante 12 minutos y las de caspasa-3 (*Abcam*, Reino Unido) fueron tratadas con proteinasa K (*Dako*) durante 6 minutos, siguiendo las recomendaciones del fabricante. A continuación, se realizó otro lavado con PBST (PBS pH 7,6 con 0,2% de TWEEN<sup>®</sup>20, *Sigma-Aldrich*) y se inhibió la actividad peroxidasa endógena mediante la incubación de las secciones con una solución comercial (*Dako*) durante 10 minutos. Se bloquearon los lugares de unión no específicos mediante la incubación durante 30 minutos con una



solución de seroalbúmina bovina (BSA; del inglés: *Bovine Serum Albumin*, Sigma-Aldrich) libre de IgG al 0,2% con PBST al 0,2%. Posteriormente, las secciones se incubaron con los anticuerpos primarios a las concentraciones descritas en la **Tabla 2**. Transcurrida la incubación *overnight* a 4°C de las secciones, se realizaron tres lavados de 5 minutos cada uno con PBST. Seguidamente, las secciones se incubaron durante 30 minutos con el anticuerpo secundario frente a conejo/ratón conjugado con peroxidasa de rábano picante HRP (HRP; del inglés: *Horseradish Peroxidase*) (*Dako REAL™ EnVision™*, *Dako*). Transcurrido el tiempo, se realizaron nuevamente tres lavados de 5 minutos cada uno con PBST, y se incubaron las muestras con el cromógeno 3,3'-diaminobencidina (DAB; *Dako*) durante 5 minutos, empleado para la detección de los anticuerpos. Finalmente, se detuvo la reacción realizando tres lavados con H<sub>2</sub>O de 5 minutos cada uno y se contratiñeron las secciones con hematoxilina de Gill III (*Merck*, España) durante 2 minutos, realizándose el viraje colorimétrico con agua corriente. Finalmente, se deshidrataron las muestras en una batería de alcoholes de gradación creciente (96°, 100°) y xilol y, por último, se realizó el montaje con *DePeX*.

En las secciones destinadas a identificar la expresión de los marcadores beclin-1 y PARP no se practicó la contratiñición con hematoxilina de Gill III. Este recurso facilitó la identificación de la señal positiva correspondiente a dichos marcadores, cuya expresión en el tejido sinovial es tenue.

### 1.3.4. Inmunofluorescencia.

La expresión del marcador autofágico LC3B se analizó mediante microscopía de fluorescencia. Para el desarrollo de la técnica, se comenzó por el desparafinado y posterior hidratación de las muestras, siguiendo el protocolo descrito en el apartado 1.3.3. Tras realizar un lavado de 5 minutos con PBS, se incubó durante 12 minutos con ácido fórmico al 10% para el desenmascaramiento antigénico. A continuación, se realizó un lavado con PBST y se bloquearon las uniones no específicas usando BSA libre de IgG al 0,2% en PBST, antes de la incubación durante toda la noche a 4°C con el anticuerpo primario frente a LC3B (*Cell Signaling Technology*), que reconoce las isoformas LC3B-I y LC3B-II, pero presenta mayor especificidad frente a éste último (**Tabla 2**). Tras realizar un nuevo lavado con PBST durante 5 minutos, se incubaron las muestras con el anticuerpo secundario marcado con un fluoróforo de burro frente a conejo cuya señal de fluorescencia es roja, *Alexa Fluor® 568* (*Life Technologies*, EE.UU.) durante 1 hora a

## MATERIALES Y MÉTODOS

temperatura ambiente. Finalmente, las secciones se contratiñeron con el marcador nuclear 4', 6-diamidino-2-fenilindol (DAPI; del inglés: *4',6-Diamidino-2-Phenylindole*, Sigma-Aldrich) cuya señal de fluorescencia es azul, y se montaron con Glicergel (Dako).

**Tabla 2. Lista de anticuerpos empleados en el desarrollo de las tinciones de inmunohistoquímica e inmunofluorescencia.**

Anticuerpo	Animal de origen	Concentración empleada
anti-LC3B	Conejo	1:300
anti-p62/SQSTM1	Conejo	1:60
anti-beclin-1	Conejo	1:150
anti-caspasa-3 activa	Conejo	1:100
anti-PARP	Ratón	1:100
anti-NF- $\kappa$ B subunidad p65	Conejo	1:100
anti-VEGF	Ratón	1:100
anti-Ang-1	Conejo	1:550

LC3B: del inglés, *Microtubule-Associated Protein-Light Chain 3B*; p62/SQSTM1: p62/Sequestosoma-1; PARP: Poli-ADP Ribosa Polimerasa; NF- $\kappa$ B: Factor Nuclear  $\kappa$ B (del inglés, *Nuclear Factor- $\kappa$ B*); VEGF: Factor de Crecimiento Vasoendotelial (del inglés, *Vascular Endothelial Growth Factor*); Ang-1: Angiopoyetina-1

### 1.3.5. Análisis y cuantificación de imágenes.

Para el análisis y cuantificación de la señal positiva obtenida, una vez realizadas las técnicas de inmunohistoquímica e inmunofluorescencia, se ha tenido en cuenta la señal presente en la membrana sinovial de la articulación de la rodilla, por ser el principal tejido afectado durante el proceso inflamatorio de la AR.

Para visualizar las muestras a las que se les practicó las tinciones inmunohistoquímicas se empleó un microscopio *Olympus BX61* (Olympus, Japón) y para aquellas en las que se examinó la presencia del marcador autofágico LC3B mediante inmunofluorescencia se empleó un microscopio de Barrido Láser Confocal *TCS SP2* (Leica).

Una vez localizada la sinovial, se tomaron múltiples imágenes de todo su conjunto, que posteriormente fueron analizadas y cuantificadas utilizando el programa de procesamiento de imágenes *ImageJ* versión 1.50e (NIH, EE.UU.). Así, la positividad de la señal en la membrana sinovial se obtuvo como un promedio de la señal positiva

obtenida en cada una de las imágenes. Los resultados se expresaron como píxeles positivos en el área total.

### 1.4. ANÁLISIS DE LA PROTEÍNA C REACTIVA.

Para la determinación de los niveles sistémicos de la Proteína C Reactiva (CRP; del inglés: *C Reactive Protein*) presentes en los sueros de los animales, se utilizó el *kit* específico para rata *Rat C-Reactive Protein ELISA Kit (Alpha Diagnostic International, EE.UU.)*, con una sensibilidad de 2 ng/ml. Para realizar la técnica, utilizamos 100  $\mu$ l de los sueros previamente diluidos 1/35.000 con el diluyente proporcionado por el *kit*, que se añadieron a los pocillos de la placa de ELISA, los cuales tienen fijados anticuerpos anti-CRP específicos de rata. Transcurrida 1 hora de incubación a temperatura ambiente, se realizaron cuatro lavados de los pocillos con el tampón de lavado facilitado por el *kit*. A continuación, se añadió el anticuerpo secundario específico para CRP conjugado con HRP y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente. Pasado el tiempo de incubación, se realizaron cinco lavados y seguidamente, se añadió el sustrato cromogénico para HRP (una combinación del cromógeno tetrametilbencidina con peróxido de hidrógeno). Tras una incubación de 15 minutos, se interrumpió la reacción añadiendo una solución de ácido sulfúrico al 1% y se analizó el viraje colorimétrico proporcional a la cantidad de CRP presente en la muestra. Para ello, en los 30 minutos siguientes, se realizó la medida de la absorbancia empleando el espectrofotómetro *NanoQuant Infinite<sup>®</sup> M200 PRO (Tecan, Suiza)* a 630 nm y 450 nm (los valores obtenidos corresponden a la diferencia entre ambas lecturas). La concentración de CRP presente en los sueros se extrapola a partir de una curva patrón con un rango de detección de 2 a 60 ng/ml. Cada determinación se realizó por duplicado y los resultados fueron expresados en  $\mu$ g/ml.

### 1.5. ANÁLISIS DE LA PROTAGLANDINA E<sub>2</sub>.

Para la determinación de los niveles de Prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) circulante presente en los sueros de las ratas, se empleó el *kit* comercial *Prostaglandin E<sub>2</sub> Enzyme Immunoassay (DetectX<sup>®</sup>, Arbor Assays<sup>™</sup>, EE.UU.)*, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Brevemente, este ensayo, es un ensayo competitivo en el que la PGE<sub>2</sub> de las muestras compiten con una cantidad fija de PGE<sub>2</sub> marcada con peroxidasa por los lugares de unión al anticuerpo anti-PGE<sub>2</sub>. La mezcla formada por las muestras más la solución de

## MATERIALES Y MÉTODOS

PGE<sub>2</sub> marcada con peroxidasa se incubaron con un anticuerpo monoclonal anti-PGE<sub>2</sub>, procedente de ratón, en la placa de ELISA que está revestida de un anticuerpo de captura de cabra anti-IgG de ratón.

Para realizar el ensayo se tomaron 50 µl de los sueros previamente diluidos 1/10 con un tampón provisto por el *kit*, que fueron añadidos a cada pocillo de la placa ELISA. A continuación, se agregó un conjugado de PGE<sub>2</sub>-peroxidasa y, seguidamente, la reacción de unión se inició mediante la adición de un anticuerpo monoclonal de ratón específico para PGE<sub>2</sub> a cada pocillo. Tras una incubación en agitación durante 2 horas a temperatura ambiente, se realizaron cuatro lavados de los pocillos con el tampón de lavado que proporciona el *kit* y se incubó con el sustrato cromogénico de la peroxidasa, TMB (3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina), durante 30 minutos. La reacción se detuvo con una solución 1M de ácido hidrociorídrico. La intensidad del color generado fue detectada a 450 nm empleando el espectrofotómetro *NanoQuant Infinite<sup>®</sup> M200 PRO*. La concentración de PGE<sub>2</sub> presente en los sueros se extrapoló a partir de una curva patrón con un rango de detección de 3,9 a 500 pg/ml. La sensibilidad del ensayo es de 3,07 pg/ml. Cada determinación se realizó por duplicado y los resultados fueron expresados en pg/ml.

### 1.6. DETERMINACIÓN DE NIVELES SÉRICOS DE CITOQUINAS MEDIANTE MILLIPLEX.

La determinación de los niveles séricos de las citoquinas leptina, interleuquina (IL)-1β, IL-6, IL-18, proteína quimioatrayente de monocitos-1 (MCP-1; del inglés: *Monocyte Chemoattractant Protein-1*), quimioatrayente de neutrófilos 1 inducido por citoquinas (CINC-1; del inglés: *Cytokine-Induced Neutrophil Chemoattractant 1*), VEGF y el factor de necrosis tumoral α (TNF-α; del inglés: *Tumor Necrosis Factor-α*) se realizó mediante un ensayo multiplex basado en la tecnología Luminex<sup>®</sup> xMAP<sup>®</sup> con el *kit MILLIPLEX<sup>®</sup> MAP Rat Cytokine/Chemokine Magnetic Bead Panel (EMD Millipore, EE.UU.)*. Esta tecnología permite la cuantificación simultánea de numerosos analitos contenidos en una determinada muestra realizando inmunoensayos en la superficie de microesferas magnéticas de poliestireno de 6,45 µm codificadas internamente con fluorescencia.

Para comenzar el ensayo, se añadió a cada pocillo una matriz de suero cuya función es mimetizar el ambiente nativo en el que se encuentran los analitos. A continuación, se añadió 25 µl de los sueros diluidos 1/10 en un tampón suministrado con el *kit* y,

seguidamente, la mezcla de microesferas magnéticas recubiertas con anticuerpos de captura específicos frente a los analitos de interés. La placa se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente y agitación constante. Transcurrido este tiempo, se realizaron dos lavados con el tampón de lavado provisto por el *kit* y empleando una placa magnética para evitar que las microesferas se pierdan entre lavados. Posteriormente, se añadió una solución que contiene anticuerpos de rata biotinilados y específicos para la detección de aquellas citoquinas que fueron capturadas en la superficie de las microesferas. La placa se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente y agitación continua. Tras la incubación, se completó la reacción en la superficie de la microesfera al introducir un conjugado de estreptavidina-ficoeritrina. La mezcla se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, se realizaron dos nuevos lavados y se añadió PBST al 0,05%. La lectura se llevó a cabo empleando el sistema *MAGPIX*<sup>®</sup> (*Millipore*, EE.UU.). Únicamente se muestran los resultados obtenidos para IL-1 $\beta$ . La concentración de IL-1 $\beta$  presente en los sueros se extrapola a partir de una curva patrón con un rango de detección de 2,4 a 10.000 pg/ml. La sensibilidad del ensayo es de 2,8 pg/ml. Para validar los resultados obtenidos se emplearon controles de calidad para cada uno de los analitos a determinar; así, los rangos para cada uno de los controles de IL-1 $\beta$  son 102-213 y 555-1.154 pg/ml. Cada determinación se realizó por duplicado y los resultados fueron expresados en pg/ml.

### 1.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Los datos se expresaron como la media  $\pm$  el error estándar de la media (EEM). Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software estadístico *GraphPad PRISM*<sup>®</sup> versión 5.01 (*GraphPad Software*, EE.UU.). Los datos no paramétricos se analizaron mediante la prueba de *Mann-Whitney*. Cuando se realizaron comparaciones múltiples, se empleó la prueba ANOVA. Los análisis de correlaciones se llevaron a cabo empleando la prueba de *Spearman*. Las diferencias se consideraron significativas cuando  $p \leq 0,05$ .

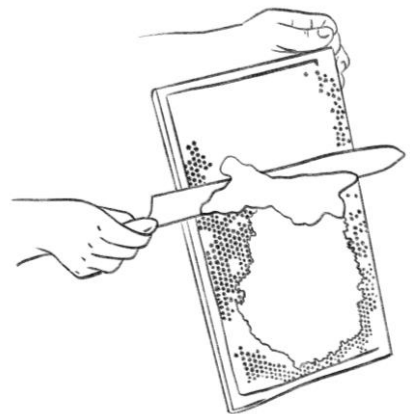








## RESULTADOS





### **1. ESTUDIO *IN VIVO* DE LA ACTIVACIÓN POR RESVERATROL DE MECANISMOS DE MUERTE CELULAR PROGRAMADA Y SU RELACIÓN CON EL PROCESO INFLAMATORIO EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE ARTRITIS INDUCIDA POR ANTÍGENO.**

Resultados previos de este grupo demostraron que el resveratrol es capaz de reducir *in vivo* los principales marcadores de la patología artrítica en un modelo experimental de artritis reumatoide (AR): limitando la proliferación sinovial, evaluada de forma específica con el antígeno nuclear de células en proliferación, PCNA (del inglés: *Proliferating Cell Nuclear Antigen*) y disminuyendo tanto el infiltrado inmune de células T y macrófagos hacia la articulación como la producción de mediadores inflamatorios como el quimioatrayente de neutrófilos 1 inducido por citoquinas, CINC-1 (del inglés: *Cytokine-Induced Neutrophil Chemoattractant 1*). Además, el resveratrol contribuye a modular el estrés y daño oxidativo característicos de una articulación artrítica, así como el crecimiento anormal del tejido sinovial, previniendo así el desarrollo y progresión de la enfermedad en un modelo agudo de artritis inducida por antígeno (AIA) (156).

Dados estos antecedentes, el siguiente paso fue desentrañar si en la reducción de la proliferación sinovial que induce el resveratrol podría estar implicada la activación de diferentes mecanismos de muerte celular programada, autofagia y/o apoptosis, en las células del tejido sinovial, así como el control de la respuesta inflamatoria asociada a nivel local y sistémico; además de la modulación en la generación de nuevos vasos sanguíneos. En base a esta hipótesis se obtuvieron los resultados que aparecen mostrados a continuación.

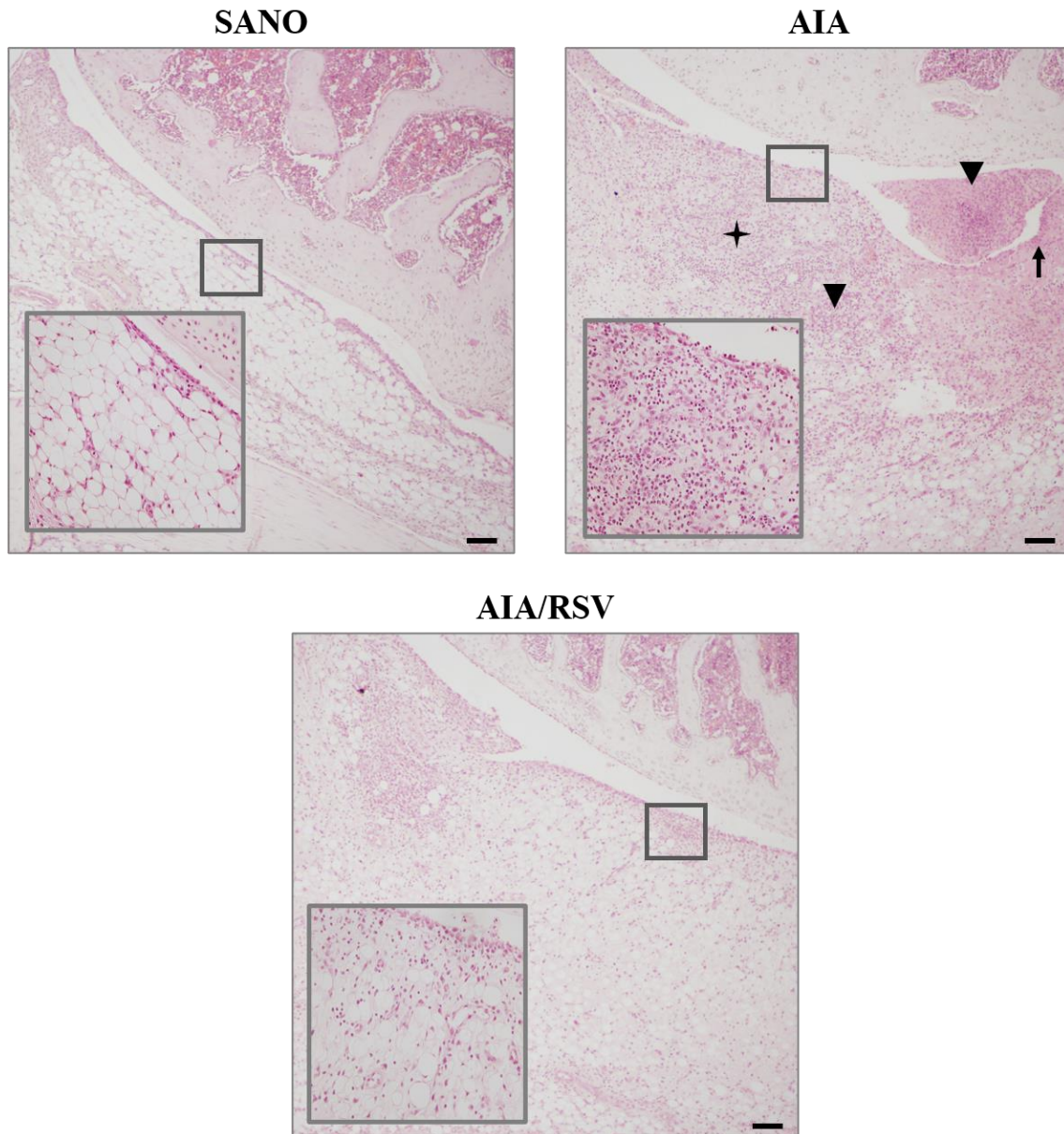
#### **1.1. EFECTO DEL RESVERATROL EN EL DESARROLLO DE LA AIA: ANÁLISIS HISTOLÓGICO DE LA MEMBRANA SINOVIAL.**

En primer lugar, se corroboró mediante análisis histológico, los resultados que previamente ha descrito nuestro grupo, confirmándose el efecto profiláctico del resveratrol. En concreto, los animales del grupo AIA/RSV recibieron una dosis diaria (12,5 mg/kg) de resveratrol, que se les administró durante los dos meses previos a la inducción de la artritis y hasta el día del sacrificio. Para llevar a cabo el análisis histológico, se realizó la tinción H-E en cortes de las articulaciones embebidas previamente en parafina, y se examinó la estructura articular, y más específicamente, la

## RESULTADOS

membrana sinovial. De esta forma, se valoró la proliferación celular de la capa íntima de la sinovial, la densidad de células residentes en el estroma sinovial y la densidad del infiltrado inflamatorio como aspectos característicos del proceso de sinovitis, a fin de obtener la información necesaria acerca del desarrollo de la AIA, así como del efecto antiproliferativo e antiinflamatorio del resveratrol.

En la **Figura 21** se representan las membranas sinoviales de los grupos SANO, AIA y AIA/RSV. Como se puede observar, las muestras de los animales sanos presentaron la estructura propia de una sinovial normal; con una capa íntima totalmente definida, formada por una o dos capas de sinoviocitos, mientras que la subíntima es fundamentalmente adiposa, con la presencia de una cantidad reducida de células residentes y sin un aparente infiltrado de células inmunes. Un escenario muy distinto se observó en la sinovial de los animales pertenecientes al grupo AIA, a los que se les indujo la artritis y no recibieron ningún tratamiento. En este caso, la sinovial mostró un alto nivel de desorganización, debido a la pérdida de estructura de la capa íntima, muy proliferada, el gran incremento en el número de células residentes en el estroma sinovial y la enorme densidad de células del infiltrado inmune, distribuidas homogéneamente a lo largo de todo el tejido, con la destacada formación de grandes agregados celulares en forma de folículo. Sin embargo, el tejido sinovial de los animales del grupo AIA/RSV mostró nuevamente una estructura más organizada, que recordó a la estructura típica de una sinovial sana. La capa de revestimiento, a pesar de su proliferación, se mostró definida y diferenciada de la capa profunda de la sinovial, en la que se observó un tejido fundamentalmente adiposo, con una notable reducción tanto en la densidad de células residentes como en el infiltrado de células inflamatorias. Así, se confirmó que el resveratrol es capaz de reducir los principales signos de sinovitis, hiperplasia sinovial e inflamación, en el desarrollo de un modelo agudo de artritis inducida por antígeno.



**Figura 21. Evaluación microscópica del efecto del resveratrol sobre el desarrollo de un modelo agudo de AIA.** Imágenes representativas de la membrana sinovial de los grupos de estudio: SANO, AIA y AIA/RSV. Las imágenes originales se muestran a una magnificación de 4x; los detalles que aparecen delimitados se muestran a una magnificación de 20x y se corresponden con una zona representativa de la imagen original a 4x. Barra de escala equivalente a 100  $\mu\text{m}$ . En los grupos formados por animales sanos y aquellos que recibieron un tratamiento diario con resveratrol se observó un elevado nivel de organización en el tejido sinovial. El grupo AIA mostró los principales signos de la sinovitis articular. Flecha ( $\uparrow$ ): proliferación de la capa íntima; cabeza de flecha ( $\blacktriangledown$ ): folículos y agregados inflamatorios fácilmente observados en la membrana sinovial AIA; estrella ( $\blackplus$ ): exceso de celularidad derivada de la hiperplasia de las células residentes de la sinovial, que finalmente han sustituido a la capa de adipocitos típica de la sinovial normal.

## RESULTADOS

### 1.2. MECANISMOS DE MUERTE CELULAR EN EL CONTROL DE LA HIPERPLASIA SINOVIAL: EFECTO DEL RESVERATROL.

Previamente se ha detallado como la hiperplasia sinovial asociada a la proliferación de células residentes y al infiltrado local de células inmunitarias e inflamatorias es una de las principales características patológicas en la AR y que, entre otras causas, este aumento anormal en el número de células podría ser el resultado de una muerte celular defectuosa dentro del tejido sinovial. Es por ello, que el eje central de este trabajo se estableció bajo la hipótesis de que el resveratrol podría ejercer sus propiedades antiproliferativas mediante la regulación de las vías de muerte celular programa de tipo I o apoptosis y/o tipo II o autofagia. Dado que la relación entre la apoptosis y la autofagia es claramente dependiente del contexto tisular y que ambas actúan modulándose mutuamente, el principal objetivo de este trabajo consistió en evaluar el efecto del resveratrol en la activación de los mecanismos de muerte celular programada, y si su uso podría actuar dirigiendo el balance entre ambos tipos de muerte hacia la apoptosis o la autofagia, en un modelo agudo de AIA.

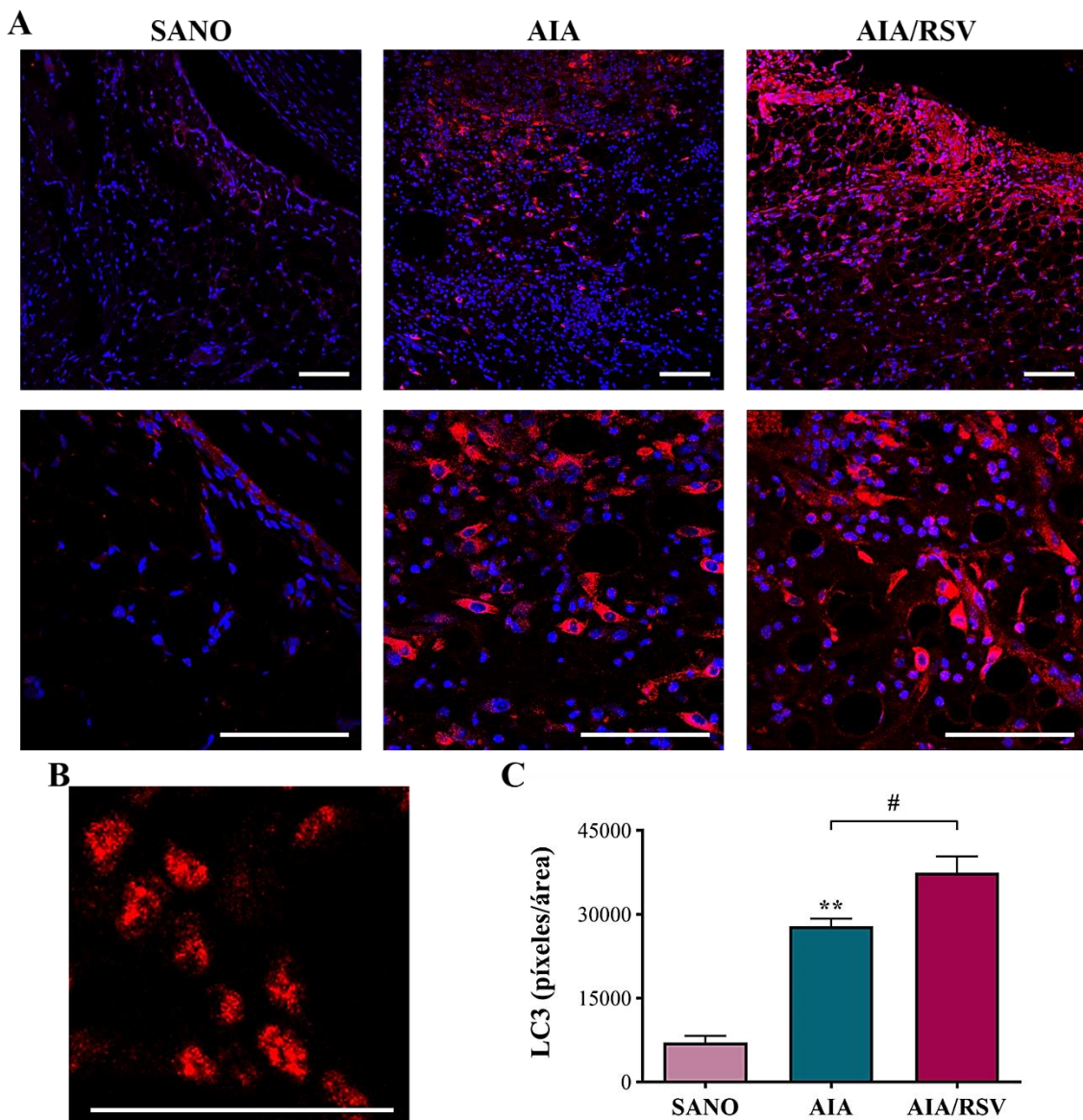
Los resultados obtenidos durante el desarrollo de este objetivo se muestran a continuación.

#### 1.2.1. El resveratrol suprime la hiperplasia sinovial al aumentar el flujo autofágico.

##### 1.2.1.1. El resveratrol induce la aparición de vacuolas autofágicas en la membrana sinovial. Expresión y localización de LC3.

Como primer paso para evaluar si el resveratrol era capaz de incrementar el flujo autofágico se empleó el marcador LC3 (del inglés: *Microtubule-Associated Protein 1A/1B-Light Chain 3*) localizado en las membranas de las vesículas autofagosómicas y, por tanto, un buen indicador del proceso de flujo autofágico. Para ello, se empleó el anticuerpo anti-LC3B, con gran especificidad frente a LC3B-II, y se valoró la señal obtenida (señal de fluorescencia roja) mediante análisis confocal de inmunofluorescencia en las secciones de la articulación de rodilla embebidas en parafina. Como se muestra en la **Figura 22A** y **22C**, mientras el tejido sinovial de los animales sanos únicamente exhibió una señal basal muy reducida y dispersa en el citoplasma de las células de la capa íntima, la sinovial del grupo AIA mostró un incremento en la señal de este marcador

( $p \leq 0,001$ ), localizándose principalmente en el infiltrado celular. Sin embargo, la mayor expresión de LC3 se encontró en el grupo AIA/RSV, con una señal significativamente mayor ( $p \leq 0,05$ ) que la observada en el grupo AIA. La sinovial de los animales pertenecientes al grupo AIA/RSV mostró un marcaje celular homogéneo para LC3 a lo largo de todo el tejido y, asimismo, tal y como se muestra en la **Figura 22B**, se detectó la presencia de vacuolas autofágicas. Estos resultados sugieren que el RSV es capaz de inducir la actividad autofágica mediante un incremento de la expresión de LC3 y formación de vesículas autofágicas en el tejido sinovial de un modelo de AIA.



**Figura 22. El uso de resveratrol induce el flujo autofágico en un modelo agudo de AIA.** Los animales fueron tratados con agua o resveratrol (12,5 mg/kg/día) los dos meses previos a la inducción de la AIA y hasta el día del sacrificio. (A) Imágenes representativas de la inmunofluorescencia para LC3 de cada uno de los grupos de estudio, mostradas a una magnificación de 20x (paneles superiores) y 63x (paneles inferiores). La señal de LC3 se observó en rojo y los núcleos en azul. Barra de escala equivalente a 100  $\mu$ m. (B) Detalle

## RESULTADOS

de vacuolas autofágicas. Barra de escala equivalente a 100  $\mu\text{m}$ . (C) El análisis cuantitativo de la totalidad de la membrana sinovial demostró que la máxima expresión de LC3 se alcanzó en el grupo AIA/RSV. Los datos se representan como la media  $\pm$  SEM (n=6); \*\*  $p \leq 0,001$  frente a SANO y #  $p \leq 0,05$  frente a AIA.

### 1.2.1.2. El consumo de p62 refleja el aumento del flujo autofágico inducido por resveratrol.

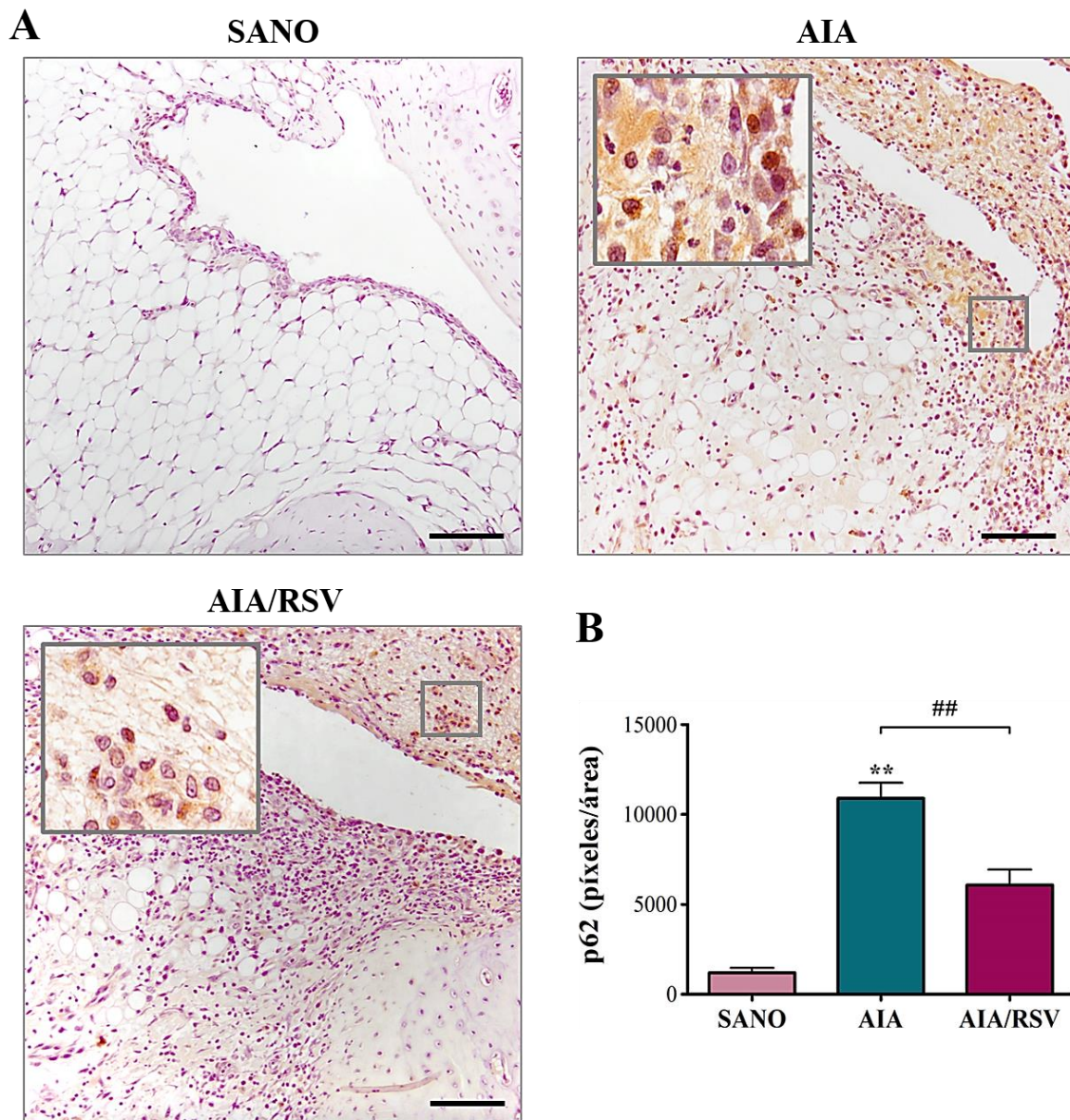
Tras valorar el efecto del resveratrol en la inducción del flujo autofágico en el que el marcador LC3 se encuentra involucrado, el siguiente paso fue confirmar dicho resultado, evaluando la expresión de p62, un sustrato autofágico fuertemente asociado a LC3, cuya degradación puede evidenciar un aclaramiento autofágico regulado al alza. Para ello, se empleó el anticuerpo anti-p62 y se evaluó mediante tinción inmunohistoquímica la señal positiva en las secciones de la articulación de rodilla de todos los grupos objeto de estudio. Como se observa en la **Figura 23** y, en concordancia con el resultado obtenido para el marcador LC3, las sinoviales del grupo AIA mostraron una expresión de p62 significativamente mayor ( $p \leq 0,001$ ) que la obtenida en el grupo control formado por animales sanos, localizándose principalmente en el infiltrado celular y células residentes en la capa íntima. En contraste, la señal positiva observada en el tejido sinovial del grupo de animales a los que se les indujo AIA y fueron tratados con resveratrol sufrió un evidente descenso ( $p \leq 0,005$ ), lo que podría reflejar como el resveratrol es capaz de realzar el flujo autofágico en la membrana sinovial de un modelo de AIA.

### 1.2.1.3. El resveratrol no induce la vía canónica de la autofagia (dependiente de beclin-1) en el modelo AIA.

Para tener un detalle más preciso de la actividad autofágica, se evaluó la expresión en el tejido sinovial del marcador autofágico beclin-1, clave en las fases tempranas del proceso implicado en la formación del autofagosoma. Para ello, se utilizó el anticuerpo anti-beclin-1 y se valoró la señal positiva obtenida mediante tinción inmunohistoquímica. De nuevo, tal y como se refleja en la **Figura 24A** y **24B**, la señal positiva observada en la sinovial de los animales pertenecientes al grupo AIA fue significativamente mayor ( $p \leq 0,001$ ) que la encontrada en el grupo control, localizándose principalmente en la zona del infiltrado celular. Asimismo, la expresión de beclin-1 en la membrana sinovial de los animales tratados con resveratrol mostró una reducción muy llamativa ( $p \leq 0,001$ ) cuando se comparó con las muestras AIA, reduciendo su localización en la capa íntima. Este

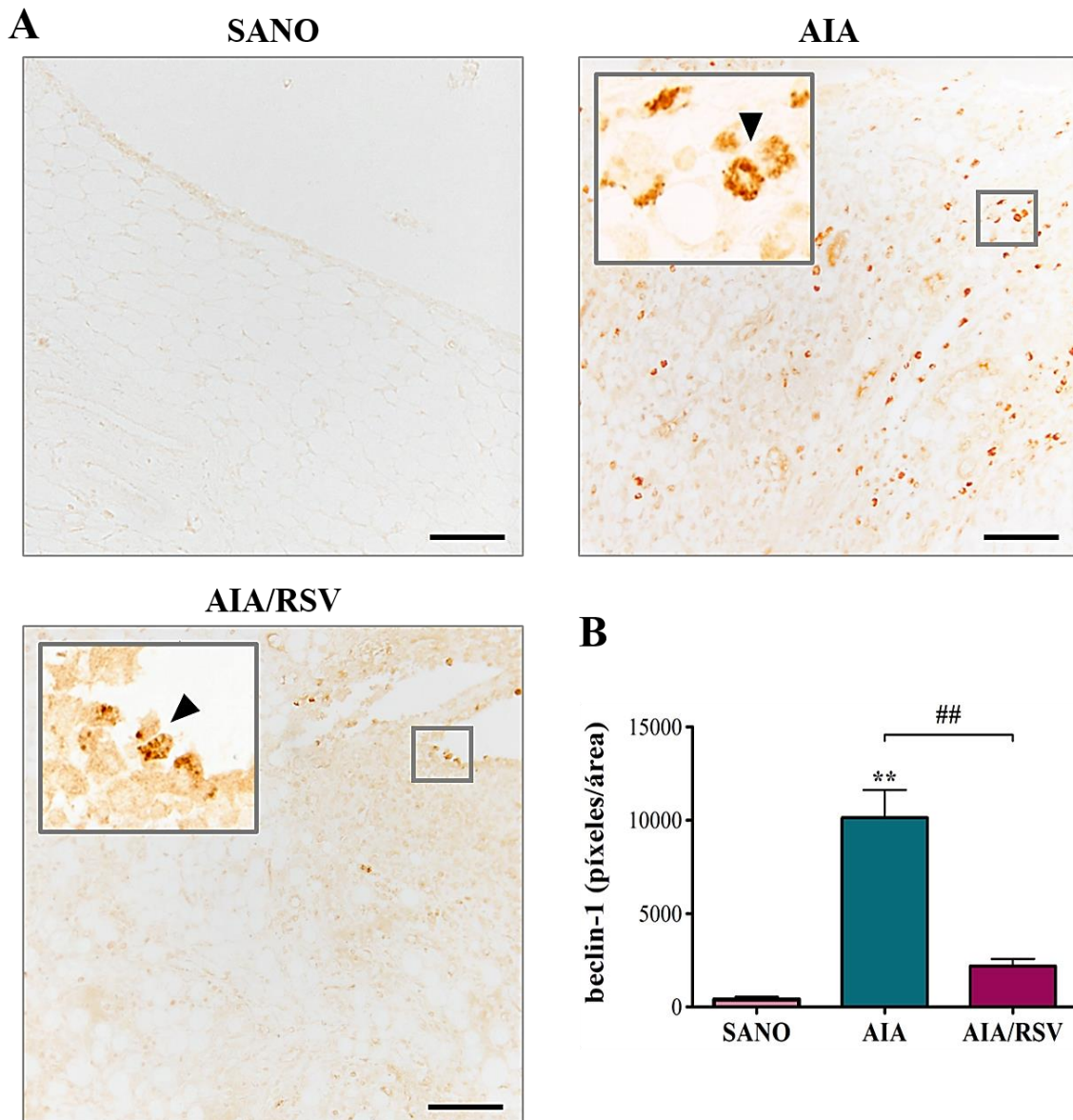


resultado sugiere que el resveratrol actuaría promoviendo la vía no canónica de la autofagia (independiente de beclin-1) en el tejido sinovial de un modelo de AIA.



**Figura 23. El resveratrol es capaz de reducir la expresión de p62 en un modelo de artritis inducida por antígeno.** Tinción inmunohistoquímica de las secciones de rodilla en los diferentes grupos de estudio para el marcador p62. **(A)** Imágenes representativas de la señal positiva obtenida en el tejido sinovial de los animales pertenecientes a los grupos SANO, AIA y AIA/RSV. Las imágenes originales se muestran a una magnificación de 10x; los detalles que aparecen delimitados se muestran a una magnificación de 40x y se corresponden con una zona representativa de la imagen original a 10x. Barra de escala equivalente a 100  $\mu$ m. **(B)** El análisis cuantitativo de la señal positiva obtenida en totalidad de la membrana sinovial demostró que la expresión de p62 fue mayor en el grupo AIA que en el grupo formado por animales sanos, mientras que el tratamiento con resveratrol provocó una disminución significativa de la señal positiva. Los datos se representan como la media  $\pm$  SEM (n=6); \*\*  $p \leq 0,001$  frente a SANO y ##  $p \leq 0,005$  frente a AIA.

## RESULTADOS



**Figura 24. El resveratrol no induce la activación de la vía canónica de la autofagia, dependiente de beclin-1, en un modelo de AIA.** Se realizó una tinción inmunohistoquímica para el marcador beclin-1 en las secciones de rodilla de los animales pertenecientes a los grupos SANO, AIA y AIA/RSV. (A) Señal positiva obtenida en el tejido sinovial de los animales pertenecientes a cada uno de los grupos de estudio. Las imágenes originales se muestran a una magnificación de 10x; los detalles que aparecen delimitados se muestran a una magnificación de 40x y se corresponden con una zona representativa de la imagen original a 10x. Barra de escala equivalente a 100  $\mu$ m. Cabeza de flecha ( $\blacktriangledown$ ): vesículas autofágicas. (B) El análisis cuantitativo de la señal positiva obtenida en la totalidad de la membrana sinovial demostró que la expresión de beclin-1 fue significativamente mayor en los animales AIA, que en aquellos que recibieron una administración diaria de resveratrol, los cuales mostraron una señal positiva muy reducida, comparable a la observada en el grupo de controles sanos. Los datos se representan como la media  $\pm$  SEM (n=6); \*\*  $p \leq 0,001$  frente a SANO y ##  $p \leq 0,001$  frente a AIA.

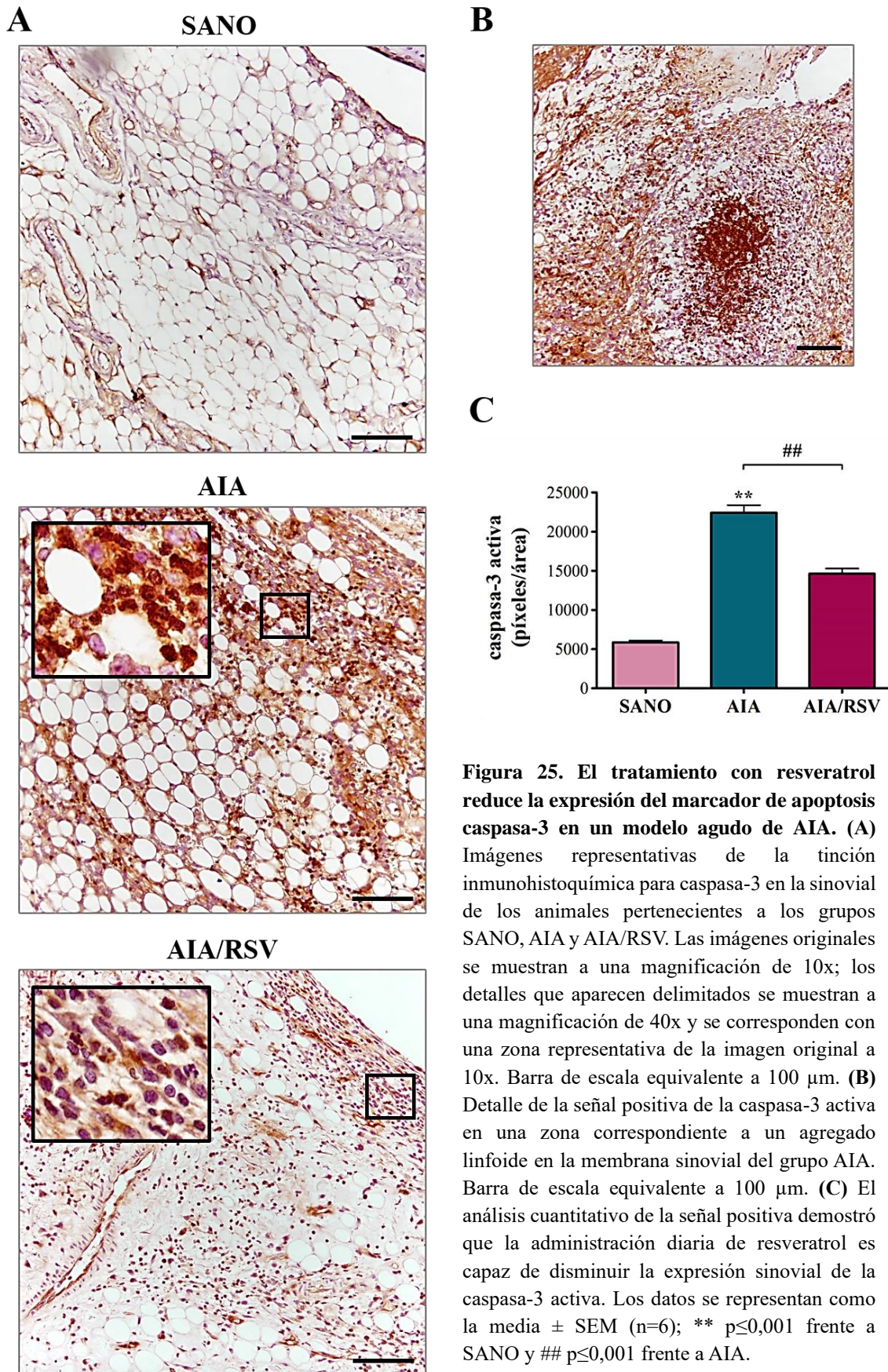
### **1.2.2. Efecto del resveratrol sobre la activación de mecanismos de muerte celular mediada por apoptosis.**

Una vez determinado cual es el papel del resveratrol en el proceso autofágico que tiene lugar en el tejido sinovial de un modelo agudo de AIA, a continuación, buscamos precisar su efecto sobre los mecanismos de la muerte celular por apoptosis, evaluando la expresión de caspasa-3 activa y su sustrato, la poli ADP-ribosa polimerasa (PARP).

#### **1.2.2.1. El tratamiento con resveratrol limita la ejecución de la apoptosis mediada por la caspasa-3 activa.**

Se determinó la expresión de la caspasa-3 activa, proteína efectora clave en el proceso de muerte celular por apoptosis, ya que interactúa con otras moléculas, hidrolizándolas, y desencadenando, finalmente, la ejecución de la muerte celular por apoptosis. Para ello, se llevó a cabo una técnica inmunohistoquímica, empleando el anticuerpo anti-caspasa-3 activa, en las sinoviales de las articulaciones de rodilla de todos los animales objeto de estudio. La **Figura 25A** muestra como el tejido sinovial de los animales AIA presenta la señal positiva más elevada de caspasa-3, si se compara con la observada en el grupo formado por animales sanos y por animales tratados con resveratrol. Esta señal se localizó principalmente en las células del infiltrado celular, tal y como se muestra en la **Figura 25B**, y en el área próxima a la capa íntima. En el grupo AIA, al que se le administró de forma profiláctica el resveratrol, la expresión sinovial de la caspasa-3 activa se mostró reducida de forma significativa ( $p \leq 0,001$ ) en comparación con las muestras AIA y, a pesar de mostrar una expresión baja, se mantuvo por encima de la observada en el grupo SANO.

## RESULTADOS



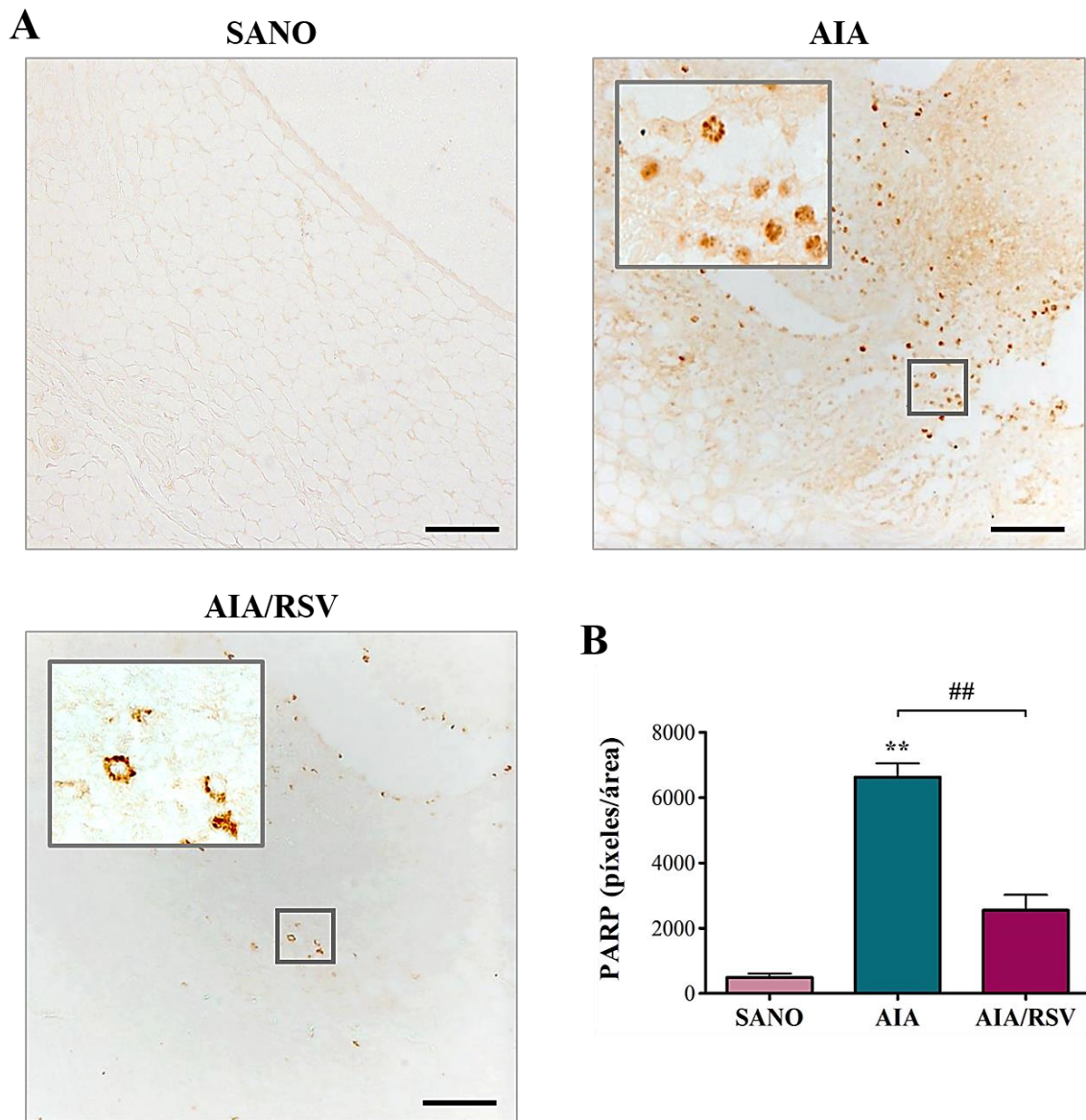
**Figura 25.** El tratamiento con resveratrol reduce la expresión del marcador de apoptosis caspasa-3 en un modelo agudo de AIA.

(A) Imágenes representativas de la tinción inmunohistoquímica para caspasa-3 en la sinovial de los animales pertenecientes a los grupos SANO, AIA y AIA/RSV. Las imágenes originales se muestran a una magnificación de 10x; los detalles que aparecen delimitados se muestran a una magnificación de 40x y se corresponden con una zona representativa de la imagen original a 10x. Barra de escala equivalente a 100  $\mu$ m. (B) Detalle de la señal positiva de la caspasa-3 activa en una zona correspondiente a un agregado linfóide en la membrana sinovial del grupo AIA. Barra de escala equivalente a 100  $\mu$ m. (C) El análisis cuantitativo de la señal positiva demostró que la administración diaria de resveratrol es capaz de disminuir la expresión sinovial de la caspasa-3 activa. Los datos se representan como la media  $\pm$  SEM (n=6); \*\*  $p \leq 0,001$  frente a SANO y ##  $p \leq 0,001$  frente a AIA.

### 1.2.2.2. El empleo de resveratrol limita la expresión del sustrato apoptótico PARP.

Tras observar que el resveratrol ejerce un papel antiapoptótico, reduciendo la expresión proteica local de la forma activa de la caspasa-3, buscamos confirmar este resultado estudiando la expresión de su sustrato, la polimerasa PARP, clave en el proceso de fragmentación del ADN que concluye con la muerte de la célula por apoptosis. Para ello, se realizó una tinción inmunohistoquímica empleando un anticuerpo específico para la forma escindida de PARP, en las secciones de rodilla de las articulaciones de todos los animales de estudio que fueron embebidas en parafina. En la **Figura 26A** se puede observar cómo, nuevamente, las muestras del grupo AIA presentan señal positiva más elevada que la obtenida en las muestras pertenecientes a los grupos SANO y AIA/RSV; esta señal se localizó principalmente en células del infiltrado celular y la zona de revestimiento. De acuerdo con los resultados obtenidos para la forma activa de caspasa-3, el tratamiento diario con resveratrol disminuyó de forma significativa la expresión de PARP en la sinovial ( $p \leq 0,001$ ), tal y como se indica en la **Figura 26B**. Por tanto, en base a estos resultados, la administración oral de resveratrol podría tener la capacidad de modular negativamente la apoptosis, pero regular de forma positiva la autofagia en la membrana sinovial de un modelo animal de AIA; lo que sugiere que el resveratrol puede reducir la hiperplasia sinovial incrementando el flujo autofágico.

## RESULTADOS



**Figura 26. La expresión del marcador de muerte celular apoptótica, PARP, se reduce por el uso de resveratrol en un modelo de AIA.** Se evaluó mediante tinción inmunohistoquímica la expresión de PARP en las secciones de rodilla embebidas en parafina de los animales pertenecientes a los grupos SANO, AIA y AIA/RSV. **(A)** Imágenes representativas de la señal positiva obtenida en el tejido sinovial de los animales pertenecientes a cada uno de los grupos de estudio. Las imágenes originales se muestran a una magnificación de 10x; los detalles que aparecen delimitados se muestran a una magnificación de 40x y se corresponden con una zona representativa de la imagen original a 10x. Barra de escala equivalente a 100  $\mu$ m. **(B)** El análisis cuantitativo de la señal positiva obtenida en la totalidad de la membrana sinovial demostró que la expresión de PARP fue significativamente mayor en el grupo AIA, que en el grupo de animales al que se le administró una dosis diaria de resveratrol, donde se observó una señal positiva muy reducida. Los datos se representan como la media  $\pm$  SEM (n=5-6); \*\*  $p \leq 0,005$  frente a SANO y ##  $p \leq 0,001$  frente a AIA.

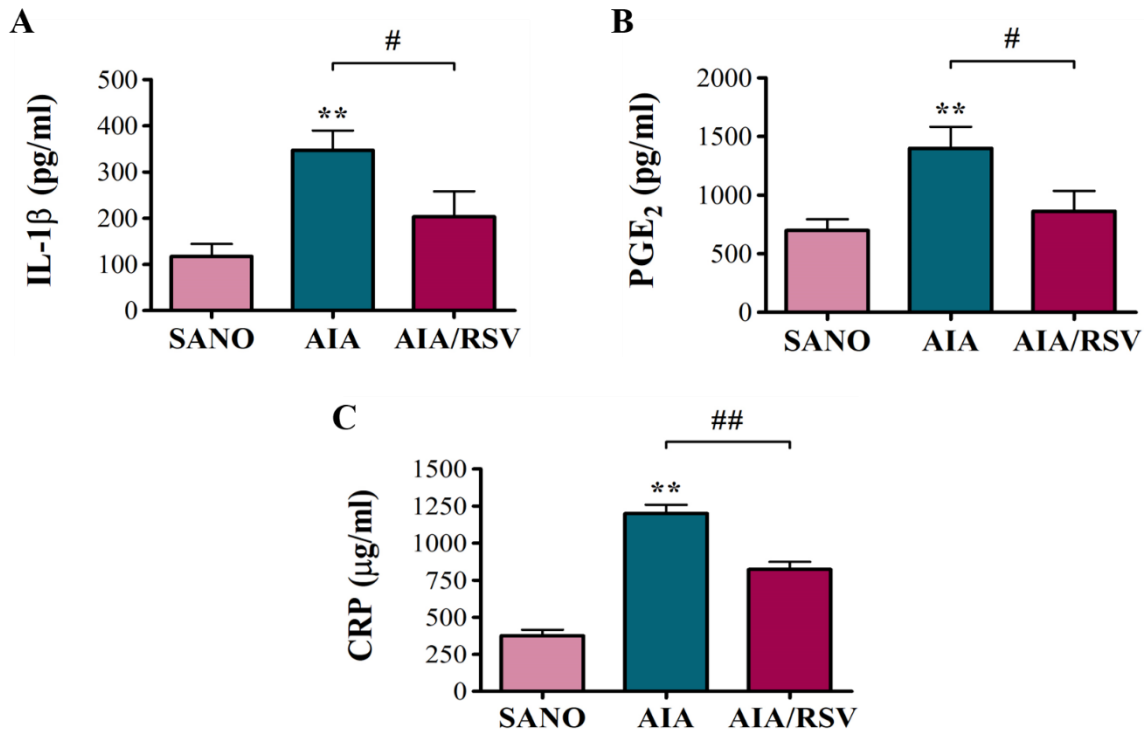
### 1.3. EFECTO PREVENTIVO DEL RESVERATROL SOBRE LA INFLAMACIÓN DURANTE EL DESARROLLO DE AIA Y SU CORRELACIÓN CON LA EXPRESIÓN SINOVIAL DE p62.

La AR es una enfermedad típicamente inflamatoria, por este motivo, quisimos evaluar el efecto preventivo del RSV sobre diversos marcadores implicados en el proceso inflamatorio originado durante el desarrollo de un modelo agudo de AIA. Para ello, evaluamos diversos mediadores a nivel sistémico como son la interleuquina (IL)-1 $\beta$ , la prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) y la proteína C reactiva (CRP; del inglés: *C Reactive Protein*); asimismo, se evaluó la expresión a nivel local del factor de transcripción NF-kB (del inglés: *Nuclear Factor kB*).

#### 1.3.1. Marcadores clínicos de inflamación sistémica: IL-1 $\beta$ , PGE<sub>2</sub>, y CRP.

La citoquina IL-1 $\beta$  es considerada una de las citoquinas maestras en el desencadenamiento y progresión del proceso inflamatorio de la AR, por ello, nos propusimos evaluar el efecto del RSV sobre los niveles séricos de IL-1 $\beta$ . Como se muestra en la **Figura 27A**, la concentración de IL-1 $\beta$  aumentó en el suero de los animales del grupo AIA en relación con el grupo de animales sanos ( $p \leq 0,005$ ), mientras que los niveles obtenidos en el grupo que recibió la administración oral de resveratrol disminuyeron de forma significativa ( $p \leq 0,05$ ). Asimismo, se evaluaron los niveles en suero de PGE<sub>2</sub> y CRP, dos mediadores inflamatorios también claves en diferentes formas de artritis inflamatoria, con gran relevancia clínica. Tal y como se observa en la **Figura 27B** y **27C**, el perfil de estos dos mediadores es similar al obtenido con IL-1 $\beta$  ya que, de nuevo, el tratamiento preventivo con resveratrol es capaz de reducir significativamente la concentración de PGE<sub>2</sub> y CRP en suero ( $p \leq 0,05$  y  $p \leq 0,005$ , respectivamente), si se compara con los elevados niveles obtenidos en las muestras procedentes de los animales del grupo AIA.

## RESULTADOS

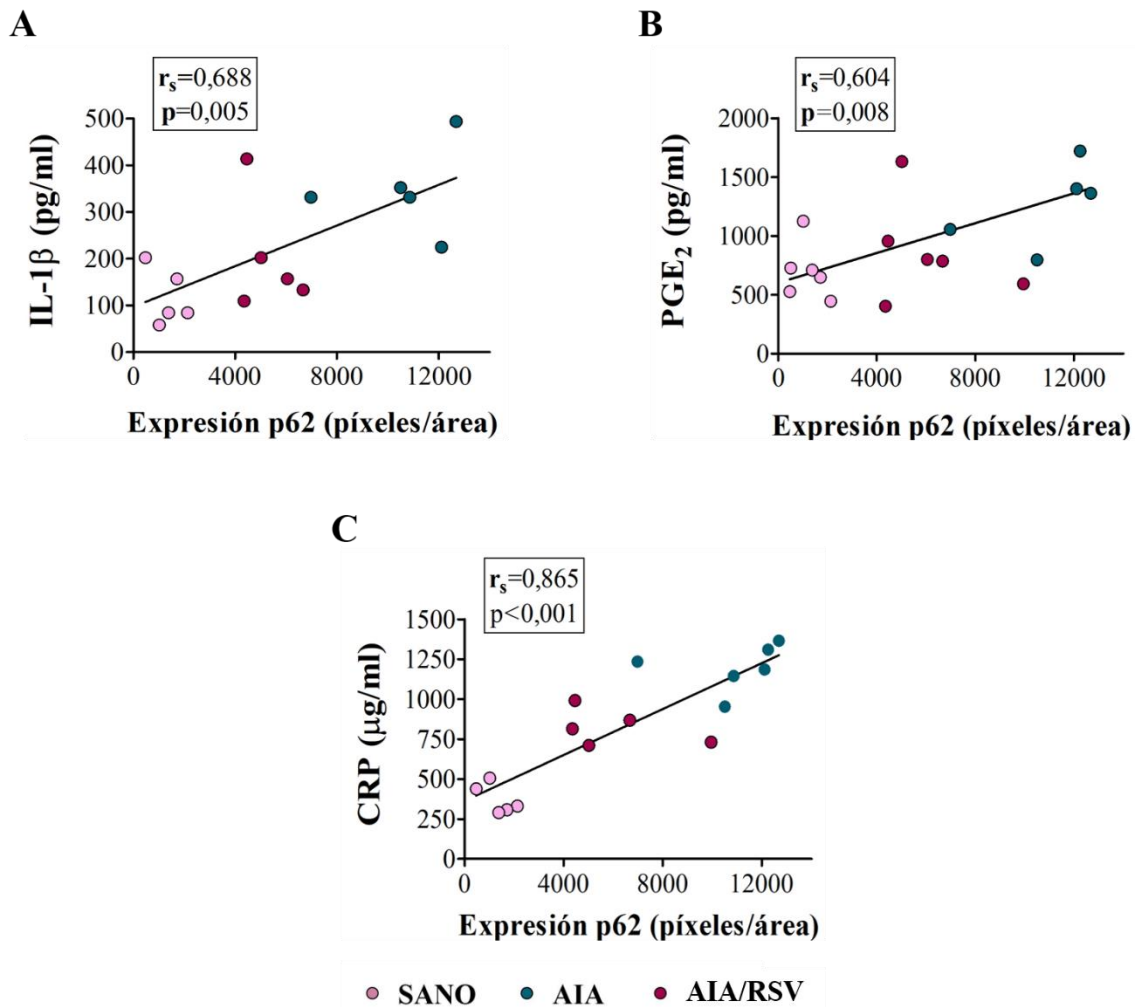


**Figura 27. Efecto preventivo del resveratrol en la respuesta inflamatoria sistémica en muestras de un modelo de AIA.** Se valoraron los niveles séricos de (A) IL-1 $\beta$  (ensayo multiplex), (B) PGE<sub>2</sub> (ELISA) y (C) CRP (ELISA) en las muestras recogida el día 2 tras la inducción de la AIA. Las gráficas muestran como los animales tratados con resveratrol presentan una concentración sérica de IL-1 $\beta$ , PGE<sub>2</sub> y CRP significativamente menor que la obtenida en los animales pertenecientes al grupo AIA. Los datos se representan como la media  $\pm$  SEM (n=5-6); \*\* p<0,005 frente a SANO, # p<0,05 frente a AIA y ## p<0,005 frente a AIA.

### 1.3.2. Correlación entre los niveles sistémicos de IL-1 $\beta$ , PGE<sub>2</sub> y CRP y la expresión proteica de p62 en la membrana sinovial.

Dado que la autofagia podría regular la expresión de la citoquina proinflamatoria IL-1 $\beta$  a través de la vía inflammasoma y ésta a su vez, puede inducir el incremento de los niveles de PGE<sub>2</sub> y CRP, una vez se determinó la concentración en suero de este marcador, así como de PGE<sub>2</sub> y CRP, el siguiente paso fue analizar si estos marcadores se encuentran correlacionados con la autofagia a través de la expresión sinovial de p62. Como se observa en la **Figura 28**, la expresión media de p62 mostró una fuerte correlación positiva con cada uno de los marcadores de inflamación sistémica evaluados en este estudio, (A) IL-1 $\beta$  (p=0,005 y  $r_s=0,688$ ), (B) PGE<sub>2</sub> (p=0,008 y  $r_s=0,604$ ) y (C) CRP (p<0,001 y  $r_s=0,865$ ).





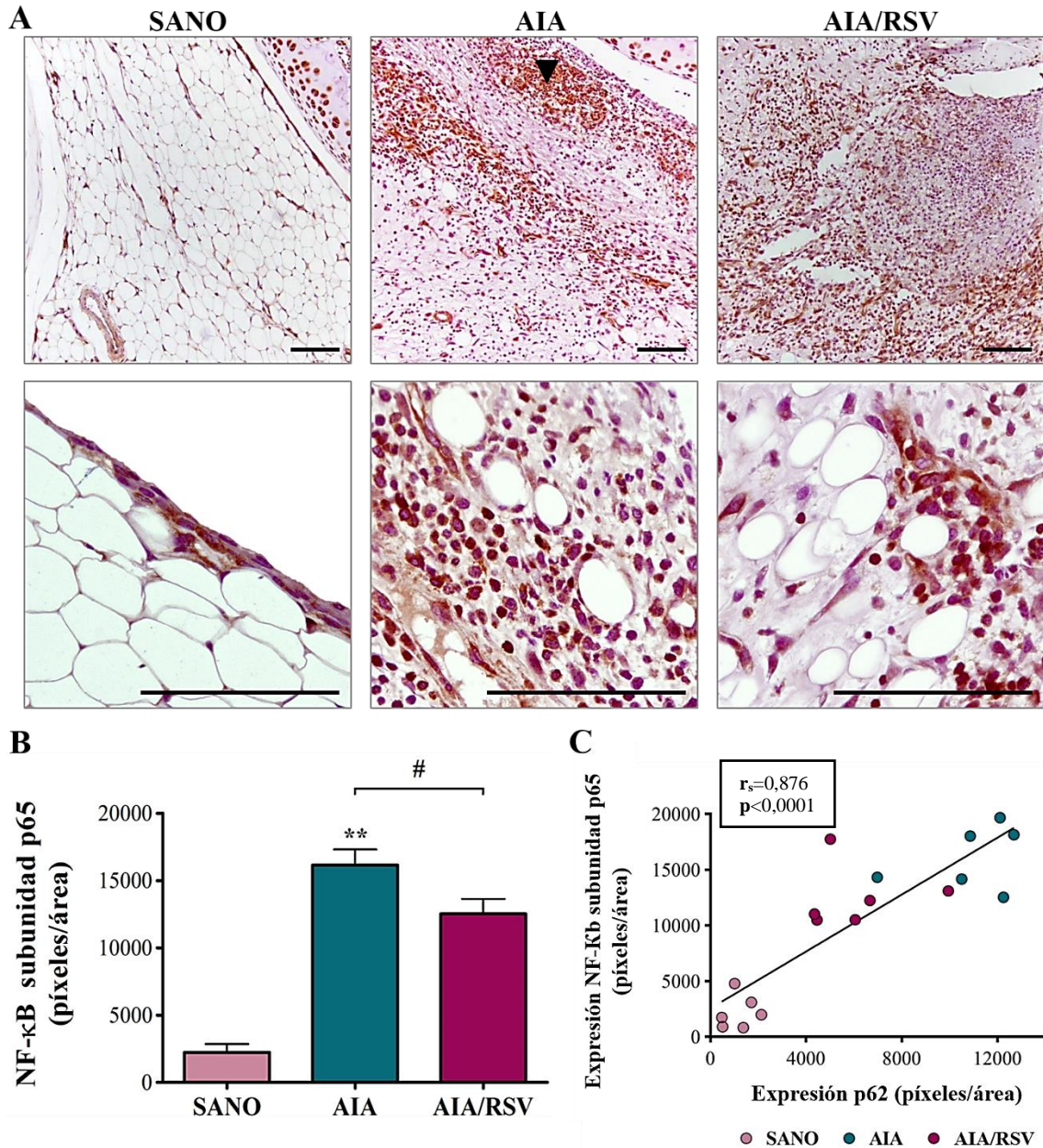
**Figura 28. Correlación entre marcadores de inflamación sistémica y la expresión sinovial de p62 en muestras de un modelo AIA.** Correlación entre los niveles de expresión media del marcador autofágico p62 (píxeles/área) y la concentración sérica de los mediadores inflamatorios (A) IL-1 $\beta$ , (B) PGE $_2$  y (C) CRP. La correlación de p62 con los mediadores inflamatorios fue en todos los casos significativa y con tendencia positiva. Se indica el coeficiente de correlación de Spearman ( $r_s$ ) y el p-valor ( $p$ ) obtenido para cada uno de los análisis de correlación.

### 1.3.3. Expresión y localización del factor de transcripción NF-kB y su correlación con la expresión sinovial de p62.

Puesto que el factor de transcripción NF-kB contribuye en gran medida a la perpetuación del proceso inflamatorio, pero también a la proliferación sinovial, a la angiogénesis y, en consecuencia, a la formación del *pannus*, también valoramos la influencia del resveratrol sobre la expresión local del factor NF-kB en la membrana sinovial. Por ello, se realizó una tinción inmunohistoquímica en las articulaciones de rodilla embebidas en parafina de todos los animales de los grupos de estudio, empleando el anticuerpo anti-NF-kB subunidad p65 (**Figura 29A**). Los resultados mostraron una mayor expresión de p65 en el tejido sinovial de los animales AIA, localizada

## RESULTADOS

principalmente en el infiltrado celular y en células próximas a la capa íntima, en comparación con la expresión basal obtenida en las muestras procedentes de los animales sanos ( $p \leq 0,001$ ). Por el contrario, el tratamiento oral que recibieron los animales del grupo AIA/RSV disminuyó de manera significativa la expresión de p65 ( $p \leq 0,05$ ) (**Figura 29B**), pero mantiene una señal positiva mayor en relación al grupo SANO, observándose dispersa y homogénea a lo largo del tejido sinovial. Finalmente, cuando se evaluó la correlación entre la expresión de la subunidad p65 y p62 en la sinovial, se observó una fuerte correlación positiva ( $p < 0,0001$ ) alcanzando un coeficiente de correlación de 0,876 (**Figura 29C**). De esta forma, la administración oral de resveratrol puede ayudar a regular la inflamación local en la membrana sinovial de un modelo de AIA mediante la mejora del flujo autofágico y la limitación de la vía de señalización NF- $\kappa$ B.



**Figura 29. El uso de resveratrol reduce la expresión sinovial del factor de transcripción NF-κB en un modelo agudo de AIA.** (A) Imágenes representativas de la tinción inmunohistoquímica para la subunidad p65 del factor de transcripción NF-κB en cada uno de los grupos de estudio, mostradas a una magnificación de 10x (paneles superiores) y 40x (paneles inferiores). Barra de escala equivalente a 100 μm. Cabeza de flecha (▼): zona de infiltrado celular. (B) El análisis cuantitativo de la señal positiva en la totalidad de la membrana sinovial demostró que la expresión de NF-κB fue mayor en el tejido sinovial de los animales AIA que el los animales sanos, pero fue reducida en la sinovial de aquellos animales tratados con resveratrol. Los datos se representan como la media ± SEM (n=6); \*\* p≤0,001 frente a SANO y p≤0,05 frente a AIA. (C) Análisis de correlación entre la expresión sinovial de p62 y la subunidad p65 del factor NF-κB. Ambos marcadores muestran una correlación fuerte y positiva entre sí. Se indica el coeficiente de correlación de Spearman ( $r_s$ ) y el p-valor (p) obtenido en el análisis.

## RESULTADOS

### 1.4. EFECTO ANTIANGIOGÉNICO DEL RESVERATROL EN LA MEMBRANA SINOVIAL DE UN MODELO EXPERIMENTAL DE ARTRITIS.

La angiogénesis juega un papel fundamental en la artritis inflamatoria, ya que es necesaria para el desarrollo del tejido sinovial proliferativo. Un estudio reciente de nuestro equipo reveló que el resveratrol es capaz de reducir la concentración sérica de CINC-1, homólogo murino de la quimiocina IL-8 humana que juega un papel central en la angiogénesis de la AR (156). Para ayudar a desentrañar si el resveratrol también podría modular el desarrollo del *pannus* reumatoide a través de la expresión de otros factores proangiogénicos clave, evaluamos la expresión de del factor de crecimiento vasoendotelial (VEGF; del inglés: *Vascular Endothelial Growth Factor*) y angiopoyetina-1 (Ang-1) en el tejido sinovial.

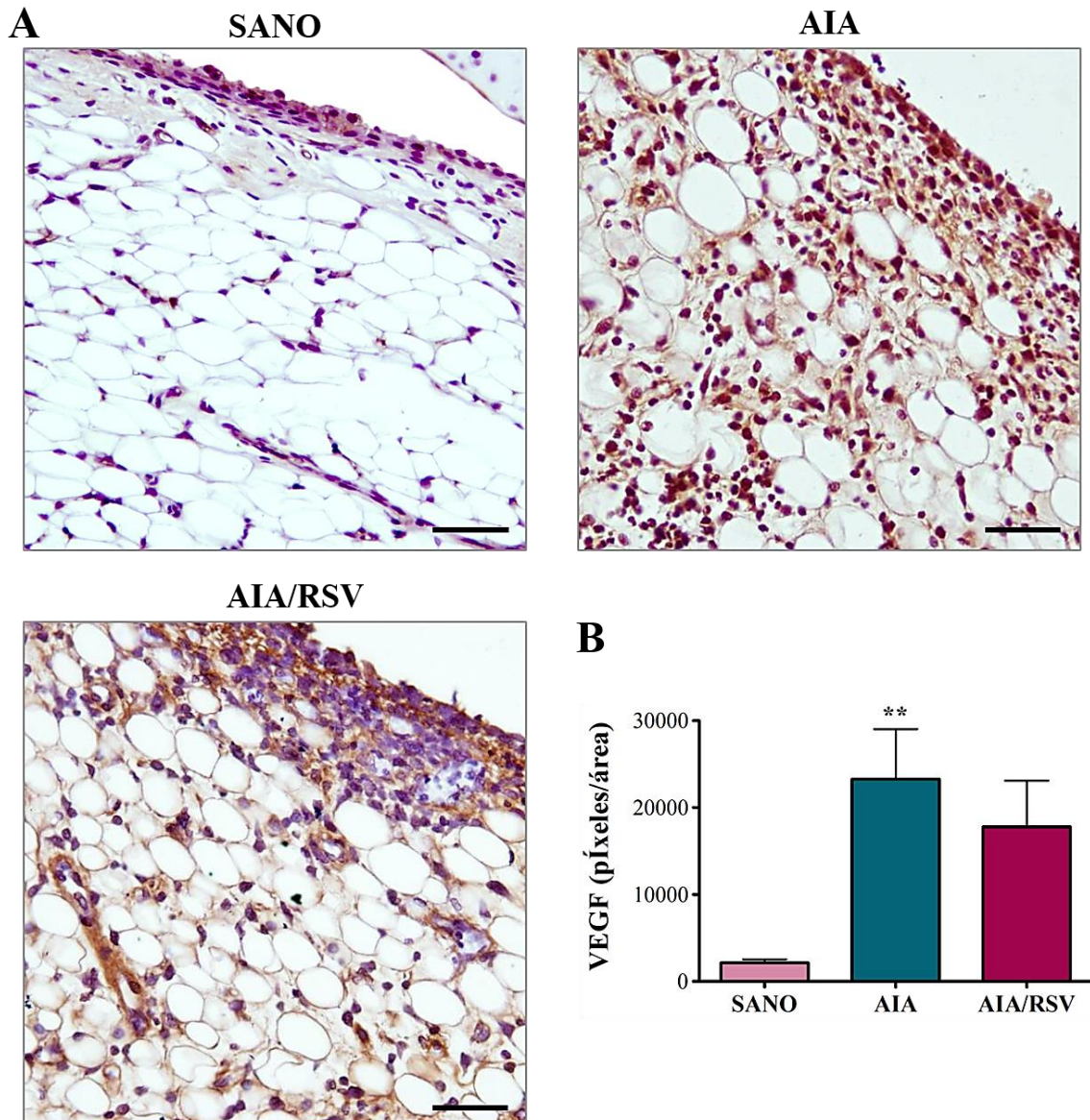
#### 1.4.1. Efecto del resveratrol sobre la formación de nuevos vasos. Expresión y localización de VEGF.

Se evaluó el efecto del resveratrol sobre la angiogénesis y, más concretamente, sobre la neovascularización. Para ello, se midió la expresión sinovial del marcador VEGF, promotor clave de la formación de nuevos vasos sanguíneos que aportan el oxígeno necesario a las células dentro del escenario hipóxico que se establece en la sinovial AR. Se llevó a cabo una tinción inmunohistoquímica en la que se empleó un anticuerpo anti-VEGF y se cuantificó la señal positiva obtenida en la membrana sinovial. Los resultados mostraron que las muestras sanas presentaron una expresión prácticamente nula de VEGF, cuya localización quedó limitada a las células de la capa íntima (**Figura 30**). Por el contrario, el grupo AIA mostró una expresión muy elevada de este marcador ( $p \leq 0,001$ ), distribuida homogéneamente por todo el tejido que, a pesar de no alcanzar una diferencia estadísticamente significativa, mostró una ligera tendencia a la reducción en el grupo AIA/RSV en comparación a la observada en el grupo que no recibió tratamiento (**Figura 30**).

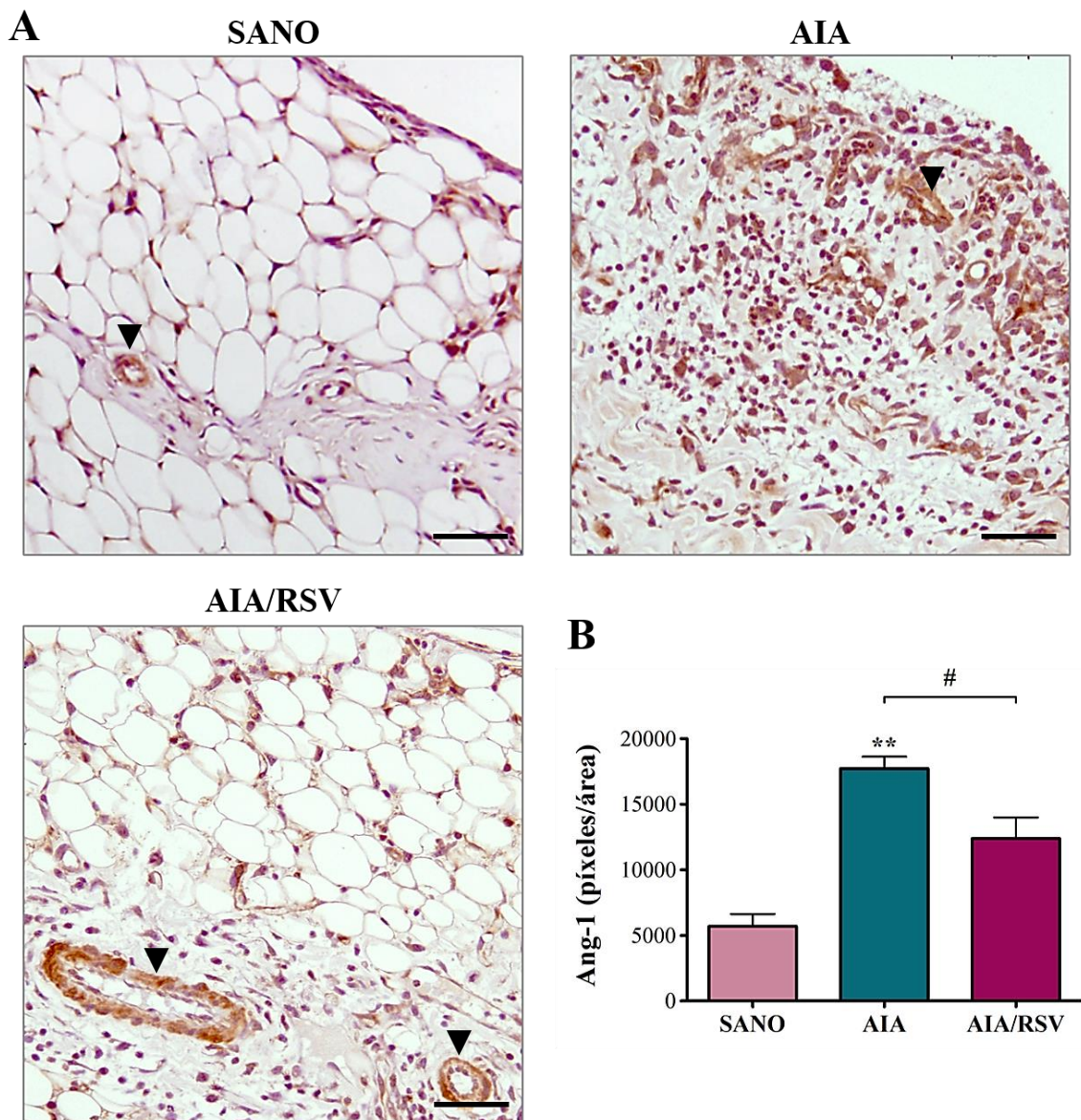
**1.4.2. Efecto del resveratrol sobre la maduración de los vasos sanguíneos. Expresión y localización de angiopoyetina 1.**

Tras indagar acerca del efecto del resveratrol en la neovascularización, nos propusimos evaluar su capacidad para modular la maduración de los vasos sanguíneos presentes en la sinovial a través de la expresión de otro marcador angiogénico clave, la Ang-1. Para ello, se empleó un anticuerpo anti-Ang-1 y, se valoró la señal positiva obtenida mediante tinción inmunohistoquímica en la membrana sinovial de las articulaciones de rodilla embebidas en parafina de todos los animales de estudio. Como se muestra en la **Figura 31A** y **31B**, las muestras procedentes de animales sanos mostraron una expresión basal reducida de Ang-1, que se localizó fundamentalmente en las células de los vasos sanguíneos. Como se podría esperar, la expresión de este marcador se incrementó significativamente ( $p \leq 0,001$ ) en las muestras correspondientes al grupo AIA, distribuyéndose de forma uniforme a lo largo de todo el tejido sinovial y vasos sanguíneos; mientras que su expresión se redujo significativamente ( $p \leq 0,05$ ) después de recibir el tratamiento con resveratrol, observándose una localización muy limitada a las células de los vasos sanguíneos. Estos resultados parecen indicar que el resveratrol también podría contribuir a controlar la hiperplasia sinovial disminuyendo la formación y maduración de nuevos vasos sanguíneos en el tejido sinovial AIA.

## RESULTADOS



**Figura 30. Efecto del resveratrol sobre la neovascularización en el tejido sinovial de un modelo agudo de AIA.** (A) Imágenes representativas de la señal positiva obtenida para VEGF mediante tinción inmunohistoquímica en el tejido sinovial de los animales pertenecientes a los grupos SANO, AIA y AIA/RSV. Las imágenes se muestran a una magnificación de 20x. Barra de escala equivalente a 100  $\mu$ m. (B) El análisis cuantitativo de la señal positiva demostró que la expresión de VEGF fue mayor en la membrana sinovial de los animales del grupo AIA que en los animales pertenecientes al grupo SANO; por su parte, el grupo al que se le administró oralmente resveratrol mostró una pequeña reducción en la expresión de VEGF; si bien, no alcanzó un resultado significativo. Los datos se representan como la media  $\pm$  SEM (n=6); \*\*  $p < 0,001$  frente a SANO.



**Figura 31. El resveratrol impide la maduración de nuevos vasos sanguíneos en el tejido sinovial de un modelo agudo de AIA.** (A) Imágenes representativas de la señal positiva obtenida mediante tinción inmunohistoquímica para el marcador de angiogénesis Ang-1, en el tejido sinovial de todos los grupos de estudio. Las imágenes se muestran a una magnificación de 20x. Barra de escala equivalente a 100  $\mu$ m. Cabeza de flecha ( $\blacktriangledown$ ): expresión de Ang-1 localizada en los vasos sanguíneos. (B) El análisis cuantitativo de la señal positiva demostró que la expresión de Ang-1 sufrió una disminución significativa en el grupo AIA/RSV, en comparación con el grupo AIA, que no recibió ningún tratamiento y mostró la expresión más elevada para este marcador. Los datos se representan como la media  $\pm$  SEM (n=6); \*\*  $p \leq 0,001$  frente a SANO y #  $p \leq 0,05$  frente a AIA.

## RESULTADOS

### 1.5. ESTUDIO *IN VIVO* DEL EFECTO DE UNA DIETA ANTIOXIDANTE CON RESVERATROL EN ANIMALES SANOS.

Para poder ampliar nuestro conocimiento acerca del posible efecto profiláctico del resveratrol, incluimos en este trabajo un cuarto grupo de animales a los que se les administró este compuesto a la misma dosis que en el grupo AIA/RSV (12,5 mg/kg hasta el día de su sacrificio), siguiendo el mismo protocolo de administración. Pero a diferencia de este último, a los animales pertenecientes al grupo denominado SANO/RSV no se les indujo la artritis, ya que en lugar de realizar una inyección intraarticular del antígeno 14 días después de su inmunización, se les inyectó el mismo volumen de suero salino.

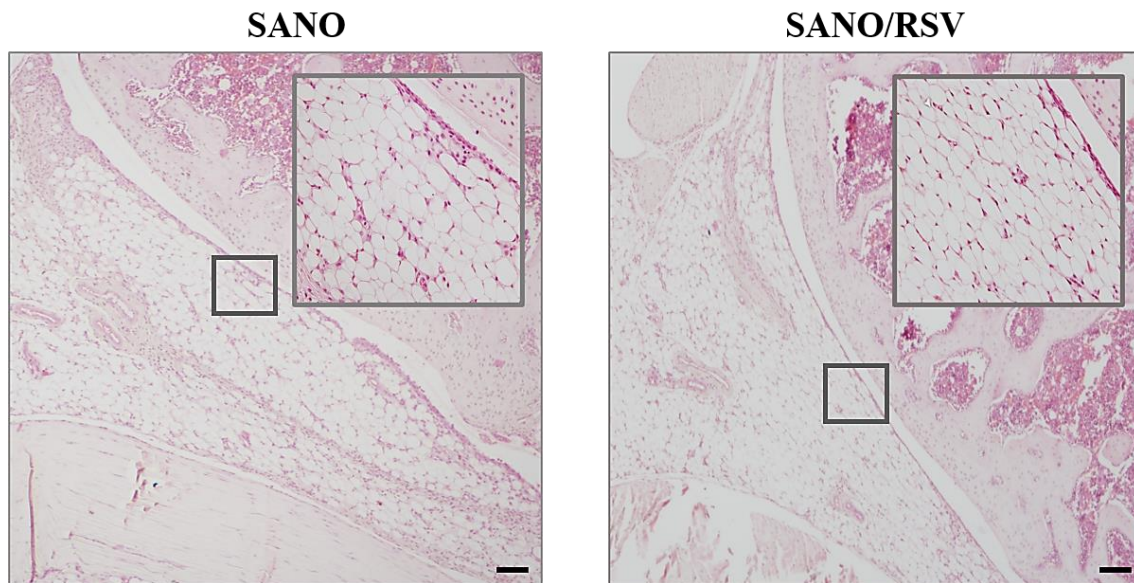
Al igual que en los grupos SANO, AIA y AIA/RSV, para evaluar el efecto antiproliferativo y antiinflamatorio del resveratrol se procedió a evaluar en el tejido sinovial y en los sueros del grupo SANO/RSV los distintos marcadores de muerte celular programada y de inflamación local y sistémica que se reflejan a lo largo de los apartados anteriores. Finalmente, se decidió no mostrar los resultados obtenidos en el grupo SANO/RSV junto con el resto de grupos de estudio para evitar añadir más complejidad a los resultados mostrados y centrarnos en el objetivo principal de este estudio: evaluar si el resveratrol puede modular la proliferación desmedida que caracteriza la sinovial artrítica y en consecuencia la respuesta inflamatoria asociada.

#### 1.5.1. Efecto del resveratrol en la estructura sinovial de animales sanos.

Para evaluar si la administración oral de resveratrol en los animales sanos pertenecientes al grupo SANO/RSV produce cambios en la estructura de la membrana sinovial, se practicó la tinción H-E en cortes de las articulaciones embebidas previamente en parafina y se procedió a su análisis histológico. Tal y como se puede observar en la **Figura 32**, una dosis diaria de resveratrol no alteró la estructura que presenta habitualmente una sinovial normal. De esta forma, al comparar la membrana sinovial de los animales pertenecientes al grupo SANO/RSV con aquellos integrados en el grupo SANO, se observó un nivel de organización celular similar, sin alteraciones evidentes en ninguna de las capas que conforman la sinovial. Tal y como se describió en el apartado 1.1 para las muestras del grupo SANO, nuevamente, las muestras del grupo SANO/RSV presentaron dos capas contiguas totalmente definidas; una capa de revestimiento formada por una o dos filas de células sinoviales y una capa subíntima integrada fundamentalmente



por adipocitos y con la escasa presencia tanto de células residentes como de aquellas correspondientes al infiltrado inflamatorio.

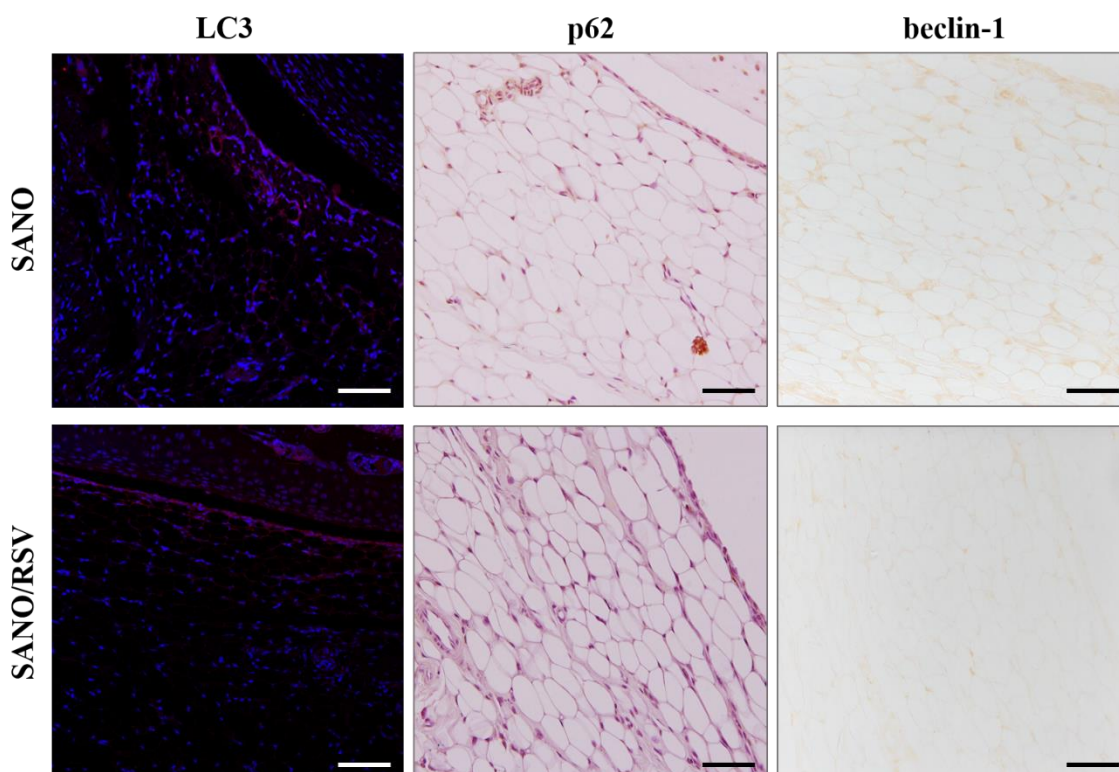


**Figura 32. Evaluación microscópica de la membrana sinovial de animales sanos tratados con resveratrol.** Imágenes representativas de la membrana sinovial de los grupos SANO y RSV. Las imágenes originales se muestran a una magnificación de 4x; los detalles que aparecen delimitados se muestran a una magnificación de 20x y se corresponden con una zona representativa de la imagen original a 4x. Barra de escala equivalente a 100  $\mu$ m. En ambos grupos se observó la estructura típica de una sinovial sana. El tratamiento con RSV no desencadenó ningún cambio en la organización celular del tejido sinovial en animales sanos.

### **1.5.2. Evaluación del proceso autofágico en animales sanos tratados con resveratrol.**

El siguiente bloque de resultados muestra, en concordancia con los resultados obtenidos en el grupo AIA/RSV, como el resveratrol en los individuos sanos es capaz de estimular la vía autofágica independiente de beclin-1, ya que induce un aumento en la señal de LC3 y una disminución en la señal de su sustrato autofágico p62, cuando se compara con la señal positiva obtenida en el grupo control, tal y como se ha demostrado anteriormente. De esta forma, los valores estadísticos obtenidos fueron  $p \leq 0,001$  y  $p \leq 0,05$  para LC3 y p62, respectivamente. En el caso del marcador beclin-1, el resveratrol no solo no produjo un aumento de su expresión en el tejido sinovial de los animales sanos, sino que fue capaz de reducirla ( $p \leq 0,01$ ), sugiriendo nuevamente, que el resveratrol no induce la vía canónica de la autofagia (**Figura 33**).

## RESULTADOS

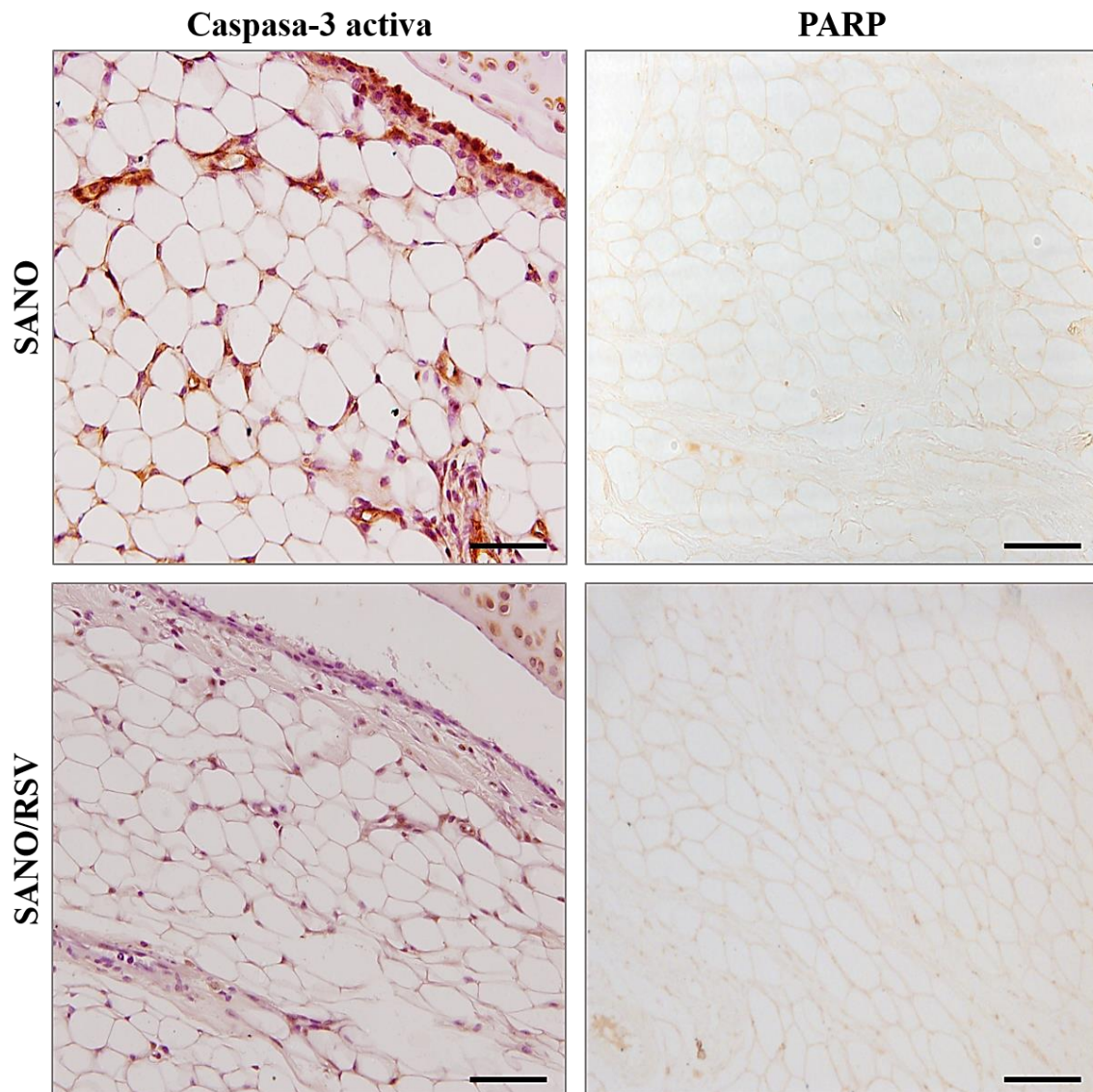


**Figura 33. Efecto del resveratrol sobre la expresión sinovial de los marcadores autofágicos LC3, p62 y beclin-1 en animales sanos.** En la figura se muestran los tres marcadores autofágicos evaluados en este estudio en el tejido sinovial de las secciones de rodilla de los grupos SANO (paneles superiores) y SANO/RSV (paneles inferiores). Las imágenes son representativas de la señal positiva obtenida mediante inmunofluorescencia para el marcador autofágico LC3 y mediante inmunohistoquímica para el sustrato autofágico p62 y el marcador temprano de autofagia beclin-1. LC3 se asoció a un anticuerpo secundario Alexa Fluor 568 (rojo) y los núcleos se contratiñeron con DAPI (azul). El análisis estadístico confirma los resultados obtenidos en aquellos animales tratados con resveratrol a los que se les indujo la artritis experimental; de esta forma, los resultados estadísticos obtenidos fueron  $p \leq 0,001$ ,  $p \leq 0,05$  y  $p \leq 0,01$  para LC3, p62 y beclin-1, respectivamente cuando se compara el grupo SANO/RSV frente a SANO. Todas las imágenes se muestran a una magnificación de 20x. Barra de escala equivalente a 100  $\mu\text{m}$ .

### 1.5.3. El uso de resveratrol no induce la apoptosis en animales sanos.

Una vez hemos comprobado que el tratamiento de animales sanos con resveratrol induce la vía no canónica de la autofagia, el siguiente paso fue evaluar su efecto en la expresión de dos de los marcadores clave en la ejecución del proceso de apoptosis, la caspasa-3 activa y su sustrato PARP (**Figura 34**). Una vez más, los resultados obtenidos en los animales del grupo SANO/RSV reafirman aquellos obtenidos el grupo AIA/RSV. Así, el uso de resveratrol disminuyó significativamente la expresión de la caspasa-3 activa en el tejido sinovial de los animales sanos tratados con resveratrol frente a aquellos que no recibieron ningún tratamiento ( $p \leq 0,01$ ). Estos resultados fueron confirmados tras analizar la señal positiva del sustrato apoptótico PARP, que no mostró diferencias

significativas con aquella obtenida en la membrana sinovial de los animales pertenecientes al grupo SANO.



**Figura 34. Efecto del resveratrol sobre la muerte celular por apoptosis en la membrana sinovial del grupo SANO/RSV.** En la figura se muestran los mediadores apoptóticos caspasa-3 activa y su sustrato PARP evaluados en el tejido sinovial de las secciones de rodilla de los grupos SANO (paneles superiores) y SANO/RSV (paneles inferiores). Nuevamente se observó como el empleo de resveratrol fue capaz de disminuir la expresión de caspasa-3 activa ( $p \leq 0,01$ ) y regular la expresión de PARP en las muestras del grupo SANO/RSV si se comparan con aquellas pertenecientes a animales sanos que no recibieron ningún tratamiento. Todas las imágenes se muestran a una magnificación de 20x. Barra de escala equivalente a 100  $\mu\text{m}$ .

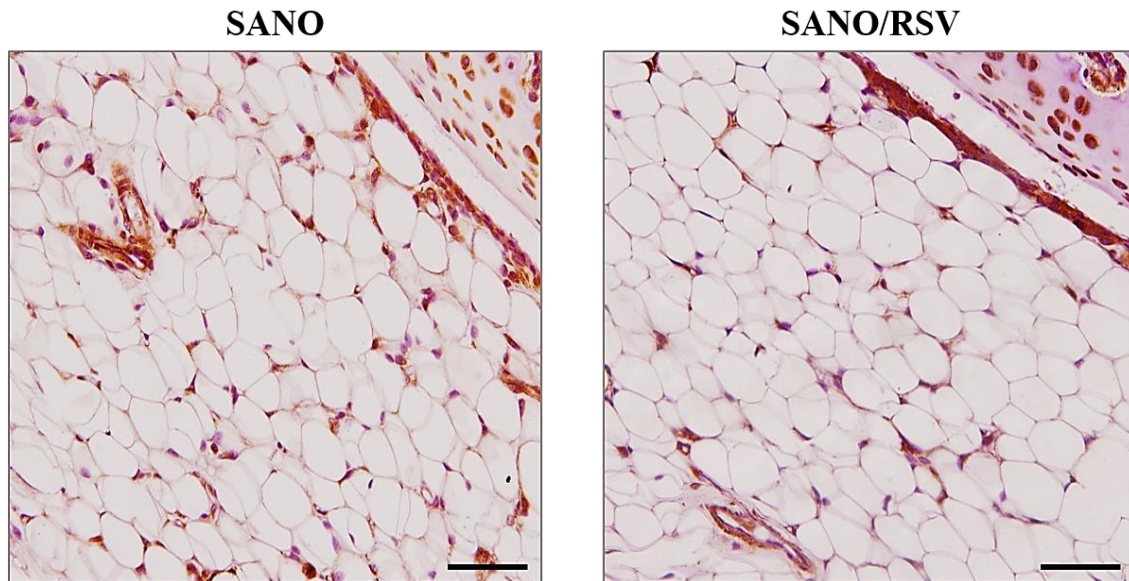
## RESULTADOS

### 1.5.4. Niveles sistémicos de IL-1 $\beta$ , PGE<sub>2</sub> y CRP en animales sanos tratados con resveratrol.

Al igual que en el apartado 1.3.1., nos propusimos evaluar los niveles sistémicos de los marcadores inflamatorios IL-1 $\beta$ , PGE<sub>2</sub> y CRP en los sueros de los animales pertenecientes al grupo SANO/RSV y compararlos con el grupo SANO para evaluar el efecto basal de la administración profiláctica de resveratrol. Los resultados estadísticos mostraron que no existen diferencias significativas entre ambos grupos en los niveles séricos de ninguno de los tres marcadores inflamatorios analizados. Así los p-valores obtenidos fueron igual a 0,357, 0,155 y 0,089 para IL-1 $\beta$ , PGE<sub>2</sub> y CRP, respectivamente.

### 1.5.5. Efecto del tratamiento profiláctico con resveratrol en la expresión del factor de transcripción NF- $\kappa$ B en la membrana sinovial de animales sanos.

Como ya hemos visto, la concentración sérica de los marcadores de inflamación sistémica no mostró diferencias significativas en los animales del grupo SANO/RSV con respecto a los niveles basales observados en los animales del grupo control. Igualmente, pretendimos evaluar si el tratamiento con resveratrol podría actuar regulando la expresión local del factor de transcripción NF- $\kappa$ B en la sinovial de aquellos animales a los que no se les indujo la artritis (**Figura 35**). Al comparar la señal positiva obtenida en los dos grupos de animales sanos se encontró que el mediador inflamatorio NF- $\kappa$ B no mostró diferencias estadísticamente significativas en su expresión derivadas de la administración oral de resveratrol, obteniendo así un p-valor=0,5.



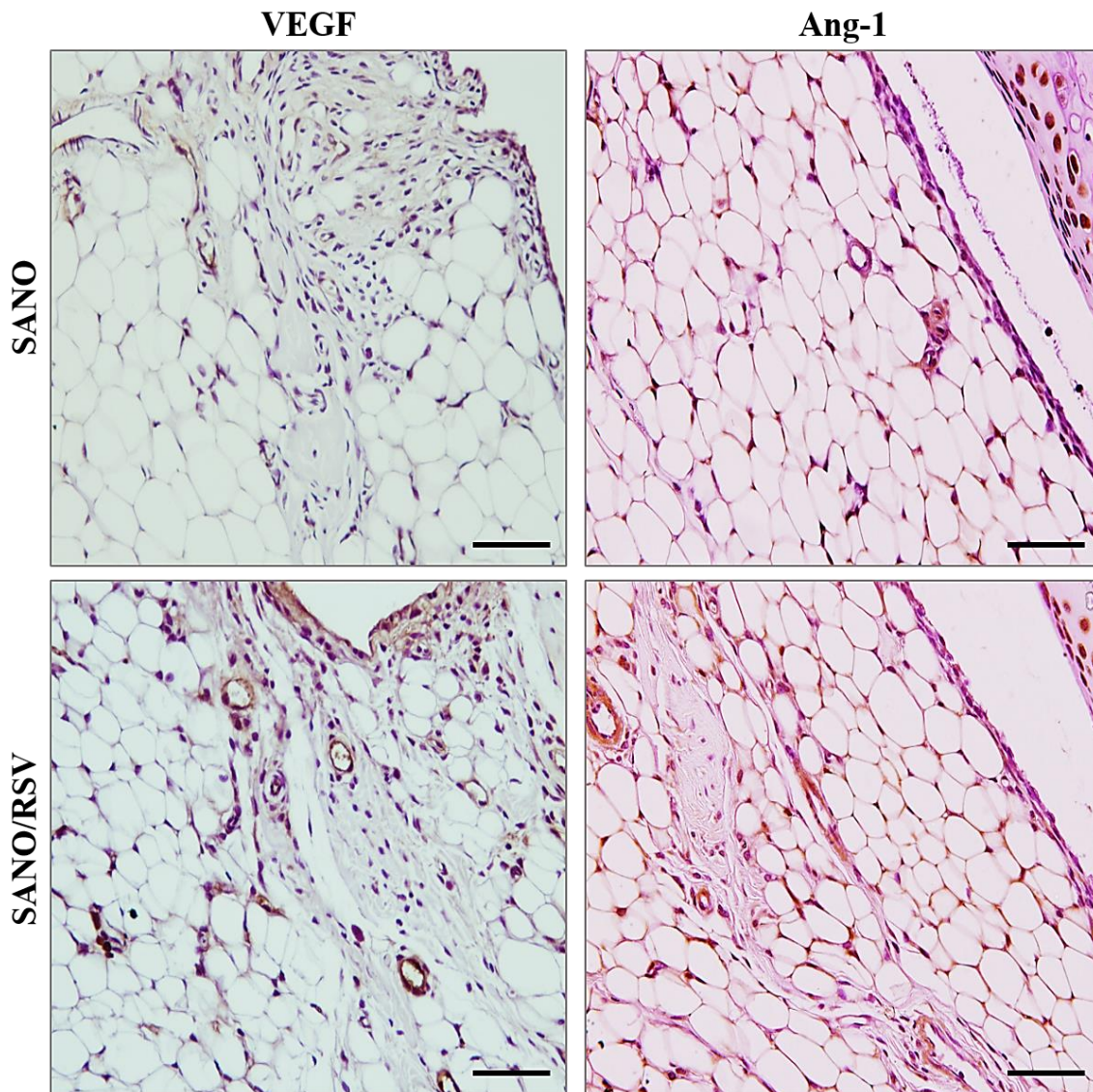
**Figura 35. El uso de resveratrol es capaz de modular la expresión del factor de transcripción NF-κB en animales sanos.** Las imágenes mostradas en la figura son representativas de la señal positiva encontrada para el mediador inflamatorio NF-κB tras ser evaluado en el tejido sinovial de las secciones de rodilla de los grupos SANO y SANO/RSV. El p-valor obtenido fue  $p=0,05$  cuando se comparó el grupo RSV frente al grupo sano al que no se le administró ningún tratamiento, no mostrando discrepancias significativas en expresión de NF-κB en la sinovial. Las imágenes se muestran a una magnificación de 20x. Barra de escala equivalente a 100  $\mu\text{m}$ .

#### **1.5.6. Expresión sinovial de los marcadores angiogénicos VEGF y Ang-1 en animales sanos tratados con resveratrol.**

Para finalizar, se valoró si la administración oral de resveratrol podría modular los procesos de formación y maduración vascular involucrados en el proceso de angiogénesis en la membrana sinovial de animales sanos. Para ello, se analizó la expresión de los marcadores VEGF y Ang-1 en el grupo SANO/RSV y se comparó con la expresión proteica obtenida en el grupo SANO. Tal y como se refleja en la **Figura 36**, VEGF mostró una expresión basal similar a la observada en el grupo de animales sanos que no recibieron ningún tratamiento y al realizar el análisis estadístico no se encontraron diferencias significativas entre ambos grupos ( $p=0,197$ ). Por el contrario, tras evaluar la señal positiva de Ang-1, mediador en la maduración de los vasos sanguíneos, se observó un incremento estadísticamente positivo en la membrana sinovial de las muestras pertenecientes al grupo SANO/RSV ( $p\leq 0,01$ ). Estos resultados podrían sugerir que la administración oral de resveratrol en aquellos animales a los que no se les indujo la enfermedad artrítica podría contribuir a la maduración de los vasos ya preexistentes en la

## RESULTADOS

sinovial, pero no a la formación *de novo* de los vasos sanguíneos limitando, por lo tanto, la posibilidad de un escenario inflamatorio en el tejido sinovial de estos animales.



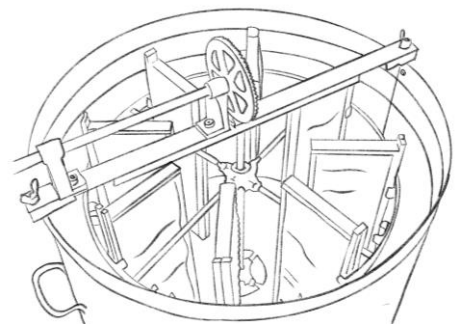
**Figura 36. Efecto del tratamiento con resveratrol sobre la expresión de marcadores del proceso angiogénico en la membrana sinovial de animales sanos.** Se evaluó la expresión de los marcadores angiogénicos VEGF y Ang-1 en el tejido sinovial de los animales pertenecientes al grupo SANO (paneles superiores) y SANO/RSV (paneles inferiores). En la figura se muestran imágenes representativas de los resultados obtenidos para VEGF, que no mostró diferencias significativas entre ambos grupos de estudio y Ang-1, cuya expresión se observó incrementada en el grupo de animales que recibió la administración profiláctica de resveratrol ( $p \leq 0,01$ ). Las imágenes se muestran a una magnificación de 20x. Barra de escala equivalente a 100  $\mu\text{m}$ .







## DISCUSIÓN





La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad autoinmune, inflamatoria y crónica que afecta fundamentalmente a las articulaciones sinoviales y que progresivamente conduce a la incapacitación del individuo que la padece. Se trata de un trastorno muy complejo que reúne eventos como la hiperplasia sinovial exacerbada, la infiltración local de varios tipos de células inmunes e inflamatorias o la angiogénesis; y todos ellos, contribuyen a que finalmente se forme un tejido anormal conocido como *pannus* reumatoide, responsable de la destrucción del cartílago y el hueso articular. Sumado a esto, curiosamente, numerosas investigaciones han sugerido que un ratio reducido de muerte celular programada podría dar explicación a la formación de dicho *pannus*. En cuanto al tratamiento de la AR, los fármacos actuales son muy costosos y se asocian a multitud de efectos secundarios derivados, en gran medida, de la larga duración de las terapias. Además, se ha observado que un porcentaje importante de pacientes no responde a los tratamientos y otros solo parcialmente, por lo que se puede afirmar que en la AR no existe actualmente una terapia eficaz a largo plazo. Todo ello, ha motivado el interés por los compuestos naturales que exhiben propiedades antioxidantes y antiinflamatorias, ya que pueden llegar a ser considerados como potenciales oportunidades de tratamiento. Uno de estos compuestos es el resveratrol, al que durante años se le han atribuido propiedades beneficiosas (antiinflamatorias, inmunomoduladoras, antioxidantes, etc.) en el escenario patológico de enfermedades como el cáncer, la diabetes, enfermedades neurológicas o cardiovasculares, entre otras; y aunque cada vez se dispone de más información acerca de su participación en tratamiento de la AR, siendo capaz de reducir la proliferación sinovial y la expresión de numerosos mediadores proinflamatorios, aún son necesarios más estudios que contribuyan a dilucidar cuáles son los mecanismos que subyacen a tal efecto modulador.

Con estos antecedentes, el objetivo de nuestro estudio fue aumentar el conocimiento existente en torno a la capacidad antiproliferativa y antiinflamatoria de la suplementación dietética con resveratrol en la fase aguda de un modelo animal de artritis inducida por antígeno (AIA), el cual comparte muchas similitudes histopatológicas con la enfermedad en humanos. Nuestra hipótesis se basa en que el resveratrol podría mostrar también un efecto protector mediante la mejora del flujo autofágico y la modulación de la interacción existente entre este proceso y la inflamación. Así, los resultados de este trabajo pueden ser de gran interés teniendo en cuenta que la prevención es uno de los grandes desafíos en la AR y, además, la dieta es un factor potencialmente modificable.

## DISCUSIÓN

La AR es una de las enfermedades crónicas e inflamatorias más comunes del sistema musculoesquelético en la que se producen lesiones que pueden conducir, en última instancia, a un daño articular a largo plazo asociado con dolor severo, incapacitación funcional progresiva e incluso, la muerte temprana; además de los elevados costes socioeconómicos que ésta supone (86,190). Aunque la AR muestra con frecuencia una afectación sistémica, su principal diana son las articulaciones sinoviales. Así, la membrana sinovial hiperplásica es uno de los principales rasgos patológicos tanto en la AR como en otras artritis inflamatorias y se asocia tanto con la infiltración y retención local de células inmunes inflamatorias como con la activación y proliferación desmesurada de las células residentes de la sinovial. En esta línea, se ha descrito como la heterogeneidad en la composición y los cambios en la estructura del tejido sinovial inflamado que dan lugar al *pannus* invasor podrían ser el resultado de una muerte celular alterada, dado que las células presentes en la sinovial exhiben un fenotipo resistente frente a la muerte celular apoptótica (47,191), lo que contribuye activamente a la persistencia de la enfermedad, facilitando la destrucción progresiva del cartílago y hueso articular (47). A pesar de los esfuerzos de la comunidad científica para dar respuesta a este fenómeno, los mecanismos que evitan que las células de la sinovial artrítica experimenten este tipo de muerte celular continúan sin esclarecerse; pero una de las hipótesis que ha ganado más fuerza en los últimos años es que un aumento de la autofagia podría estar ejerciendo como mecanismo de control sobre las vías de muerte celular en las células implicadas en la patología artrítica, y más concretamente, frente a la apoptosis (69,82,192,193).

Curiosamente, la autofagia se identificó en un principio como un mecanismo de supervivencia en respuesta al estrés (194), pero se ha descrito como este proceso también puede desempeñar un papel clave en la muerte celular, mejor conocida como muerte celular por autofagia o muerte celular programada tipo II (52,195). Adicionalmente, estudios recientes han descrito la implicación de la autofagia en la regulación de diferentes citocinas proinflamatorias, así como en la estimulación de la respuesta inmune (196,197). En relación con la AR, se ha sugerido que la intensificación farmacológica del flujo autofágico podría poseer actividad modificadora de la enfermedad, actuando de forma beneficiosa a diferentes niveles (198,199). A este respecto, en un ensayo clínico en el que se evaluó la combinación del inhibidor de mTOR (supresor de la autofagia) everolimus y MTX, se observó que ésta fue beneficiosa en pacientes que responden de forma inadecuada a la monoterapia con MTX (89); sin embargo y en oposición a lo

anterior, varios estudios han descrito como la mejora de la vía autofágica se encuentra implicada en la progresión de la AR (83,86). Por otra parte, la supresión farmacológica de la misma se ha correlacionado con un resultado clínico favorable al realzar el proceso apoptótico (193,200,201). Claramente, se requieren más estudios para dilucidar cuál es el papel de la autofagia en la patología artrítica a fin de esclarecer toda la controversia existente al respecto.

En lo relativo al tratamiento de la AR, desafortunadamente, ésta no tiene cura. En las últimas décadas se han destinado grandes esfuerzos en investigación para desarrollar estrategias terapéuticas destinadas tanto al control de la inflamación como a reducir los principales daños derivados de la patología artrítica ya establecida; sin embargo, los tratamientos convencionales y las terapias biológicas existentes presentan múltiples efectos secundarios y un elevado coste (32). Por ello, no resulta sorprendente que cambios en el estilo de vida, específicamente en los patrones dietéticos, se encuentren en el foco de atención de un gran número de investigaciones como un recurso para prevenir o tratar enfermedades crónicas como la AR (202–204). En este contexto, los compuestos naturales han destacado debido al amplio rango de efectos beneficiosos que poseen. Uno de estos compuestos es el resveratrol; un estilbeno polifenólico derivado de las plantas, por lo que puede encontrarse fácilmente en numerosas fuentes dietéticas. Además, son muchos los estudios preclínicos que han puesto de manifiesto los efectos biológicos que posee sobre un gran número de enfermedades crónicas, mostrando un comportamiento pleiotrópico capaz de interactuar con múltiples dianas, lo que ha llevado al resveratrol a ganar una considerable atención, consagrándose como el polifenol más ampliamente estudiado (156,164,204–206). Concretamente en la AR, las publicaciones que se centran en demostrar *in vitro* los efectos del resveratrol son frecuentes; sin embargo, los trabajos en los que se emplean modelos *in vivo* son más escasos y suelen enfocarse en comprender qué sucede en la fase crónica de la enfermedad cuando el método empleado de administración del resveratrol es mediante inyección intraperitoneal o bien, inyección directa en la articulación. Por ello, son necesarios más estudios que permitan conocer qué sucede en la articulación artrítica en el momento en el que se produce la fase aguda de la enfermedad y la vía de administración de resveratrol es la oral.

A este respecto, en una publicación previa de nuestro grupo hemos descrito una disminución de la gravedad de la enfermedad articular en un modelo agudo de AIA tras la administración oral y profiláctica de resveratrol. La dosis empleada de resveratrol en

## DISCUSIÓN

nuestro modelo animal fue 12,5 mg/kg/día, equivalente a una dosis de 2 mg/kg/día en humanos, que según la fórmula de dosis equivalente en humanos (207) serían aproximadamente 114 mg de resveratrol en un adulto de 70 kg. Así, según los datos obtenidos en diferentes ensayos clínicos, que indican que las dosis diarias de resveratrol entre 20 mg y 2 g son seguras y bien toleradas (202,205), podemos señalar que la dosis empleada en nuestro estudio entra dentro de un rango adecuado. Entre los resultados obtenidos se observó como aquellos animales tratados con resveratrol mostraron una reducción de las principales características histopatológicas en la membrana sinovial artrítica valoradas mediante la tinción H-E: hiperplasia de la capa íntima de la sinovial, infiltrado celular inmune y celularidad; resultados que hemos confirmado de nuevo en el presente trabajo empleando la misma técnica. Igualmente, la disminución significativa de la hiperplasia sinovial, se midió de forma específica con el marcador nuclear de células en proliferación PCNA (del inglés: *Proliferating Cell Nuclear Antigen*), y la reducción de la infiltración local masiva de células inmunes e inflamatorias con los marcadores CD3 y CD68. Sumado a esto, se describió una potente disminución tanto de la inflamación mediada por citoquinas como del daño oxidativo (156). Resultados similares fueron obtenidos por otros autores, donde el empleo de resveratrol demostró de igual modo poseer la capacidad de reducir marcadores clave de la artritis en otros modelos animales (199,208–210).

Sin embargo, aún se desconoce si el resveratrol es capaz de regular la proliferación anormal del tejido sinovial actuando sobre las diferentes vías de muerte celular e induciendo el flujo autofágico en un modelo *in vivo* de artritis en fase aguda. Hasta el momento se conoce que el resveratrol puede inducir la muerte celular por autofagia en líneas de células cancerosas, lo que sugirió su uso como un tratamiento eficaz en células resistentes a la apoptosis (211). De esta forma y no teniendo conocimiento de trabajos previos al respecto, este sería el primer estudio que demuestra que la administración oral y profiláctica de resveratrol puede ejercer un efecto protector en la AR al mejorar el flujo autofágico y, en consecuencia, reducir la hiperplasia sinovial y modular la interacción existente con el proceso inflamatorio en un modelo agudo de AIA. Para poder llegar a esta conclusión se evaluó el efecto del resveratrol sobre el proceso autofágico, para lo que analizamos la expresión de tres participantes principales de la vía de la autofagia: LC3, p62/SQSTM1 y beclin-1. De acuerdo con estudios previos, en los que se ha descrito que un aumento de la autofagia en la sinovial de pacientes con AR se correlaciona con la

gravedad de la enfermedad (86) nuestros resultados también mostraron una mayor expresión de LC3, junto con p62 y beclin-1 en el grupo de animales a los que se les indujo la artritis y no recibieron tratamiento; y curiosamente, tras el tratamiento con resveratrol, la señal de LC3 siguió aumentando, pero el nivel de p62 sufrió un descenso significativo. En este sentido, se ha descrito cómo la acumulación de p62 en respuesta al estrés metabólico es una característica de la autofagia defectuosa en las células tumorales (212) y, de hecho, el tejido sinovial de la AR también manifiesta un estrés elevado del retículo endoplásmico, en parte debido a la síntesis de mediadores inflamatorios (82). En vista de los resultados obtenidos donde se combina una disminución de p62 y un aumento de LC3 podemos sugerir que el resveratrol actúa regulando al alza el flujo autofágico; al igual que sucede en el contexto de diferentes patologías cardíacas, neurológicas o en la diabetes donde el uso de resveratrol mostró un efecto protector al potenciar el flujo autofágico (213,214). Asimismo, son numerosos los modelos *in vivo* de enfermedades relacionadas con el envejecimiento en los que también se ha observado una mejora de los principales signos de la patología. Como ejemplo, la inyección intraarticular local de resveratrol retrasa la degeneración del cartílago en un modelo experimental de osteoartritis (OA) mediante la inducción de la autofagia (173). También se ha observado un aumento del flujo autofágico determinado por un incremento en los niveles de LC3 y una disminución de su sustrato p62 cuando el resveratrol es administrado oralmente a roedores empleados en modelos de osteoporosis y enfermedad renal crónica (215,216), contribuyendo así a la reducción de la pérdida ósea o la mejora del metabolismo lipídico.

Para obtener un mayor conocimiento acerca del efecto del resveratrol sobre el proceso autofágico en nuestro modelo AIA, también se evaluó la expresión sinovial del regulador temprano de la autofagia, beclin-1. Nuestros resultados mostraron que la administración oral de resveratrol no condujo a un aumento de la señal de este marcador y, por lo tanto, podemos sugerir que el empleo de este compuesto podría incentivar la vía no canónica de la autofagia, es decir, independiente de beclin-1. De manera similar a lo que sucede en nuestro modelo, los resultados obtenidos en células humanas de cáncer de mama, mostraron que el resveratrol puede inducir la muerte celular mediante la activación de la autofagia no canónica y que ésta curiosamente se produce cuando hay un defecto en la apoptosis mediada por la caspasa-3 (78). Asimismo, Niso-Santano y colaboradores describieron como el uso de otros compuestos naturales como los ácidos grasos insaturados, más concretamente el ácido oleico, también promovía la vía no canónica de

## DISCUSIÓN

la autofagia en distintas líneas de células cancerígenas (217). Por otro lado, se ha observado como esta vía de la autofagia inhibe la respuesta autoinflamatoria causada por la presencia de células moribundas y, por el contrario, su defecto puede contribuir a la patogénesis del lupus sistémico eritematoso (LES) (218). En relación con el tejido sinovial, nuestros resultados son consistentes con estudios previos donde la rapamicina, un inductor de autofagia con efectos inhibidores de mTOR, también redujo la gravedad de la sinovitis, así como las erosiones óseas locales y la pérdida de cartílago en diferentes modelos de enfermedades reumatoides y en pacientes con LES (219–222).

En la actualidad está ampliamente aceptado que existe una interacción entre los procesos de autofagia y apoptosis y que ésta es claramente dependiente del contexto, donde la autofagia, en general, inhibe la inducción de apoptosis y viceversa (223). En nuestras muestras de tejido sinovial AIA la presencia de los marcadores de muerte celular apoptótica, caspasa-3 activa y su sustrato escindido PARP aumentaron significativamente; sin embargo, este proceso no fue suficiente para poder reducir los signos típicos de la sinovial hiperplásica reumatoide. Sumado a lo anterior, cabe destacar que la administración oral de resveratrol inhibió la apoptosis, dado que la expresión de ambos marcadores se redujo significativamente. Del mismo modo, se ha observado como el resveratrol puede actuar reduciendo la tasa apoptótica en el contexto de numerosas patologías. Así, Dave M. y colaboradores demostraron *in vitro* como el tratamiento con este polifenol confirió resistencia a la apoptosis tanto en condrocitos sanos como artrósicos, disminuyendo los niveles citosólicos del citocromo c mitocondrial así como la expresión del marcador Anexina V (224); e igualmente, el resveratrol mejoró la resistencia a la insulina y exhibió efectos neuroprotectores reduciendo los niveles de apoptosis y promoviendo, en cambio, el flujo autofágico (213,225). Por el contrario, también se ha demostrado que el resveratrol induce la muerte celular por apoptosis *in vitro* en diferentes líneas celulares de cáncer de mama de manera dosis-dependiente (226) así como en distintos tipos de fibroblastos (227,228) y en células sinoviales artríticas (229,230). De esta forma, son varios los estudios que han sugerido que un aumento de la apoptosis tras tratar fibroblastos artríticos con resveratrol y medido, entre otras formas, a través del ratio BCL-2/BAX (proteína antiapoptótica/proapoptótica) podría ser una consecuencia de la activación del factor de transcripción Nrf2, que actuaría ejerciendo actividad antioxidante, antiinflamatoria y antiproliferativa (175,231). A día de hoy sigue existiendo una gran controversia en torno al efecto del resveratrol sobre la muerte celular



en el contexto de la patología artrítica; pero cabe la posibilidad de que las discordancias observadas entre los diferentes estudios pueden ser explicadas por diferencias en la dosis (generalmente se observa apoptosis cuando éstas son elevadas), por el tipo de célula, la duración del tratamiento o incluso la etapa de la enfermedad. En nuestro caso, los datos obtenidos en este trabajo nos permiten sugerir que el tratamiento diario con resveratrol a una dosis de 12,5 mg/kg/día en un modelo agudo de AIA es capaz de regular el equilibrio entre la autofagia y la apoptosis, dirigiéndolo hacia la autofagia.

La AR es una enfermedad típicamente inflamatoria en la que numerosas citoquinas proinflamatorias son liberadas de la sinovial a la circulación sistémica, involucrándose en casi todos los aspectos de esta patología (28). Concretamente, se ha observado que la IL-1 $\beta$  se encuentra significativamente elevada en la AR (106). De hecho, el bloqueo de la ruta de señalización de la IL-1 $\beta$  se emplea como terapia biológica en la AR y se dirige a inhibir la respuesta generada por esta citoquina (107). De manera similar, en este estudio mostramos como la IL-1 $\beta$  sistémica también es una diana clave del resveratrol; al igual que los parámetros clínico-patológicos inflamatorios, CRP y PGE<sub>2</sub>, de los cuales se ha descrito que se encuentran muy elevados en el líquido sinovial y suero de pacientes con artritis (28), y de los que se observó una reducción de sus niveles séricos tras el tratamiento con resveratrol. Estos hallazgos son consistentes con los resultados obtenidos previamente por nuestro grupo y por otros autores, donde se ha demostrado como el resveratrol suprimió *in vitro* e *in vivo* la respuesta inflamatoria en la que se encuentran involucrados éstos y otros mediadores inflamatorios clave en la patología artrítica como la IL-8, MMP-3, IL-6, TNF- $\alpha$ , HIF-1 $\alpha$ , IL-10 o COX-2 (156,177,232–235). También se ha observado como los niveles de CRP se redujeron significativamente en pacientes diabéticos de tipo 2 que recibieron una suplementación con resveratrol (236) mientras que su influencia sobre este marcador en el contexto de las enfermedades cardiovasculares se ha puesto en entredicho; sin embargo, esto podría explicarse por un mal diseño de los estudios o las dosis empleadas de resveratrol (237). Por otra parte, el tratamiento con resveratrol previno la síntesis de PGE<sub>2</sub> mediada por IL-1 $\beta$  y otros estímulos proinflamatorios en varias líneas celulares, incluyendo sinoviocitos y condrocitos (224,234,238); y contribuyó a reducir sus niveles séricos en un modelo animal de artritis inducida por adyuvante (239).

Profundizando más en el proceso inflamatorio, es importante destacar que el complejo inflamasoma se ha establecido, indiscutiblemente, como una plataforma molecular

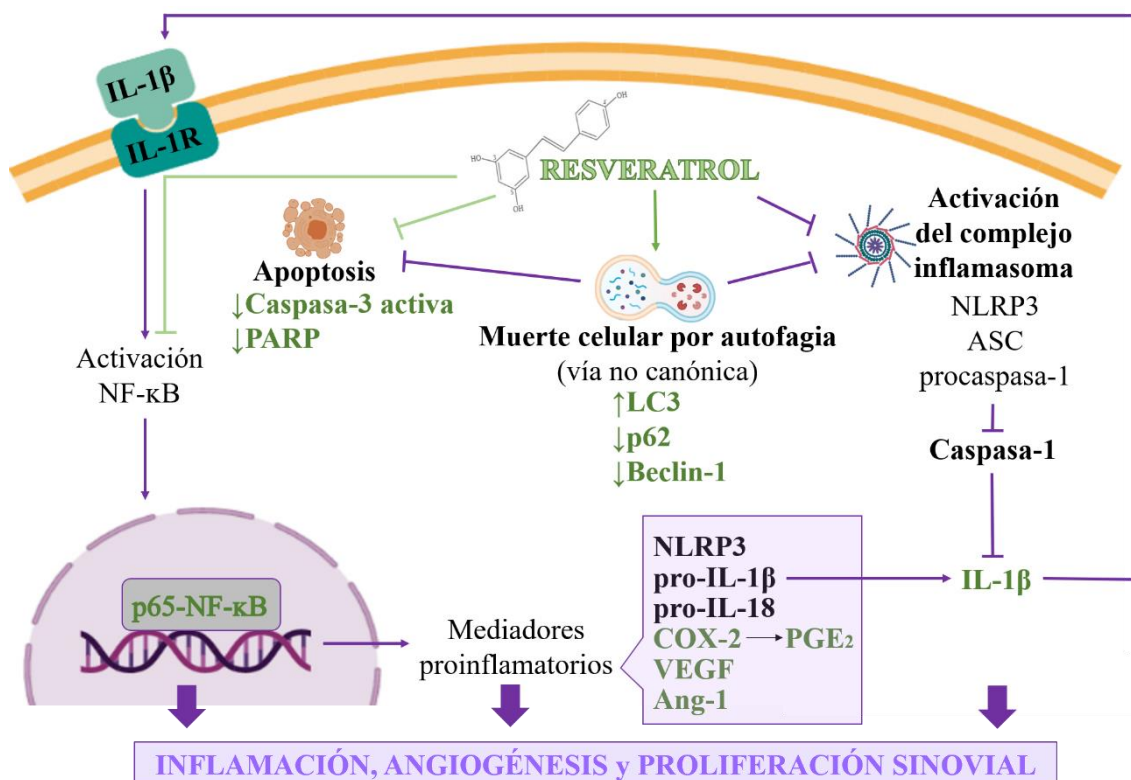
## DISCUSIÓN

fundamental para la activación de la caspasa-1 y, consecuentemente, la maduración y secreción de la IL-1 $\beta$  (106). Así mismo, cada vez son más las evidencias que apuntan a que un fallo en la autofagia podría modular la actividad del inflamasoma, favoreciendo de este modo el desarrollo de múltiples enfermedades inflamatorias y autoinmunes (132,133,196). En relación a esto, se ha observado como la autofagia suprime la ruta de señalización de la IL-1 $\beta$  mediante la activación de la degradación de p62 a través de vías lisosomales y proteosómicas y, por el contrario, su acumulación permite la activación de proteínas implicadas en dicha ruta, dando lugar a una respuesta inflamatoria hiperactivada (240). Así, se ha observado como una expresión incrementada de p62 a través de la alteración del proteosoma está implicada en la activación de caspasa-1 mediada por un incremento en la expresión de IL-1 $\beta$  inducida por cristales de urato monosódico (241). Además, se ha descrito como la IL-1 $\beta$  induce la formación de autofagosomas en enfermedades degenerativas. Esto es interesante, ya que sugiere que IL-1 $\beta$  puede limitar su propia secreción a través de un mecanismo de retroalimentación que promueve la supervivencia de la célula (242). De acuerdo con todas estas evidencias, nuestro estudio mostró que los niveles de expresión de p62 en la membrana sinovial se correlacionó directamente con los niveles séricos de los mediadores inflamatorios IL-1 $\beta$ , CRP y PGE<sub>2</sub>. En este sentido, Chan Y-P. y colaboradores demostraron en una línea celular de macrófagos como el empleo de resveratrol suprimió la vía inflamasoma a través de un aumento del flujo autofágico (88). De igual manera, el empleo de un análogo natural del resveratrol, el pterostilbeno, se ha propuesto como un nuevo inductor de la autofagia capaz de reducir a la baja la activación del inflamasoma y en consecuencia la transición epitelio mesenquimal que acompaña a la enfermedad renal crónica (243). Además, la protección contra la pérdida del hueso y del cartílago por el inductor de autofagia rapamicina se asoció con una disminución de la expresión de IL-1 $\beta$  en la membrana sinovial (219). No teniendo conocimiento de estudios previos al respecto, es importante destacar que este es el primer trabajo de investigación que muestra que la intensificación farmacológica del flujo autofágico con un compuesto natural como el resveratrol limita la interacción existente con el proceso inflamatorio en un modelo agudo de AIA.

Para obtener una visión más amplia de las potenciales propiedades antiinflamatorias que posee el resveratrol en la patología artrítica evaluamos la expresión sinovial del factor p65-NF- $\kappa$ B, considerado clave en la regulación de la inflamación, la angiogénesis y la proliferación celular, así como su posible interacción con el proceso autofágico. Nuestros

datos mostraron que el resveratrol reguló a la baja los niveles de expresión de la proteína p65-NF- $\kappa$ B en el tejido sinovial de los animales pertenecientes al grupo AIA; estos datos concuerdan con la información existente hasta el momento, que apunta a que el resveratrol suprime el proceso inflamatorio al regular negativamente la activación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B en el contexto de diferentes patologías humanas (164,169,244,245). Justamente, en una publicación previa de nuestro grupo se describió como el resveratrol limitó la actividad de NF- $\kappa$ B y la expresión de IL-8, COX-2 y PGE<sub>2</sub> en sinoviocitos humanos sanos bajo diferentes condiciones proinflamatorias (234); y este mismo efecto inhibitorio sobre p65-NF- $\kappa$ B *in vitro* fue descrito por Zhang Y. y colaboradores, que al mismo tiempo demostraron la relación existente entre este proceso y un aumento de la apoptosis en células sinoviales artríticas explicado por una disminución del estrés oxidativo mediado por Nrf2 (231). Sorprendentemente, nuestros datos reflejaron la existencia de una fuerte correlación positiva entre la expresión sinovial de p62 y el factor p65-NF- $\kappa$ B. En este sentido, se ha descrito cómo NF- $\kappa$ B induce la expresión de p62, que se une a las mitocondrias dañadas marcándolas para su degradación e inhibe en consecuencia el proceso inflamatorio mediado por el complejo inflamasoma; y, por el contrario, como una autofagia defectuosa da como resultado la acumulación de p62, que puede activar NF- $\kappa$ B, perpetuando así, el proceso inflamatorio (134). A raíz de los datos obtenidos en el presente trabajo y sumado a la información preexistente en la literatura, podemos sugerir que la supresión de la ruta inflamatoria, ya sea a consecuencia de la inhibición del factor de transcripción NF- $\kappa$ B o bien del complejo inflamasoma, a través de la activación del proceso autofágico, podría considerarse como una estrategia terapéutica. La razón de esto se debe a que no se inhibe únicamente la IL-1 $\beta$  resultante de ambos procesos, sino multitud de mediadores inflamatorios que se encuentran involucrados en su vía de señalización y que participan activamente en los distintos eventos que subyacen a la AR, tal y como representamos en la **Figura 37**.

## DISCUSIÓN



**Figura 37. Representación esquemática de los principales hallazgos del estudio.** La suplementación dietética y profiláctica con resveratrol induce la vía no canónica de la autofagia inhibiendo en consecuencia, la apoptosis, y limitando la interacción existente con el proceso inflamatorio mediante la inhibición del factor NF-κB. Todo ello modula, por consiguiente, la respuesta inflamatoria, la angiogénesis y la proliferación sinovial características de la patología artrítica. Futuros estudios son requeridos para dilucidar si la prevención de la activación del complejo inflammasoma también se encontraría implicada en el efecto pleiotrópico del resveratrol.

La formación de nuevos vasos sanguíneos juega un papel indispensable en el crecimiento del *pannus* reumatoide y progresión de la AR. Anteriormente, hemos publicado cómo la concentración sérica de CINC-1, homólogo murino de la quimiocina humana IL-8, se redujo en animales a los que se les indujo la artritis y recibieron un tratamiento diario con resveratrol (156); y en este sentido, se ha descrito que la IL-8 puede afectar directamente a la angiogénesis de la AR (126). Continuando con esta línea, uno de los objetivos de este estudio fue conocer en mayor profundidad si el resveratrol puede contribuir a modular la proliferación anormal de la sinovial mediante la regulación del proceso angiogénico. Para ello, valoramos la expresión de dos mediadores críticos de la angiogénesis en la artritis inflamatoria, VEGF y Ang-1, implicados en la etapa inicial y final de este proceso, respectivamente (126). La presencia de ambos marcadores sufrió un notable incremento en el tejido sinovial del grupo AIA y disminuyó considerablemente tras el tratamiento con resveratrol, aunque solo Ang-1 alcanzó valores significativos. Estos resultados son consistentes con la reducción observada de los niveles séricos de IL-

1 $\beta$  y la expresión sinovial de p65-NF- $\kappa$ B en el grupo que recibió suplementación con resveratrol, ya que VEGF y Ang-1 pueden ser inducidos por IL-1 $\beta$  a través de NF- $\kappa$ B (126,246). Además, se ha descrito cómo el resveratrol alivia los principales signos de la AR *in vivo*, reduciendo la densidad vascular en la matriz del cartílago y, consecuentemente, el infiltrado celular inflamatorio (209), y resultados no publicados por nuestro grupo muestran que el resveratrol previno de forma evidente la respuesta angiogénica inducida por la disfunción mitocondrial. Igualmente, son muchas las publicaciones vinculan las propiedades quimiopreventivas del resveratrol en el cáncer con su actividad antiangiogénica; en este sentido, se ha hecho especial hincapié en inhibir la activación de la ruta de VEGF, atenuando la expresión del factor HIF-1 $\alpha$  (247,248). Los datos aportados en el presente trabajo sugieren que la reducción observada en la hiperplasia sinovial después del tratamiento con resveratrol puede estar causada, entre otros motivos, por una disminución de la expresión de los marcadores angiogénicos VEGF y Ang-1.

En virtud de los datos obtenidos en este trabajo, apoyamos la consideración de la dieta, y más concretamente del resveratrol, como parte del tratamiento frente a la AR; en este sentido, un estilo de vida saludable que incluye un patrón de dieta sano, es considerado obligatorio en el manejo de muchas patologías comunes, como enfermedades cardiovasculares, y cada vez más en enfermedades inflamatorias como la AR. De esta forma, el resveratrol podría ser un tratamiento coadyuvante eficaz en el tratamiento de los pacientes con AR, debido en parte, a la biocompatibilidad y seguridad intrínseca que posee, en comparación con otros fármacos químicos (249); y, de igual modo, podría contribuir a reducir el impacto de comorbilidades como la obesidad en la AR, puesto que en la actualidad existen evidencias claras de que la obesidad se encuentra asociada con una actividad y sintomatología más grave en los pacientes con patología artrítica. En relación a esto, las terapias anti-TNF son capaces de mejorar la sensibilidad a la insulina en pacientes AR; sin embargo, nuevos hallazgos han demostrado que la eficacia de estos agentes puede verse comprometida por la obesidad (250,251). En este contexto, se ha destacado al resveratrol por sus propiedades antiobesidad (252); aunque si éste puede conducir a una mejor respuesta al tratamiento en pacientes obesos con AR sigue siendo una asignatura pendiente. Hasta ahora, varios estudios *in vivo* demuestran que el resveratrol mejora la resistencia a la insulina, la pérdida de peso y la homeostasis de la glucosa al promover la transformación de la grasa blanca del tejido adiposo en grasa parda

## DISCUSIÓN

al regular la secreción de adipoquinas y mioquinas (252). De manera similar, este compuesto fue capaz de reducir la obesidad en roedores alimentados con una dieta alta en grasas al modular la composición y la función metabólica de la microbiota intestinal (253). Sin embargo, todos estos resultados se obtuvieron en diferentes modelos en varios momentos, con diferentes dosis y de diferentes tejidos y tipos de células, y es difícil extrapolar lo que está sucediendo en el entorno articular. Por otra parte, existen algunos ensayos clínicos que evalúan el efecto del resveratrol sobre la obesidad. Sin embargo, la heterogeneidad en las poblaciones, así como las diferentes dosis administradas de resveratrol ha limitado los resultados obtenidos (254,255). Por tanto, abordar la cuestión de cuál sería la eficacia del resveratrol u otros compuestos naturales en las comorbilidades asociadas a la AR, concretamente en la obesidad, podría dar lugar a futuras nuevas líneas de investigación en nuestro grupo.

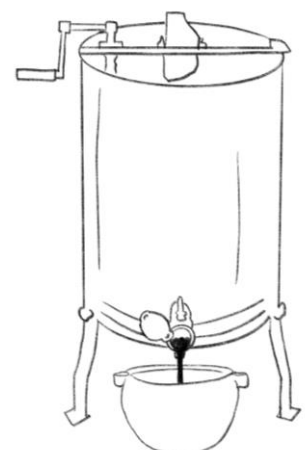
Finalmente, los resultados obtenidos en este trabajo nos permiten sugerir que la autofagia podría ser una potencial diana terapéutica en la AR. No hay duda de que la autofagia se encuentra actualmente en el punto de mira de la investigación biomédica debido, principalmente, a su participación activa en el envejecimiento y en el desarrollo de diversas patologías humanas (256), entre ellas, numerosas enfermedades reumáticas, incluida la AR. Por ello, no debemos olvidar que la autofagia presenta una función específica dentro del contexto celular y que el flujo autofágico mejorado puede ser crucial para la inducción de la muerte celular autofágica (257). Así, nuestro estudio muestra que el resveratrol puede ser una estrategia muy valiosa destinada a tratar o prevenir la respuesta inflamatoria asociada a la AR, así como la hiperplasia sinovial, actuando como un inductor autofágico. En definitiva, las estrategias de dieta preventiva con resveratrol u otros agentes nutricionales podrían abrir una potencial ventana terapéutica dirigida a modular el riesgo de padecer AR o bien influir en su curso, así como potenciar un envejecimiento saludable, ya sea como parte de la dieta cotidiana o bien como suplemento.







## CONCLUSIONES





### Conclusión general:

1. El resveratrol, administrado oralmente, es capaz de actuar sobre mecanismos de muerte celular programada y mediadores inflamatorios en la fase aguda de un modelo animal de AIA.

### Conclusiones específicas:

1.1. Disminuye microscópicamente los principales signos de hiperplasia e inflamación sinovial en la articulación: proliferación de la capa íntima, infiltrado de células inmunitarias y el exceso de celularidad.

1.2. Induce mecanismos de muerte celular programada mediada por autofagia en el tejido sinovial, activando la vía no canónica, independiente de beclin-1. El aumento de la expresión de LC3 y el consumo de su sustrato autofágico p62 en el tejido sinovial AIA corroboró el aumento del flujo autofágico derivado del tratamiento oral con resveratrol.

1.3. Disminuye la activación de mecanismos de muerte celular programada mediada por apoptosis, reduciendo así la expresión de los marcadores caspasa-3 activa y su sustrato PARP el tejido sinovial.

1.4. Reduce la inflamación sistémica, actuando sobre los niveles de los parámetros clínicos IL-1 $\beta$ , PGE<sub>2</sub> y PCR. Asimismo, el resveratrol es capaz de controlar el proceso inflamatorio a través de la activación de mecanismos de muerte celular autofágica, más concretamente, modulando la expresión del sustrato autofágico p62 y su correlación con los mediadores inflamatorios IL-1 $\beta$ , PGE<sub>2</sub> y PCR.

1.5. Reduce la inflamación local, modulando la expresión del factor de transcripción NF- $\kappa$ B. El aumento del flujo autofágico por el uso de resveratrol podría modular el proceso inflamatorio en la sinovial AIA a través de la expresión de p62 y su correlación con el factor NF- $\kappa$ B.

1.6. Disminuye la expresión sinovial de los marcadores proangiogénicos VEGF y Ang-1.

Los resultados obtenidos en este trabajo nos permiten concluir que la administración oral de resveratrol en un modelo de AIA es capaz de inducir muerte celular programada mediante la activación de la vía no canónica de la autofagia y regular su interacción con el proceso inflamatorio, lo que en consecuencia ayuda a modular la hiperplasia sinovial e

## CONCLUSIONES

inflamación asociada características de la AR. Las estrategias preventivas que incorporan la intervención dietética con resveratrol pueden ofrecer una posible alternativa terapéutica a los fármacos, con el fin de influir tanto en el inicio como en el curso de la patología artrítica. Asimismo, la búsqueda de nuevas estrategias terapéuticas dirigidas a potenciar la activación del proceso autofágico dentro de la articulación artrítica podría suponer un avance sustancial en el control de la enfermedad.





## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS







## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. World Health Organization (WHO). Informe Mundial sobre el envejecimiento y la salud. World Health Organization. World Health Organization; 2016. 3–267 p.
2. Abellán García A, Aceituno Nieto P, Pérez Díaz J, Ramiro Fariñas D, Ayala García A, Pujol Rodríguez R. Un perfil de las personas mayores en España, 2019. Indicadores estadísticos básicos”. Vol. 22, Informes envejecimiento en red. 2016. p. 4–36.
3. SER. Tratado de enfermedades reumáticas de la Sociedad Española de Reumatología (SER). España: Editorial Médica Panamericana; 2018. 1–864 p.
4. Jurado MR, Stajnsznajder P, Cassan A, Torralba AI. Artritis reumatoide. Información actualizada para pacientes y familiares. Barcelona, España: ConArtritis; 2010. 1–97 p.
5. Scott DL, Wolfe F, Huizinga TWJ. Rheumatoid arthritis. *Lancet*. 2010;376:1094–108.
6. Carbonell J, Cobo T, Balsa A, Descalzo MÁ, Carmona L, SERAP. The incidence of rheumatoid arthritis in Spain: Results from a nationwide primary care registry. *Rheumatology*. 2008;47:1088–92.
7. Seoane-mato D, Sánchez-piedra C, Silva-fernández L, Sivera F, Blanco FJ, Pérez F, *et al*. Prevalencia de enfermedades reumáticas en población adulta en España (estudio EPISER 2016). *Objetivos y metodología*. *Reum Clin*. 2019;15(2):90–6.
8. Silva-Fernández L, Macía-Villa C, Seoane-Mato D, Cortés-Verdú R, Romero-Pérez A, Quevedo-Vila V, *et al*. The prevalence of rheumatoid arthritis in Spain. *Sci Rep*. 2020;10:21551.
9. Carmona L, Villaverde V, Hernández-García C, Ballina J, Gabriel R, Laffon A, *et al*. The prevalence of rheumatoid arthritis in the general population of Spain. *Rheumatology*. 2002;41:88–95.
10. Alamanos Y, Drosos AA. Epidemiology of adult rheumatoid arthritis. *Autoimmun Rev*. 2005;4(2005):130–6.
11. Klareskog L, Rönnelid J, Saevarsdottir S, Padyukov L, Alfredsson L. The importance of differences; On environment and its interactions with genes, and immunity in the causation of rheumatoid arthritis. *J Intern Med*. 2020;287(5):514–33.
12. MacGregor AJ, Snieder H, Rigby AS, Koskenvuo M, Kaprio J, Aho K, *et al*. Characterizing the quantitative genetic contribution to rheumatoid arthritis using data from twins. *Arthritis Rheum*. 2000;43(1):30–7.
13. Ruiz-Esquide V, Sanmartí R. Tabaco y otros factores ambientales en la artritis reumatoide. *Reumatol Clin*. 2012;8(6):342–50.
14. Smith JB, Haynes MK. Rheumatoid arthritis-A molecular understanding. *Ann Intern Med*. 2002;136:908–22.
15. McInnes IB, Schett G. The pathogenesis of rheumatoid arthritis. *N Engl J Med*. 2011;365:2205–19.
16. Derksen VFAM, Huizinga TWJ, van der Woude D. The role of autoantibodies in the pathophysiology of rheumatoid arthritis. *Semin Immunopathol*. 2017;39:437–

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 46.
17. Hill JA, Southwood S, Sette A, Jevnikar AM, Bell DA, Cairns E. Cutting Edge: The Conversion of Arginine to Citrulline Allows for a High-Affinity Peptide Interaction with the Rheumatoid Arthritis-Associated HLA-DRB1\*0401 MHC Class II Molecule. *J Immunol.* 2003;171(2):538–41.
  18. Tobón GJ, Youinou P, Saraux A. The environment, geo-epidemiology, and autoimmune disease: Rheumatoid arthritis. *J Autoimmun.* 2010;35(1):10–4.
  19. Costenbader KH, Chang SC, De Vivo I, Plenge R, Karlson EW. Genetic polymorphisms in PTPN22, PADI-4, and CTLA-4 and risk for rheumatoid arthritis in two longitudinal cohort studies: Evidence of gene-environment interactions with heavy cigarette smoking. *Arthritis Res Ther.* 2008;10(3):R52.
  20. De Luca F, Shoenfeld Y. The microbiome in autoimmune diseases. *Clin Exp Immunol.* 2019;195(1):74–85.
  21. Kharlamova N, Jiang X, Sherina N, Potempa B, Israelsson L, Quirke A-M, *et al.* Antibodies to Porphyromonas gingivalis indicate interaction between oral infection, smoking and risk genes rheumatoid arthritis etiology. *Arthritis Rheumatol.* 2016;68(3):604–13.
  22. Favalli EG, Biggioggero M, Crotti C, Becciolini A, Raimondo MG, Meroni PL. Sex and Management of Rheumatoid Arthritis. *Clin Rev Allergy Immunol.* 2019;56(3):333–45.
  23. Alpízar-rodríguez D, Finckh A. Environmental factors and hormones in the development of rheumatoid arthritis. *Semin Immunopathol.* 2017;39(4):461–8.
  24. Chehade L, Jaafar ZA, El Masri D, Zmerly H, Kreidieh D, Tannir H, *et al.* Lifestyle modification in rheumatoid arthritis: Dietary and physical activity recommendations based on evidence. *Curr Rheumatol Rev.* 2019;15(3):209–14.
  25. Gioia C, Lucchino B, Tarsitano MG, Iannuccelli C, Di Franco M. Dietary habits and nutrition in rheumatoid arthritis: Can diet influence disease development and clinical manifestations? *Nutrients.* 2020;12(5):1456.
  26. Hernández-Hernández MV, Díaz-González F. Role of physical activity in the management and assessment of rheumatoid arthritis patients. *Reumatol Clínica.* 2017;13(4):214–20.
  27. Song YW, Kang EH. Autoantibodies in rheumatoid arthritis: Rheumatoid factors and anticitrullinated protein antibodies. *QJM.* 2009;103(3):139–46.
  28. Shrivastava AK, Pandey A. Inflammation and rheumatoid arthritis. *J Physiol Biochem.* 2013;69(2):335–47.
  29. Maibom-Thomsen SL, Trier NH, Holm BE, Hansen KB, Rasmussen MI, Chailyan A, *et al.* Immunoglobulin G structure and rheumatoid factor epitopes. *PLoS One.* 2019;14(6):e0217624.
  30. Trier NH, Holm BE, Hansen PR, Slot O, Loch H, Houen G. Specificity of Anti-Citrullinated Protein Antibodies in Rheumatoid Arthritis. *Antibodies (Basel).* 2019;8(2):37.
  31. Sun M, Rethi B, Krishnamurthy A, Joshua V, Circiumaru A, Hensvold AH, *et al.*

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Anticitrullinated protein antibodies facilitate migration of synovial tissue-derived fibroblasts. *Ann Rheum Dis.* 2019;78(12):1621–31.
32. Malmström V, Catrina AI, Klareskog L. The immunopathogenesis of from triggering to targeting. *Nat Rev Immunol.* 2017;17(1):60–75.
  33. García De Yébenes M, Loza E. Artritis reumatoide: epidemiología e impacto socio-sanitario. *Reumatol Clínica.* 2018;14(2):3–6.
  34. Smolen JS, Aletaha D, McInnes IB. Rheumatoid arthritis. *Lancet.* 2016;388(10055):2023–38.
  35. Abhishek A, Nakafero G, Kuo CF, Mallen C, Zhang W, Grainge MJ, *et al.* Rheumatoid arthritis and excess mortality: Down but not out. A primary care cohort study using data from Clinical Practice Research Datalink. *Rheumatol (United Kingdom).* 2018;57(6):977–81.
  36. Leon L, Abasolo L, Fernandez-Gutierrez B, Jover JA, Hernandez-Garcia C. Direct medical costs and their predictors in the EMAR-II cohort: “Variability in the management of rheumatoid arthritis and spondyloarthritis in Spain.” *Reumatol Clin.* 2018;14(1):4–8.
  37. Ea H-K, Bazille C, Lioté F. Histología y fisiología de la membrana sinovial. *EMC - Apar Locomot.* 2008;41(4):1–6.
  38. Kurowska-Stolarska M, Alivernini S. Synovial tissue macrophages: friend or foe? *RMD Open.* 2017;3(2):e000527.
  39. Iwanaga T, Shikichi M, Kitamura H, Yanase H, Nozawa-Inoue K. Morphology and functional roles of synoviocytes in the joint. *Arch Histol Cytol.* 2000;63(1):17–31.
  40. D. Smith M. The Normal Synovium. *Open Rheumatol J.* 2012;5(1):100–6.
  41. Bartok B, Firestein GS. Fibroblast-like synoviocytes: key effector cells in rheumatoid arthritis. *Immunol Rev.* 2010;233(1):233–55.
  42. Mor A, Abramson SB, Pillinger MH. The fibroblast-like synovial cell in rheumatoid arthritis: A key player in inflammation and joint destruction. *Clin Immunol.* 2005;115(2):118–28.
  43. Bhattaram P, Chandrasekharan U. The joint synovium: A critical determinant of articular cartilage fate in inflammatory joint diseases. *Semin Cell Dev Biol.* 2017;62:86–93.
  44. Lee DM, Weinblatt ME. Rheumatoid arthritis. *Lancet.* 2001;358:903–11.
  45. Neumann E, Lefèvre S, Zimmermann B, Gay S, Müller-Ladner U. Rheumatoid arthritis progression mediated by activated synovial fibroblasts. *Trends Mol Med.* 2010;16(10):458–68.
  46. Choy E. Understanding the dynamics: pathways involved in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Rheumatol.* 2012;51:3–11.
  47. Korb A, Pavenstädt H, Pap T. Cell death in rheumatoid arthritis. *Apoptosis.* 2009;14(4):447–54.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

48. D'Arcy MS. Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell Biol Int*. 2019;43(6):582–92.
49. Vaamonde-García C, López-Armada MJ. Role of mitochondrial dysfunction on rheumatic diseases. *Biochem Pharmacol*. 2019;165:181–95.
50. Kerr J, Wyllie A, Currie A. Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*. 1972;26(4):239–57.
51. Green DR. The Coming Decade of Cell Death Research: Five Riddles. *Cell*. 2019;177(5):1094–107.
52. Galluzzi L, Vitale I, Abrams JM, Alnemri ES, Baehrecke EH, Blagosklonny M V, *et al*. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death Differ*. 2012;19(1):107–20.
53. Nikolettópoulou V, Markaki M, Palikaras K, Tavernarakis N. Crosstalk between apoptosis, necrosis and autophagy. *Biochim Biophys Acta*. 2013;1833(12):3448–59.
54. Galluzzi L, Vitale I, Aaronson SA, Abrams JM, Adam D, Agostinis P, *et al*. Molecular mechanisms of cell death: Recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death Differ*. 2018;25:486–541.
55. Green DR, Llambi F. Cell Death Signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2015;7(12):a006080.
56. Kolba JP, Oguin III TH, Oberstb A, Martineza J. Programmed Cell Death and Inflammation: Winter is Coming. *Trends Immunol*. 2017;38(10):705–18.
57. Denton D, Kumar S. Autophagy-dependent cell death. *Cell Death Differ*. 2019;26:605–16.
58. Boice A, Bouchier-Hayes L. Targeting apoptotic caspases in cancer. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res*. 2020;1867(6):118688.
59. Creagh EM, Conroy H, Martin SJ. Caspase-activation pathways in apoptosis and immunity. *Immunol Rev*. 2003;193:10–21.
60. Van Opdenbosch N, Lamkanfi M. Caspases in cell death, inflammation and disease. *Immunity*. 2019;50(6):1352–64.
61. Movassagh M, Foo RS-Y. Simplified apoptotic cascades. *Heart Fail Rev*. 2008;13(2):111–9.
62. Elmore S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol Pathol*. 2007;35(4):495–516.
63. Bock FJ, Tait SWG. Mitochondria as multifaceted regulators of cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2020;21(2):85–100.
64. Igney FH, Krammer PH. Death and anti-death: Tumour resistance to apoptosis. *Nat Rev Cancer*. 2002;2(4):277–88.
65. Liu J, Wu Y, Wang B, Yuan X, Fang B. High Levels of Glucose Induced the Caspase-3/PARP Signaling Pathway, Leading to Apoptosis in Human Periodontal

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ligament Fibroblasts. *Cell Biochem Biophys*. 2013;66(2):229–37.
66. Sodhi RK, Singh N, Jaggi AS. Poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) and its therapeutic implications. *Vascul Pharmacol*. 2010;53(3–4):77–87.
  67. Malemud CJ. Defective T-Cell Apoptosis and T-Regulatory Cell Dysfunction in Rheumatoid Arthritis. *Cells*. 2018;7(12):223.
  68. Perlman H, Georganas C, Pagliari LJ, Koch AE, Iii KH, Pope RM. Bcl-2 expression in synovial fibroblasts is essential for maintaining mitochondrial homeostasis and cell viability. *J Immunol*. 2000;164:5227–35.
  69. van Loosdregt J, Rossetti M, Spreafico R, Moshref M, Olmer M, Williams GW, et al. Increased autophagy in CD4+ T cells of rheumatoid arthritis patients results in T cell hyperactivation and apoptosis resistance. *Eur J Immunol*. 2017;46(12):2862–70.
  70. Mizushima N, Levine B, Cuervo AM, Klionsky DJ. Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature*. 2009;451(7182):1069–75.
  71. Ranjan A, Iwakuma T. Non-canonical cell death induced by p53. *Int J Mol Sci*. 2016;17(12):2068.
  72. Athamneh K, El Hasasna H, Al Samri H, Attoub S, Arafat K, Benhalilou N, et al. Rhus coriaria increases protein ubiquitination, proteasomal degradation and triggers non-canonical Beclin-1-independent autophagy and apoptotic cell death in colon cancer cells. *Sci Rep*. 2017;7(1):11633.
  73. Glick D, Barth S, Macleod KF. Autophagy: cellular and molecular mechanisms. *J Pathol*. 2010;221(1):3–12.
  74. Saha S, Panigrahi DP, Patil S, Bhutia SK. Autophagy in health and disease: A comprehensive review. *Biomed Pharmacother*. 2018;104:485–95.
  75. Singh SS, Vats S, Chia AY-Q, Tan TZ, Deng S, Ong MS, et al. Dual role of autophagy in hallmarks of cancer. *Oncogene*. 2018;37(9):1142–58.
  76. Galluzzi L, Baehrecke EH, Ballabio A, Boya P, Bravo-San Pedro JM, Cecconi F, et al. Molecular definitions of autophagy and related processes. *EMBO J*. 2017;36(13):1811–36.
  77. Mizushima N. Autophagy: process and function. *Genes Dev*. 2007;21(22):2861–73.
  78. Scarlatti F, Maffei R, Beau I, Codogno P, Ghidoni R. Role of non-canonical Beclin 1-independent autophagy in cell death induced by resveratrol in human breast cancer cells. *Cell Death Differ*. 2008;15(8):1318–29.
  79. Codogno P, Mehrpour M, Proikas-Cezanne T. Canonical and non-canonical autophagy: Variations on a common theme of self-eating? *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2012;13(1):7–12.
  80. Li X, He S, Ma B. Autophagy and autophagy-related proteins in cancer. *Mol Cancer*. 2020;19(1):12.
  81. Xu K, Cai Y, Lu S-M, Li X, Liu L, Li Z, et al. Autophagy induction contributes to the resistance to methotrexate treatment in rheumatoid arthritis fibroblast-like

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- synovial cells through high mobility group box chromosomal protein 1. *Arthritis Res Ther.* 2015;17:374.
82. Kato M, Ospelt C, Gay RE, Gay S, Klein K. Dual Role of Autophagy in Stress-Induced Cell Death in Rheumatoid Arthritis Synovial Fibroblasts. *Arthritis Rheumatol.* 2014;66(1):40–8.
  83. Yin H, Wu H, Chen Y, Zhang J, Zheng M, Chen G, *et al.* The therapeutic and pathogenic role of autophagy in autoimmune diseases. *Front Immunol.* 2018;9:1512.
  84. Dai Y, Hu S. Recent insights into the role of autophagy in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Rheumatology.* 2016;55:403–10.
  85. Li H, Wan A. Apoptosis of rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes: Possible roles of nitric oxide and the thioredoxin 1. *Mediators Inflamm.* 2013;2013:953462.
  86. Zhu L, Wang H, Wu Y, He Z, Qin Y, Shen Q. The autophagy level is increased in the synovial tissues of patients with active rheumatoid arthritis and is correlated with disease severity. *Mediators Inflamm.* 2017;2017:7623145.
  87. Yang R, Zhang Y, Wang L, Hu J, Wen J, Xue L, *et al.* Increased autophagy in fibroblast-like synoviocytes leads to immune enhancement potential in rheumatoid arthritis. *Oncotarget.* 2017;8(9):15420–30.
  88. Chang YP, Ka S-M, Hsu W-H, Chen A, Chao LK, Lin C-C, *et al.* Resveratrol inhibits NLRP3 inflammasome activation by preserving mitochondrial integrity and augmenting autophagy. *J Cell Physiol.* 2015;230(7):1567–79.
  89. Bruyn GA, Tate G, Caeiro F, Maldonado-Cocco J, Westhovens R, Tannenbaum H, *et al.* Everolimus in patients with rheumatoid arthritis receiving concomitant methotrexate: A 3-month, double-blind, randomised, placebo-controlled, parallel-group, proof-of-concept study. *Ann Rheum Dis.* 2008;67(8):1090–5.
  90. Marquez RT, Xu L. Bcl-2:Beclin 1 complex: multiple, mechanisms regulating autophagy/apoptosis toggle switch. *Am J Cancer Res.* 2012;2(2):214–21.
  91. Pattingre S, Tassa A, Qu X, Garuti R, Xiao HL, Mizushima N, *et al.* Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin 1-dependent autophagy. *Cell.* 2005;122(6):927–39.
  92. Mukhopadhyay S, Panda PK, Sinha N, Das DN, Bhutia SK. Autophagy and apoptosis: Where do they meet? *Apoptosis.* 2014;19(4):555–66.
  93. Booth LA, Tavallai S, Hamed HA, Cruickshanks N, Dent P. The role of cell signalling in the crosstalk between autophagy and apoptosis. *Cell Signal.* 2014;26(3):549–55.
  94. Kang R, Zeh HJ, Lotze MT, Tang D. The Beclin 1 network regulates autophagy and apoptosis. *Cell Death Differ.* 2011;18(4):571–80.
  95. Zhu Y, Zhao L, Liu L, Gao P, Tian W, Wang X, *et al.* Beclin 1 cleavage by caspase-3 inactivates autophagy and promotes apoptosis. *Protein Cell.* 2010;1(5):468–77.
  96. Jin Z, Li Y, Pitti R, Lawrence D, Pham VC, Lill JR, *et al.* Cullin3-based polyubiquitination and p62-dependent aggregation of Caspase-8 mediate extrinsic

- apoptosis signaling. *Cell*. 2009;137(4):721–35.
97. Christodoulou C, Choy EH. Joint inflammation and cytokine inhibition in rheumatoid arthritis. *Clin Exp Med*. 2006;6(1):13–9.
  98. Calzado MA, Bacher S, Schmitz ML. NF-kappaB inhibitors for the Treatment of inflammatory diseases and cancer. *Curr Med Chem*. 2007;14(3):367–76.
  99. Liu T, Zhang L, Joo D, Sun S-C. NF-κB signaling in inflammation. *Signal Transduct Target Ther*. 2017;2:e17023.
  100. Li J, Tang R-S, Shi Z, Li J-Q. Nuclear factor-κB in rheumatoid arthritis. *Int J Rheum Dis*. 2020;23(12):1627–35.
  101. Zhang M, Xu-Monette ZY, Li L, Manyam GC, Visco C, Wang J, *et al*. RelA NF-κB subunit activation as a therapeutic target in diffuse large B-cell lymphoma. *Aging (Albany NY)*. 2016;8(12):3321–40.
  102. Brown KD, Claudio E, Siebenlist U. The roles of the classical and alternative nuclear factor-κB pathways: Potential implications for autoimmunity and rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*. 2008;10(4):212.
  103. Mateen S, Zafar A, Moin S, Khan AQ, Zubair S. Understanding the role of cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Clin Chim Acta*. 2016;455:161–71.
  104. Moelants EAV, Mortier A, Van Damme J, Proost P. Regulation of TNF-α with a focus on rheumatoid arthritis. *Immunol Cell Biol*. 2013;91(6):393–401.
  105. Mantovani A, Dinarello CA, Molgora M, Garlanda C. IL-1 and related cytokines in innate and adaptive immunity in health and disease. *Immunity*. 2019;50(4):778–95.
  106. Guo C, Fu R, Wang S, Huang Y, Li X, Zhou M. NLRP3 inflammasome activation contributes to the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Clin Exp Immunol*. 2018;194:231–43.
  107. Smolen JS, Steiner G. Therapeutic strategies for rheumatoid arthritis. *Nat Rev Drug Discov*. 2003;2(6):473–88.
  108. Desai SJ, Prickril B, Rasooly A. Mechanisms of phytonutrient modulation of Cyclooxygenase-2 (COX-2) and inflammation related to cancer. *Nutr Cancer*. 2018;70(3):350–75.
  109. Park JY, Pillinger MH, Abramson SB. Prostaglandin E2 synthesis and secretion: The role of PGE2 synthases. *Clin Immunol*. 2006;119(3):229–40.
  110. Fan HW, Liu GY, Zhao CF, Li XF, Yang XY. Differential expression of COX-2 in osteoarthritis and rheumatoid arthritis. *Genet Mol Res*. 2015;14(4):12872–9.
  111. Gheorghe KR, Thurlings RM, Westman M, Boumans MJ, Trollmo C, Korotkova M, *et al*. Prostaglandin E2 synthesizing enzymes in rheumatoid arthritis B cells and the effects of B cell depleting therapy on enzyme expression. *PLoS One*. 2011;6(1):e16378.
  112. López-Armada MJ, Sánchez-Pernaute O, Largo R, Diez-Ortego I, Palacios I, Egido J, *et al*. Modulation of cell recruitment by anti-inflammatory agents in

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- antigen-induced arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2002;61(11):1027–30.
113. Largo R, Díez-Ortego I, Sanchez-Pernaute O, López-Armada MJ, Alvarez-Soria MA, Egido J, *et al.* EP2/EP4 signalling inhibits monocyte chemoattractant protein-1 production induced by interleukin 1 $\beta$  in synovial fibroblasts. *Ann Rheum Dis.* 2004;63(10):1197–204.
  114. Breedveld FC, Combe B. Understanding emerging treatment paradigms in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther.* 2011;13(1):s3.
  115. Cylwik B, Chrostek L, Gindzienska-Sieskiewicz E, Sierakowski S, Szmitkowski M. Relationship between serum acute-phase proteins and high disease activity in patients with rheumatoid arthritis. *Adv Med Sci.* 2010;55(1):80–5.
  116. Kyoung-Woon K, Bo-Mi K, Hee-Won M, Sang-Heon L, Hae-Rim K. Role of C-reactive protein in osteoclastogenesis in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther.* 2015;17(1):41.
  117. Shafran IH, Shafran IH, Alasti F, Smolen JS, Aletaha D. Implication of baseline levels and early changes of C-reactive protein for subsequent clinical outcomes of patients with rheumatoid arthritis treated with tocilizumab. *Ann Rheum Dis.* 2020;79(7):874–82.
  118. Kelley N, Jeltema D, Duan Y, He Y. The NLRP3 inflammasome: An overview of mechanisms of activation and regulation. *Int J Mol Sci.* 2019;20(13):3328.
  119. Liu Q, Zhang D, Hu D, Zhou X, Zhou Y. The role of mitochondria in NLRP3 inflammasome activation. *Mol Immunol.* 2018;103:115–24.
  120. McCoy SS, Stannard J, Kahlenberg M. Targeting the inflammasome in rheumatic diseases. *Transl Res.* 2016;167(1):125–37.
  121. Walle L Vande, Van Opdenbosch N, Jacques P, Fossoul A, Verheugen E, Vogel P, *et al.* Negative regulation of the NLRP3 inflammasome by A20 protects against arthritis. *Nature.* 2014;512(7512):69–73.
  122. Kolly L, Busso N, Palmer G, Talabot-Ayer D, Chobaz V, So A. Expression and function of the NALP3 inflammasome in rheumatoid synovium. *Immunology.* 2010;129(2):178–85.
  123. Balog E, Biniecka M, Fearon U, Veale DJ, Szekanecz Z. Angiogenesis in inflammatory arthritis. *Isr Med Assoc J.* 2019;21(5):345–52.
  124. Thairu N, Kiriakidis S, Dawson P, Paleolog E. Angiogenesis as a therapeutic target in arthritis in 2011: learning the lessons of the colorectal cancer experience. *Angiogenesis.* 2011;14(3):223–34.
  125. Leblond A, Allanore Y, Avouac J. Targeting synovial neoangiogenesis in rheumatoid arthritis. *Autoimmun Rev.* 2017;16(6):594–601.
  126. Elshabrawy HA, Chen Z, Volin M V, Ravella S, Shahrara S, Medicine O, *et al.* The pathogenic role of angiogenesis in rheumatoid arthritis. *Angiogenesis.* 2015;18(4):433–48.
  127. Apte RS, Chen DS, Ferrara N. VEGF in signaling and disease: Beyond discovery and development. *Cell.* 2020;176(6):1248–64.



## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

128. Zhong-Bin X, Fan-Ru M, Yu-Xuan F, Wu X, Chun-Wang Z, Liu Y, *et al.* Inhibition of NF- $\kappa$ B signaling pathway induces apoptosis and suppresses proliferation and angiogenesis of human fibroblast-like synovial cells in rheumatoid arthritis. *Medicine (Baltimore)*. 2018;97(23):e10920.
129. Paleolog EM. Angiogenesis in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res*. 2002;4(3):81–90.
130. Fiedler U, Augustin HG. Angiopoietins: a link between angiogenesis and inflammation. *Trends Immunol*. 2006;27(12):552–8.
131. Scott BB, Zaratin PF, Gilmartin A, Hansbury M, Colombo A, Belpasso C, *et al.* TNF- $\alpha$  modulates angiopoietin-1 expression in rheumatoid synovial fibroblasts via the NF- $\kappa$ B signalling pathway. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005;328(2):409–14.
132. Nakahira K, Haspel JA, Rathinam VAK, Lee S-J, Lam HC, Englert JA, *et al.* Autophagy proteins regulate innate immune response by inhibiting NALP3 inflammasome-mediated mitochondrial DNA release. *Nat Immunol*. 2011;12(3):222–30.
133. Biasizzo M, Kopitar-Jerala N. Interplay between NLRP3 inflammasome and autophagy. *Front Immunol*. 2020;11:591803.
134. Zhong Z, Umemura A, Sanchez-lopez E, Liang S, Shalapour S, Wong J, *et al.* NF- $\kappa$ B Restricts inflammasome activation via elimination of damaged mitochondria. *Cell*. 2017;164(5):896–910.
135. Zhong Z, Sanchez-Lopez E, Karin M. Autophagy, inflammation and immunity: A troika governing cancer and its treatment. *Cell*. 2016;166(2):288–98.
136. Green DR, Galluzzi L, Kroemer G. Mitochondria and the autophagy-inflammation-cell death axis in organismal aging. *Science*. 2011;333(6046):1109–12.
137. Burmester GR, Pope JE. Targeted treatments for rheumatoid arthritis 2. Novel treatment strategies in rheumatoid arthritis. *Lancet*. 2017;389(10086):2338–48.
138. Croff LJ. Use of NSAIDs in treating patients with arthritis. *Arthritis Res Ther*. 2013;15(3):s2.
139. Bindu S, Mazumder S, Bandyopadhyay U. Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) and organ damage: A current perspective. *Biochem Pharmacol*. 2020;180:114147.
140. Berardicurti O, Ruscitti P, Pavlych V, Giacomelli R, Cipriani P. Glucocorticoids in rheumatoid arthritis: the silent companion in the therapeutic strategy. *Expert Rev Clin Pharmacol*. 2020;13(6):593–604.
141. Thakur S, Riyaz B, Patil A, Kaur A, Kapoor B, Mishra V. Novel drug delivery systems for NSAIDs in management of rheumatoid arthritis: An overview. *Biomed Pharmacother*. 2018;106:1011–23.
142. Wasko MC, Dasgupta A, Sears GI, Fries JF, Ward MM. Prednisone use and risk of mortality in patients with rheumatoid arthritis: Moderation by use of disease-modifying anti-rheumatic drugs. *Arthritis Care Res*. 2016;68(5):706–10.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

143. Hoes JN, Jacobs JW, Buttgerit F, Bijlsma JW. Current view of glucocorticoid co-therapy with DMARDs in rheumatoid arthritis. *Nat Rev Rheumatol*. 2010;6(12):693–702.
144. Smolen JS, Landewé RB, Bijlsma JW, Burmester GR, Dougados M, Kerschbaumer A, *et al*. EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis with synthetic and biological disease-modifying antirheumatic drugs: 2019 update. *Ann Rheum Dis*. 2020;79(6):685–99.
145. Smolen JS, van der Heijde D, MacHold KP, Aletaha D, Landewé R. Proposal for a new nomenclature of disease-modifying antirheumatic drugs. *Ann Rheum Dis*. 2014;73(1):3–5.
146. O’Dell JR. Therapeutic strategies for rheumatoid arthritis. *N Engl J Med*. 2004;350(25):2591–602.
147. Rubbert-Roth A, Szabó MZ, Kedves M, Nagy G, Atzeni F, Sarzi-Puttini P. Failure of anti-TNF treatment in patients with rheumatoid arthritis: The pros and cons of the early use of alternative biological agents. *Autoimmun Rev*. 2019;18(12):102398.
148. Narváez J. Tratamiento de la artritis reumatoide. *Med Clin*. 2016;147(4):176–80.
149. Astorri E, Nerviani A, Bombardieri M, Pitzalis C. Towards a stratified targeted approach with biologic treatments in rheumatoid arthritis: role of synovial pathobiology. *Curr Pharm Des*. 2015;21(17):2216–24.
150. Dudics S, Langan D, Meka RR, Venkatesha SH, Berman BM, Che C-T, *et al*. Natural products for the treatment of autoimmune arthritis: Their mechanisms of action, targeted delivery, and interplay with the host microbiome. *Int J Mol Sci*. 2018;19(9):2508.
151. Harikumar KB, Aggarwal BB. Resveratrol: A multitargeted agent for age-associated chronic diseases. *Cell Cycle*. 2008;7(8):1020–37.
152. Novelle MG, Wahl D, Diéguez C, Bernier M, De Cabo R. Resveratrol supplementation: Where are we now and where should we go? *Ageing Res Rev*. 2015;21:1–15.
153. Renaud S, De Lorgeril M. Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *Lancet*. 1992;339(8808):1523–6.
154. Stervbo U, Vang O, Bonnesen C. A review of the content of the putative chemopreventive phytoalexin resveratrol in red wine. *Food Chem*. 2007;101(2):449–57.
155. Pervaiz S. Resveratrol: from grapevines to mammalian biology. *FASEB J*. 2003;17(14):1975–85.
156. Riveiro-Naveira RR, Valcárcel-Ares MN, Almonte-Becerril M, Vaamonde-García C, Loureiro J, Hermida-Carballo L, *et al*. Resveratrol lowers synovial hyperplasia, inflammatory markers and oxidative damage in an acute antigen-induced arthritis model. *Rheumatol (United Kingdom)*. 2016;55(10):1889–900.
157. Ávila-Gálvez MÁ, García-Villalba R, Martínez-Díaz F, Ocaña-Castillo B, Monedero-Saiz T, Torrecillas-Sánchez A. Metabolic Profiling of Dietary

- Polyphenols and Methylxanthines in Normal and Malignant Mammary Tissues from Breast Cancer Patients. *Mol Nutr Food Res*. 2019;63(9):e1801239.
158. Marques BCAA, Trindade M, Aquino JCF, Cunha AR, Gismondi RO, Neves MF, et al. Beneficial effects of acute trans-resveratrol supplementation in treated hypertensive patients with endothelial dysfunction. *Clin Exp Hypertens*. 2018;40(3):218–23.
  159. Moussa C, Hebron M, Huang X, Ahn J, Rissman RA, Aisen PS, et al. Resveratrol regulates neuro-inflammation and induces adaptive immunity in Alzheimer's disease. *J Neuroinflammation*. 2017;14(1):1–10.
  160. Seyyedebrahimi S, Khodabandehloo H, Nasli EN, Meshkani R. The effects of resveratrol on markers of oxidative stress in patients with type 2 diabetes: a randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial. *Acta Diabetol*. 2018;55(4):341–53.
  161. Ko J-H, Sethi G, Um J-Y, Shanmugam MK, Arfuso F, Kumar AP, et al. The role of resveratrol in cancer therapy. *Int J Mol Sci*. 2017;18(12):2589.
  162. Švajger U, Jeras M. Anti-inflammatory effects of resveratrol and its potential use in therapy of immune-mediated diseases. *Int Rev Immunol*. 2012;31(3):202–22.
  163. Park E-J, Pezzuto JM. The Pharmacology of Resveratrol in Animals and Humans. *Biochim Biophys Acta*. 2015;1852(6):1071–113.
  164. Pannu N, Bhatnagar A. Resveratrol: from enhanced biosynthesis and bioavailability to multitargeting chronic diseases. *Biomed Pharmacother*. 2019;109:2237–51.
  165. Raj P, Lieben Louis X, Thandapilly SJ, Movahed A, Zieroth S, Netticadan T. Potential of resveratrol in the treatment of heart failure. *Life Sci*. 2014;95(2):63–71.
  166. Malaguarnera L. Influence of resveratrol on the immune response. *Nutrients*. 2019;11(5):946.
  167. Kim EN, Lim JH, Kim MY, Ban TH, Jang I-A, Yoon HE, et al. Resveratrol, an Nrf2 activator, ameliorates aging-related progressive renal injury. *Aging (Albany NY)*. 2018;10(1):83–99.
  168. Kulkarni SS, Cantó C. The molecular targets of resveratrol. *Biochim Biophys Acta*. 2015;1852(6):1114–23.
  169. Zhang M, Xue Y, Chen H, Meng L, Chen B, Gong H, et al. Resveratrol inhibits MMP3 and MMP9 expression and secretion by suppressing TLR4/NF- $\kappa$  B/STAT3 activation in Ox-LDL-treated HUVECs. *Oxid Med Cell Longev*. 2019;2019:9013169.
  170. Li W, Ma J, Ma Q, Li B, Han L, Liu J, et al. Resveratrol inhibits the epithelial-mesenchymal transition of pancreatic cancer cells via suppression of the PI-3K/Akt/NF- $\kappa$ B pathway. *Curr Med Chem*. 2013;20(33):4185–94.
  171. Yan C, Li F, Zhang Y, Li Y, Li M, Wang F, et al. Effects of As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> and resveratrol on the proliferation and apoptosis of colon cancer cells and the hERG-mediated potential mechanisms. *Curr Pharm Des*. 2019;25(12):1385–91.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

172. Siedlecka-Kroplewska K, Wozniak M, Kmiec Z. The wine polyphenol resveratrol modulates autophagy and induces apoptosis in MOLT-4 and HL-60 human leukemia cells. *J Physiol Pharmacol*. 2019;70(6):825–38.
173. Qin N, Wei L, Li W, Yang W, Cai L, Qian Z, *et al*. Local intra-articular injection of resveratrol delays cartilage degeneration in C57BL/6 mice by inducing autophagy via AMPK/mTOR pathway. *J Pharmacol Sci*. 2017;134(3):166–74.
174. Park D, Jeong H, Lee MN, Koh A, Kwon O, Yang YR, *et al*. Resveratrol induces autophagy by directly inhibiting mTOR through ATP competition. *Sci Rep*. 2016;6(1):21772.
175. Wang G, Xie X, Yuan lingli, Qiu J, Duan W, Xu B, *et al*. Resveratrol ameliorates rheumatoid arthritis via activation of SIRT1-Nrf2 signaling pathway. *BioFactors*. 2020;46(3):441–53.
176. Elmali N, Baysal O, Harma A, Esenkaya I, Mizrak B. Effects of resveratrol in inflammatory arthritis. *Inflammation*. 2007;30(1–2):1–6.
177. Tian J, Chen JW, Gao JS, Li L, Xie X. Resveratrol inhibits TNF- $\alpha$ -induced IL-1 $\beta$ , MMP-3 production in human rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes via modulation of PI3kinase/Akt pathway. *Rheumatol Int*. 2013;33(7):1829–35.
178. Choudhary N, Bhatt LK, Prabhavalkar KS. Experimental animal models for rheumatoid arthritis. *Immunopharmacol Immunotoxicol*. 2018;40(3):193200.
179. Asquith DL, Miller AM, Mcinnes IB, Liew FY. Animal models of rheumatoid arthritis. *Eur J Immunol*. 2009;39(8):2040–4.
180. Bessis N, Decker P, Assier E, Semerano L, Boissier MC. Arthritis models: usefulness and interpretation. *Semin Immunopathol*. 2017;39(4):469–86.
181. Fischer BD, Adeyemo A, O’Leary ME, Bottaro A. Animal models of rheumatoid pain: experimental systems and insights. *Arthritis Res Ther*. 2017;19(1):146.
182. Brand DD, Latham KA, Rosloniec EF. Collagen-induced arthritis. *Nat Protoc*. 2007;2(5):1269–75.
183. Dumonde DC, Glynn LE. The production of arthritis in rabbits by an immunological reaction to fibrin. *Br J Exp Pathol*. 1962;43(4):373–83.
184. Grötsch B, Bozec A, Schett G. In vivo models of rheumatoid arthritis. *Methods Mol Biol*. 2019;1914:269–80.
185. McNamee K, Williams R, Seed M. Animal models of rheumatoid arthritis: How informative are they? *Eur J Pharmacol*. 2015;759:278–86.
186. Brand DD. Rodent models of rheumatoid arthritis. *Comp Med*. 2005;55(2):114–22.
187. Lens JW, Van den Berg WB, Van de Putte LBA. Flare-up of antigen-induced arthritis in mice after challenge with intravenous antigen: Studies on the characteristics of and mechanisms involved in the reaction. *Clin Exp Immunol*. 1984;55(2):287–94.
188. Jones GW, Hill DG, Sime K, Williams AS. In vivo models for inflammatory arthritis. *Methods Mol Biol*. 2018;1725:101–18.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

189. Lewis BJB, Branch DR. Mouse models of rheumatoid arthritis for studies on immunopathogenesis and preclinical testing of Fc receptor-targeting biologics. *Pharmacology*. 2020;105(11–12):618–29.
190. Alam J, Jantan I, Nasir S, Bukhari A. Rheumatoid arthritis: Recent advances on its etiology, role of cytokines and pharmacotherapy. *Biomed Pharmacother*. 2017;92:615–33.
191. Feng L-J, Jiang T-C, Zhou C-Y, Yu C-L, Shen Y-J, Li J, *et al*. Activated macrophage-like synoviocytes are resistant to endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis in antigen-induced arthritis. *Inflamm Res*. 2014;63(5):335–46.
192. Xu K, Xu P, Yao J-F, Zhang Y-G, Hou W-K, Lu S-M. Reduced apoptosis correlates with enhanced autophagy in synovial tissues of rheumatoid arthritis. *Inflamm Res*. 2013;62(2):229–37.
193. Li S, Chen J-W, Xie X, Tian J, Deng C, Wang J, *et al*. Autophagy inhibitor regulates apoptosis and proliferation of synovial fibroblasts through the inhibition of PI3K/AKT pathway in collagen-induced arthritis rat model. *Am J Transl Res*. 2017;9(5):2065–76.
194. Levine B, Kroemer G. Biological functions of autophagy genes: A disease perspective. *Cell*. 2019;176(1–2):11–42.
195. Noguchi M, Hirata N, Tanaka T, Suizu F, Nakajima H, Chiorini JA. Autophagy as a modulator of cell death machinery. *Cell Death Dis*. 2020;11(7):517.
196. Deretic V, Levine B. Autophagy balances inflammation in innate immunity. *Autophagy*. 2018;14(2):243–51.
197. Karami J, Masoumi M, Khorramdelazad H, Bashiri H, Darvishi P, Sereshki HA, *et al*. Role of autophagy in the pathogenesis of rheumatoid arthritis: Latest evidence and therapeutic approaches. *Life Sci*. 2020;254:117734.
198. Lee H, Kang SW, Byun HS, Jeon J, Park KA, Kang K, *et al*. Brazilin limits inflammatory responses through induction of prosurvival autophagy in rheumatoid fibroblast-like synoviocytes. *PLoS One*. 2015;10(8):e0136122.
199. Yan H, Zhou H, Hu Y, Pham CTN. Suppression of experimental arthritis through AMP-activated protein kinase activation and autophagy modulation. *J Rheum Dis Treat*. 2015;1(1):5.
200. He S-D, Huang S-G, Zhu H-J, Luo X-G, Liao K-H, Zhang J-Y, *et al*. Oridonin suppresses autophagy and survival in rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes. *Pharm Biol*. 2020;58(1):146–51.
201. Vomero M, Manganelli V, Barbati C, Colasanti T, Capozzi A, Finucci A, *et al*. Reduction of autophagy and increase in apoptosis correlates with a favorable clinical outcome in patients with rheumatoid arthritis treated with anti-TNF drugs. *Arthritis Res Ther*. 2019;21(1):39.
202. Ramírez-Garza SL, Laveriano-Santos EP, Marhuenda-Muñoz M, Storniolo CE, Tresserra-Rimbau A, Vallverdú-Queralt A, *et al*. Health effects of resveratrol: Results from human intervention trials. *Nutrients*. 2018;10(12):1892.
203. Athanassiou P, Athanassiou L, Kostoglou-Athanassiou I. Nutritional pearls: Diet

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- and rheumatoid arthritis. *Mediterr J Rheumatol*. 2020;31(3):319–24.
204. Oliviero F, Scanu A, Zamudio-Cuevas Y, Punzi L, Spinella P. Anti-inflammatory effects of polyphenols in arthritis. *J Sci Food Agric*. 2018;98(5):1653–9.
205. Espinoza JL, Trung LQ, Inaoka PT, Yamada K, An DT, Mizuno S, *et al*. The repeated administration of resveratrol has measurable effects on circulating T-cell subsets in humans. *Oxid Med Cell Longev*. 2017;2017:6781872.
206. Singh AP, Singh R, Verma SS, Rai V, Kaschula CH, Maiti P, *et al*. Health benefits of resveratrol: Evidence from clinical studies. *Med Res Rev*. 2019;39(5):1851–91.
207. Reagan-Shaw S, Nihal M, Ahmad N. Dose translation from animal to human studies revisited. *FASEB J*. 2008;22(3):659–61.
208. Xuzhu G, Komai-Koma M, Leung BP, Howe HS, McSharry C, McInnes IB, *et al*. Resveratrol modulates murine collagen-induced arthritis by inhibiting Th17 and B-cell function. *Ann Rheum Dis*. 2012;71(1):129–35.
209. Yang G, Chang C-C, Yang Y, Yuan L, Xu L, Ho C-T, *et al*. Resveratrol alleviates rheumatoid arthritis via reducing ROS and inflammation, inhibiting MAPK signaling pathways, and suppressing angiogenesis. *J Agric Food Chem*. 2018;66(49):12953–60.
210. Correâ MG, Rodrigues Pires P, Vieira Ribeiro F, Peres Pimentel S, Ribeiro Cirano F, Napimoga MH, *et al*. Systemic treatment with resveratrol reduces the progression of experimental periodontitis and arthritis in rats. *PLoS One*. 2018;13(10):e0204414.
211. Selvaraj S, Sun Y, Sukumaran P, Singh BB. Resveratrol-activates autophagic cell death in prostate cancer cells via down regulation of STIM1 and the mTOR pathway. *Mol Carcinog*. 2016;55(5):818–31.
212. Mathew R, Karp C, Beaudoin B, Vuong N, Gelinas G, DiPaola RS, *et al*. Autophagy suppresses tumorigenesis through elimination of p62. *Cell*. 2009;137(6):1062–75.
213. Wang P, Jiang L, Zhou N, Zhou H, Liu H, Zhao W, *et al*. Resveratrol ameliorates autophagic flux to promote functional recovery in rats after spinal cord injury. *Oncotarget*. 2018;9(9):8427–40.
214. Xu K, Liu X, Ke Z, Yao Q, Guo S, Liu C. Resveratrol modulates apoptosis and autophagy induced by high glucose and palmitate in cardiac cells. *Cell Physiol Biochem*. 2018;46(5):2031–40.
215. Yang X, Jiang T, Wang Y, Guo L. The role and mechanism of SIRT1 in resveratrol-regulated osteoblast autophagy in osteoporosis rats. *Sci Rep*. 2019;9(1):18424.
216. Ding S, Jiang J, Zhang G, Bu Y, Zhang G, Zhao X. Resveratrol and caloric restriction prevent hepatic steatosis by regulating SIRT1-autophagy pathway and alleviating endoplasmic reticulum stress in high-fat diet-fed rats. *PLoS One*. 2017;12(8):e0183541.
217. Niso-Santano M, Malik SA, Pietrocola F, Bravo-San Pedro JM, Mariño G, Cianfanelli V, *et al*. Unsaturated fatty acids induce non-canonical autophagy.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- EMBO J. 2015;34(8):1025–41.
218. Martínez J, Cunha LD, Park S, Yang M, Lu Q, Orchard R, *et al.* Noncanonical autophagy inhibits the auto-inflammatory, lupus-like response to dying cells. *Nature*. 2016;533(7601):115–9.
219. Caramés B, Hasegawa A, Taniguchi N, Miyaki S, Blanco FJ, Lotz M. Autophagy activation by rapamycin reduces severity of experimental osteoarthritis. *Ann Rheum Dis*. 2012;71(4):575–81.
220. Cejka D, Hayer S, Niederreiter B, Sieghart W, Fuereder T, Zwerina J, *et al.* Mammalian target of rapamycin signaling is crucial for joint destruction in experimental arthritis and is activated in osteoclasts from patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 2010;62(8):2294–302.
221. Laragione T, Gulko PS. mTOR regulates the invasive properties of synovial fibroblasts in rheumatoid arthritis. *Mol Med*. 2010;16(9–10):352–8.
222. Eriksson P, Wallin P, Sjöwall C. Clinical experience of sirolimus regarding efficacy and safety in systemic Lupus Erythematosus. *Front Pharmacol*. 2019;10(82):1–9.
223. Mariño G, Niso-Santano M, Baehrecke EH, Kroemer G. Self-consumption: the interplay of autophagy and apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2014;15(2):81–94.
224. Dave M, Attur M, Palmer G, Al-Mussawir HE, Kennish L, Patel J, *et al.* The antioxidant resveratrol protects against chondrocyte apoptosis via effects on mitochondrial polarization and ATP production. *Arthritis Rheum*. 2008;58(9):2786–97.
225. Chang Y-C, Liu H-W, Chen Y-T, Chen Y-A, Chen Y-J, Chang S-J. Resveratrol protects muscle cells against palmitate-induced cellular senescence and insulin resistance through ameliorating autophagic flux. *J Food Drug Anal*. 2018;26(3):1066–74.
226. Wu H, Chen L, Zhu F, Han X, Sun L, Chen K. The cytotoxicity effect of resveratrol: Cell cycle arrest and induced apoptosis of breast cancer 4T1 cells. *Toxins (Basel)*. 2019;11(12):731.
227. Lu J, Yang J, Zheng Y, Fang S, Chen X. Resveratrol reduces store-operated - Ca<sup>2+</sup> entry and enhances the apoptosis of fibroblast-like synoviocytes in adjuvant arthritis rats model via targeting ORAI1–STIM1 complex. *Biol Res*. 2019;52(1):45.
228. Zeng G, Zhong F, Li J, Luo S, Zhang P. Resveratrol-mediated reduction of collagen by inhibiting proliferation and producing apoptosis in human hypertrophic scar fibroblasts. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2013;77(12):2389–96.
229. Byun HS, Song JK, Kim YR, Piao L, Won M, Park KA, *et al.* Caspase-8 has an essential role in resveratrol-induced apoptosis of rheumatoid fibroblast-like synoviocytes. *Rheumatology*. 2008;47(3):301–8.
230. Zhang J, Song X, Cao W, Lu J, Wang X, Wang G, *et al.* Autophagy and mitochondrial dysfunction in adjuvant-arthritis rats treatment with resveratrol. *Sci Rep*. 2016;6:32928.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

231. Zhang Y, Wang G, Wang T, Cao W, Zhang L, Chen X. Nrf2-Keap1 pathway-mediated effects of resveratrol on oxidative stress and apoptosis in hydrogen peroxide-treated rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes. *Ann N Y Acad Sci.* 2019;1457(1):166–78.
232. Vaamonde-García C, Riveiro-Naveira RR, Valcárcel-Ares MN, Hermida-Carballo L, Blanco FJ, López-Armada MJ. Mitochondrial dysfunction increases inflammatory responsiveness to cytokines in normal human chondrocytes. *Arthritis Rheum.* 2012;64(9):2927–36.
233. Khojah HM, Ahmed S, Abdel-Rahman MS, Elhakeim EH. Resveratrol as an effective adjuvant therapy in the management of rheumatoid arthritis: a clinical study. *Clin Rheumatol.* 2018;37(8):2035–42.
234. Valcárcel-Ares MN, Riveiro-Naveira RR, Vaamonde-García C, Loureiro J, Hermida-Carballo L, Blanco FJ, *et al.* Mitochondrial dysfunction promotes and aggravates the inflammatory response in normal human synoviocytes. *Rheumatology.* 2014;53(7):1332–43.
235. Wahba MGF, Messiha BAS, Abo-Saif AA. Protective effects of fenofibrate and resveratrol in an aggressive model of rheumatoid arthritis in rats. *Pharm Biol.* 2016;54(9):1705–15.
236. Hosseini H, Koushki M, Khodabandehloo H, Fathi M, Panahi G, Teimouri M, *et al.* The effect of resveratrol supplementation on C-reactive protein (CRP) in type 2 diabetic patients: Results from a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Complement Ther Med.* 2020;49:102251.
237. Sahebkar A, Serban C, Ursoniu S, Wong ND, Muntner P, Graham IM, *et al.* Lack of efficacy of resveratrol on C-reactive protein and selected cardiovascular risk factors — Results from a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Int J Cardiol.* 2015;189:47–55.
238. Liu F-C, Hung L-F, Wu W-L, Chang D-M, Huang C-Y, Lai JH, *et al.* Chondroprotective effects and mechanisms of resveratrol in advanced glycation end products-stimulated chondrocytes. *Arthritis Res Ther.* 2010;12(5):R167.
239. Chen X, Lu J, An M, Ma Z, Zong H, Yang J. Anti-inflammatory effect of resveratrol on adjuvant arthritis rats with abnormal immunological function via the reduction of cyclooxygenase-2 and prostaglandin E2. *Mol Med Rep.* 2014;9:2592–8.
240. Lee J, Kim HR, Quinley C, Kim J, Gonzalez-Navajas J, Xavier R, *et al.* Autophagy suppresses interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) signaling by activation of p62 degradation via lysosomal and proteasomal pathways. *J Biol Chem.* 2012;287(6):4033–40.
241. Choe J-Y, Jung H-Y, Park K-Y, Kim S-K. Enhanced p62 expression through impaired proteasomal degradation is involved in caspase-1 activation in monosodium urate crystal-induced interleukin-1 $\beta$  expression. *Rheumatology.* 2014;53(6):1043–53.
242. Shen J, Xu S, Zhou H, Liu H, Jiang W, Hao J, *et al.* IL-1 $\beta$  induces apoptosis and autophagy via mitochondria pathway in human degenerative nucleus pulposus cells. *Sci Rep.* 2017;7:41067.



## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

243. Wang Y-J, Chen Y-Y, Hsiao C-M, Pan M-H, Wang B-J, Chen Y-C, *et al.* Induction of autophagy by pterostilbene contributes to the prevention of renal fibrosis via attenuating NLRP3 inflammasome activation and epithelial-mesenchymal transition. *Front Cell Dev Biol.* 2020;8:436.
244. Zhang Y, Liu H, Tang W, Qiu Q, Peng J. Resveratrol prevents TNF- $\alpha$ -induced VCAM-1 and ICAM-1 upregulation in endothelial progenitor cells via reduction of NF- $\kappa$ B activation. *J Int Med Res.* 2020;48(9):1–12.
245. Bagul PK, Deepthi N, Sultana R, Banerjee SK. Resveratrol ameliorates cardiac oxidative stress in diabetes through deacetylation of NF $\kappa$ B-p65 and histone 3. Vol. 26, *Journal of Nutritional Biochemistry.* Elsevier B.V.; 2015. 1298–1307 p.
246. Choe J-Y, Lee S-J, Park S-H, Kim S-K. Tacrolimus (FK506) inhibits interleukin-1 $\beta$ -induced angiopoietin-1, Tie-2 receptor, and vascular endothelial growth factor through down-regulation of JNK and p38 pathway in human rheumatoid fibroblast-like synoviocytes. *Jt Bone Spine.* 2012;79(2):137–43.
247. Kasiotis KM, Pratsinis H, Kletsas D, Haroutounian SA. Resveratrol and related stilbenes: Their anti-aging and anti-angiogenic properties. *Food Chem Toxicol.* 2013;61:112–20.
248. Srivani G, Behera SK, Dariya B, Aliya S, Alam A, Nagaraju GP. Resveratrol binds and inhibits transcription factor HIF-1 $\alpha$  in pancreatic cancer. *Exp Cell Res.* 2020;394(1):112126.
249. Yessenkyzy A, Saliev T, Zhanaliyeva M, Masoud A-R, Umbayev B, Sergazy S, *et al.* Polyphenols as caloric-restriction mimetics and autophagy inducers in aging research. *Nutrients.* 2020;12(5):1344.
250. Poudel D, George MD, Baker JF. The impact of obesity on disease activity and treatment response in rheumatoid arthritis. *Curr Rheumatol Rep.* 2020;22(9):56.
251. González-Gay MA, González-Juanatey C. Obesity impairs efficacy of anti-TNF therapy in patients with RA. *Nat Rev Rheumatol.* 2012;8(11):641–2.
252. Kim OY, Chung JY, Song J. Effect of resveratrol on adipokines and myokines involved in fat browning: Perspectives in healthy weight against obesity. *Pharmacol Res.* 2019;148:104411.
253. Wang P, Gao J, Ke W, Wang J, Li D, Liu R, *et al.* Resveratrol reduces obesity in high-fat diet-fed mice via modulating the structure and metabolic function of the gut microbiota. *Free Radic Biol Med.* 2020;156(1):83–98.
254. Sergi C, Chiu B, Feulefack J, Shen F, Chiu B. Usefulness of resveratrol supplementation in decreasing cardiometabolic risk factors comparing subjects with metabolic syndrome and healthy subjects with or without obesity: meta-analysis using multinational, randomised, controlled trials. *Arch Med Sci Atheroscler Dis.* 2020;5:e98–e111.
255. Zhao Y, Chen B, Shen J, Wan L, Zhu Y, Yi T, *et al.* The beneficial effects of quercetin, curcumin, and resveratrol in obesity. *Oxid Med Cell Longev.* 2017;2017:1459497.
256. Parzych KR, Klionsky DJ. An overview of autophagy: Morphology, mechanism, and regulation. *Antioxidants Redox Signal.* 2014;20(3):460–73.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

257. Xu T, Nicolson S, Denton D, Kumar S. Distinct requirements of autophagy-related genes in programmed cell death. *Cell Death Differ.* 2015;22:1792–802.





ANEXOS





**Certificado de capacitación en materia de protección de animais utilizados, criados ou subministrados con fins de experimentación e outros fins científicos, incluíndo a docencia conforme coa Orde ECC/566/2015 de 20 de marzo.**

*Certificado de capacitación en materia de protección de animais utilizados, criados o suministrados con fines de experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia conforme con la Orden ECC/566/2015 de 20 de marzo.*

<b>1. IDENTIFICACIÓN</b>		
1.1. Apelidos / Apellidos / Surname: <b>FERNÁNDEZ RODRÍGUEZ</b>		
1.2. Nome / Nombre / First names: <b>JENNIFER ADRIANA</b>		<b>47371373K</b>
1.3. Categoría/Categoría/Category: <b>“b”</b>	1.4. Especies/Especies/Species: <b>ROEDORES</b>	1.5. Válido ata/ válido hasta/expires: <b>22/10/2027</b>
<b>2. Nº DO CERTIFICADO / Nº DEL CERTIFICADO / CERTIFICATE NUMBER</b>		
<b>B453</b>		
<b>3. ORGANISMO QUE EXPIDE O CERTIFICADO / ORGANISMO QUE EXPIDE EL CERTIFICADO / BODY ISSUING THE CERTIFICATE:</b>		
3.1. Nome e enderezo do organismo que expide o certificado / Nombre y dirección del organismo que expide el certificado / Name and address of the body issuing the certificate:  <b>CONSELLERÍA DO MEDIO RURAL – XUNTA DE GALICIA</b> <b>AXENCIA GALEGA DA CALIDADE ALIMENTARIA</b> Avda. Do Camiño Francés, 10 baixo 15781 Santiago de Compostela A Coruña (España)		
3.2. Teléfono / Teléfono / Telephone: <b>981 546 654</b>	3.3. Fax / Fax / Fax: <b>981 546 651</b>	3.4. Correo electrónico / Correo electrónico / Email: <b>formacion.cmm@xunta.es</b>
3.5. Data / Fecha / Date: <b>20/11/2019</b>	3.6. Lugar / Lugar / Place: <b>Santiago de Compostela</b>	
3.7. Nome e sinatura / Nombre y firma / Name and signature 3.8. Selo / Sello / Stamp  <b>Asdo.: Manuel Rodríguez Vázquez</b> <b>Director da Axencia Galega da Calidade Alimentaria</b> (asinado dixitalmente)		





**Certificado de capacitación en materia de protección de animais utilizados, criados ou subministrados con fins de experimentación e outros fins científicos, incluíndo a docencia conforme coa Orde ECC/566/2015 de 20 de marzo.**

*Certificado de capacitación en materia de protección de animales utilizados, criados o suministrados con fines de experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia conforme con la Orden ECC/566/2015 de 20 de marzo.*

<b>1. IDENTIFICACIÓN</b>		
1.1. Apellidos / <i>Apellidos / Surname:</i> <b>FERNÁNDEZ RODRÍGUEZº</b>		
1.2. Nome / <i>Nombre / First names:</i> <b>JENNIFER ADRIANA</b>		DNI / <i>DNI / Identity card number:</i> <b>47371373K</b>
1.3. Categoría / <i>Categoría / Category:</i> <b>“C”</b>	1.4. Especies / <i>Especies / Species:</i> <b>ROEDORES</b>	1.5. Válido ata / <i>válido hasta / expires:</i> <b>22/10/2027</b>
<b>2. Nº DO CERTIFICADO / Nº DEL CERTIFICADO / CERTIFICATE NUMBER</b>		
<b>C487</b>		
<b>3. ORGANISMO QUE EXPIDE O CERTIFICADO / ORGANISMO QUE EXPIDE EL CERTIFICADO / BODY ISSUING THE CERTIFICATE:</b>		
3.1. Nome e enderezo do organismo que expide o certificado / <i>Nombre y dirección del organismo que expide el certificado / Name and address of the body issuing the certificate:</i>  <b>CONSELLERÍA DO MEDIO RURAL – XUNTA DE GALICIA</b> <b>AXENCIA GALEGA DA CALIDADE ALIMENTARIA</b> Avda. Do Camiño Francés, 10 baixo 15781 Santiago de Compostela A Coruña (España)		
3.2. Teléfono / <i>Teléfono / Telephone:</i> <b>981 546 654</b>	3.3. Fax / <i>Fax / Fax:</i> <b>981 546 651</b>	3.4. Correo electrónico / <i>Correo electrónico / Email:</i> <b>formacion.cmr@xunta.es</b>
3.5. Data / <i>Fecha / Date:</i> <b>20/11/2019</b>	3.6. Lugar / <i>Lugar / Place:</i> <b>Santiago de Compostela</b>	
3.7. Nome e sinatura / <i>Nombre y firma / Name and signature</i>  <b>Asdo.: Manuel Rodríguez Vázquez</b> <b>Director da Axencia Galega da Calidade Alimentaria</b> <b>(asinado dixitalmente)</b>		

Asinado por: RODRIGUEZ VAZQUEZ MANUEL  
 Cargo: Director da Axencia Galega da Calidade  
 Alimentaria, Avda. do Camiño Francés, 10, Baixo  
 Data e hora: 21/11/2019 10:04:50






## CERTIFICADO

D. Alberto Centeno Cortés y D. <sup>a</sup> María Ríos Neira en calidad de presidente y secretaria del Comité Ético de Experimentación Animal (CEEA) de la Xerencia de Xestión Integrada da Coruña (XXIAC) y en virtud de lo dispuesto en el Real Decreto 53/2013 de 1 de febrero, sobre protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos:

### CERTIFICAN:

- Que D. <sup>a</sup> M. <sup>a</sup> José López-Armada ha presentado para su evaluación por el CEEA el proyecto de investigación titulado: “Implicación del factor de transcripción nrf2 en la angiogénesis sinovial de la artritis reumatoide. Efecto de una dieta antioxidante” (código CEEA: P038.2).
- Que una vez evaluado dicho proyecto por todos los miembros del CEEA ha obtenido por unanimidad la valoración de FAVORABLE conforme a la legislación vigente.
- Que la totalidad del proyecto va a realizarse en las instalaciones de la Unidad de Cirugía Experimental – Centro Tecnológico de Formación del CHUAC, inscrita en el Libro de Registro de la Consellería de Agricultura de la Xunta de Galicia como Centro Usuario de Animales de Experimentación con el nº ES150300014801//150002AE.
- Que todos los procedimientos de cuidado, manipulación, quirúrgicos y eutanásicos a los que se someta a los animales, serán realizados por el personal de la Unidad de Cirugía Experimental. Dicho personal está cualificado en todos los grupos profesionales: A, B, C, D1 y D2.

Lo cual firmamos y sellamos en A Coruña a 21 de abril de 2016.

  
D. Alberto Centeno Cortés  
Presidente del CEEA

  
D. <sup>a</sup> María Ríos Neira  
Secretaria del CEEA