

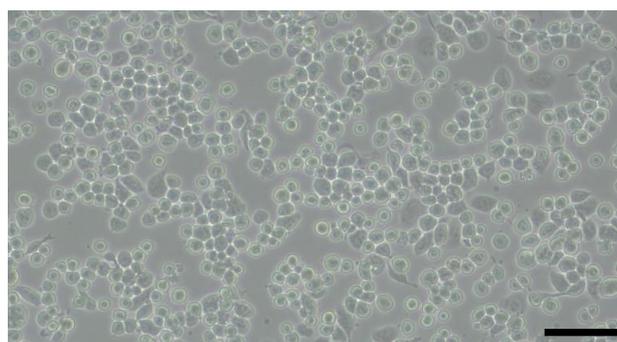
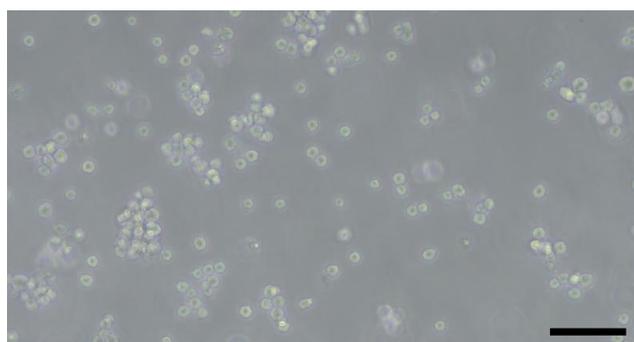
Grado en Biología

Memoria del Trabajo de Fin de Grado

Estudio *in vitro* de la respuesta inflamatoria inducida por lipopolisacárido bacteriano en células mononucleares en la artritis reumatoide

Estudo *in vitro* da resposta inflamatoria inducida por lipopolisacárido bacteriano en células mononucleares na artrite reumatoide

***In vitro* study of inflammatory response induced by bacterial lipopolysaccharide in mononuclear cells in rheumatoid arthritis**



Luis Miguel Lastra Vallines

Curso: 2021-2022. Convocatoria: Junio

*Directores Académicos: Antonio Manuel Castro Castro
María José López Armada*

D. Antonio Manuel Castro Castro, Profesor Titular de Universidad en el Departamento de Biología de la Universidad de A Coruña, y Dña. María José López Armada, Investigadora del INIBIC (Instituto de Investigación Biomédica de A Coruña),

INFORMAN,

Que la Memoria del Trabajo de Fin de Grado titulada "Estudio *in vitro* de la respuesta inflamatoria inducida por lipopolisacárido bacteriano en células mononucleares en la artritis reumatoide" presentada por D. Luis Miguel Lastra Vallines, ha sido realizada bajo nuestra dirección y, considerándola finalizada, autorizamos su presentación y defensa ante el correspondiente tribunal calificador.

Y para que así conste, expedimos el presente informe en A Coruña, a 22 de junio de 2022.

CASTRO
CASTRO
ANTONIO
MANUEL -
DNI
32823383Z

Firmado digitalmente por CASTRO CASTRO ANTONIO MANUEL - DNI 32823383Z
Fecha: 2022.06.22 11:55:32 +02'00'

Fdo. Antonio M. Castro Castro.

LOPEZ
ARMADA
MARIA JOSE
- 08029604M

Firmado digitalmente por LOPEZ ARMADA MARIA JOSE - 08029604M
Fecha: 2022.06.22 12:32:14 +02'00'

Fdo. María José López Armada.

ÍNDICE

RESUMEN/RESUMO/ABSTRACT	I
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. El estrés oxidativo y el envejecimiento.....	1
1.2. La respuesta inflamatoria asociada a la disfunción mitocondrial y al lipopolisacárido bacteriano.....	2
1.3. La artritis reumatoide.....	4
1.4. Tratamiento antioxidante natural.....	6
2. OBJETIVOS	6
3. MATERIAL Y MÉTODOS	6
3.1. Cultivo celular.....	6
3.1.1. Obtención de muestras de cultivo celular.....	6
3.1.2. Contaje de células y cambios de medio de cultivo.....	7
3.1.3. Diferenciación de THP-1 y sembrado de células.....	7
3.1.4. Estimulación celular.....	8
3.2. Estudios de expresión génica.....	8
3.2.1. Extracción y cuantificación de ARNm.....	8
3.2.2. Retrotranscripción de ARNm a ADNc.....	9
3.2.3. PCR a tiempo real (qPCR).....	9
3.3. Análisis estadístico.....	11
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	11
4.1. Diferenciación de los monocitos de la línea celular THP-1 a macrófagos mediada por PMA.....	11
4.2. Efecto del LPS sobre la producción de citoquinas y su modulación por el resveratrol en la línea celular THP-1 monocítica humana.....	12
5. CONCLUSIONES/CONCLUSIÓNS/CONCLUSIONS	19
6. BIBLIOGRAFÍA	20

RESUMEN

La artritis reumatoide (AR) es uno de los trastornos autoinmunes más comunes. Se muestra como una enfermedad crónica, caracterizada por la inflamación del tejido sinovial de las articulaciones, siendo capaz de provocar daños articulares a largo plazo acompañados de dolor. Se puede desencadenar por factores genéticos, epigenéticos o ambientales, teniendo gran influencia el incremento de estrés oxidativo y el propio envejecimiento. Con este trabajo se busca profundizar en el desarrollo de la respuesta inmune que caracteriza la artritis reumatoide, por lo que se empleó la línea celular THP-1 monocítica. Esta es una línea de monocitos de leucemia humana con la que se pueden observar las funciones de los monocitos/macrófagos *in vitro*. Con este fin, se diferenciaron las células THP-1 a macrófagos a través del inductor forbol-12- miristato-13-acetato (PMA). Posteriormente, se comprobó la eficacia del lipopolisacárido bacteriano (LPS) sobre la inducción de la respuesta inflamatoria, utilizándolo como control positivo del estudio piloto. Para ello, se cuantificaron mediante expresión génica los mediadores inflamatorios que forman parte del inflammasoma (NLRP3, Caspasa-1 e IL-1 β) así como la citoquina IL-8, a través de la PCR a tiempo real. También se determinó la posible capacidad de regulación de la respuesta inflamatoria que tiene el resveratrol, un compuesto antiinflamatorio natural.

Palabras clave: Artritis reumatoide, inflamación, línea celular THP-1, lipopolisacárido bacteriano, resveratrol.

RESUMO

A artrite reumatoide (AR) é un dos trastornos autoinmunes máis comúns. Móstrase como unha enfermidade crónica, caracterizada pola inflamación do tecido sinovial das articulacións, sendo capaz de provocar danos articulares a longo prazo acompañados de dor. Pódese desencadear por factores xenéticos, epixenéticos ou ambientais, tendo gran influencia o incremento do estrés oxidativo e o propio envellecemento. Con este traballo búscase profundar no desenvolvemento da resposta inmune que caracteriza a artrite reumatoide, polo que se empregou a liña celular THP-1 monocítica. Esta é unha liña de monocitos de leucemia humana coa que se poden observar as funcións dos monocitos/macrófagos *in vitro*. Con esta finalidade, diferenciáronse as células THP-1 a macrófagos a través do inductor forbol-12- miristato-13- acetato (PMA). Posteriormente, comprobouse a eficacia do lipopolisacárido bacteriano (LPS) sobre a indución da resposta inflamatoria, utilizándoo como control positivo do estudo piloto. Para iso, cuantificáronse mediante expresión xénica os mediadores inflamatorios que forman parte do inflammasoma (NLRP3, Caspasa-1 e IL-1 β) así como a citoquina IL-8, a través da PCR a tempo real. Tamén se determinou a posible capacidade de regulación da resposta inflamatoria que ten o resveratrol, un composto antiinflamatorio natural.

Palabras chave: Artrite reumatoide, inflamación, liña celular THP-1, lipopolisacárido bacteriano, resveratrol.

ABSTRACT

Rheumatoid arthritis (RA) is one of the most common autoimmune disorders. It is a chronic disease characterized by inflammation of the synovial tissue of the joints, capable of causing long-term joint damage accompanied by pain. It can be triggered by genetic,

epigenetic or environmental factors, being the increase of oxidative stress and ageing itself a great influence. In this work, we seek to deepen in the development of the immune response that characterizes rheumatoid arthritis, so the monocytic THP-1 cell line was used. This is a human leukemia monocyte line with which the functions of monocytes/macrophages can be observed *in vitro*. To this end, THP-1 cells were differentiated to macrophages via the inducer phorbol-12- myristate-13-acetate (PMA). Subsequently, the efficacy of bacterial lipopolysaccharide (LPS) on the induction of the inflammatory response was tested by using it as a positive control in the pilot study. For this purpose, the inflammatory mediators that are part of the inflammasome (NLRP3, Caspase-1 and IL-1 β) as well as the cytokine IL-8 were quantified by gene expression through real-time PCR. The possible capacity of resveratrol, a natural anti-inflammatory compound, to regulate the inflammatory response was also determined.

Keywords: Rheumatoid arthritis, inflammation, THP-1 cell line, bacterial lipopolysaccharide, resveratrol.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. El estrés oxidativo y el envejecimiento

La población española, al igual que la del resto de Europa, está envejeciendo (Ramil Gómez, 2020). Esto es debido al aumento de la esperanza de vida en los últimos siglos, como resultado específico de la mejora en la atención sanitaria y en la investigación, principalmente. El proceso de envejecimiento es un proceso dinámico y cronológico, caracterizado por la acumulación gradual de daños en las células, el progresivo deterioro funcional y una mayor vulnerabilidad a las enfermedades (Luo et al., 2020). Se ha postulado que el estrés oxidativo desempeña un papel importante en el ritmo del envejecimiento (De Jaeger, 2018). Este tipo de estrés se define como el desequilibrio existente entre la producción de especies reactivas oxidantes y la capacidad antioxidante que presente el organismo. De esta manera, se supera la capacidad del individuo para neutralizar las especies reactivas y se incrementa su concentración de forma perjudicial (Hernando Espinilla, 2020).

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) (Figura 1) desempeñan un papel crucial en la defensa del organismo y en la señalización de rutas, como la proliferación celular o la apoptosis, siendo necesaria su producción a unos niveles controlados (Liguori et al., 2018; Vaamonde-García y López-Armada, 2019). La célula presenta un sistema de defensa antioxidante formado por enzimas como la catalasa (CAT), superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa (GPx), etc. Estas son enzimas detoxificadoras que catalizan el proceso de conversión de ROS a moléculas menos reactivas (Valcárcel Ares, 2014). Existe una teoría, la teoría del estrés oxidativo del envejecimiento, que postula que las pérdidas funcionales asociadas a la edad se deben a la acumulación de daño oxidativo en las macromoléculas. El mecanismo exacto aún no está claro, pero probablemente el aumento de los niveles de ROS conduzca a la senescencia celular (Hernando Espinilla, 2020).

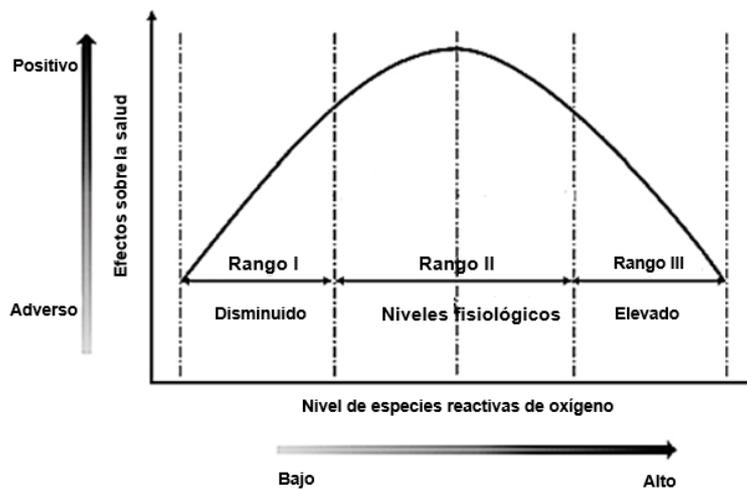


Figura 1. Esquema representativo de los niveles de ROS y su efecto sobre la salud. Dentro de los niveles fisiológicos, las ROS se encuentran en un estado estacionario redox biológico, facilitando el mantenimiento de la homeostasis celular (Rango II). Sin embargo, los niveles de ROS muy bajos (Rango I) o muy altos (Rango III) con respecto al equilibrio dinámico son considerados estados patológicos (Imagen modificada de Luo et al., 2020).

1.2. La respuesta inflamatoria asociada a la disfunción mitocondrial y al lipopolisacárido bacteriano

La inflamación es la respuesta del sistema inmunitario a los estímulos nocivos, como los patógenos, las células dañadas, los compuestos tóxicos o la irradiación. Actúa eliminando los estímulos perjudiciales e iniciando el proceso de curación. Por lo general, durante las respuestas inflamatorias agudas, los eventos e interacciones celulares y moleculares minimizan eficazmente la lesión o infección inminente (Zhang et al., 2019). Sin embargo, la inflamación aguda incontrolada puede volverse crónica, contribuyendo a una variedad de enfermedades inflamatorias crónicas (Chen et al., 2018). A nivel tisular, la inflamación se caracteriza por el enrojecimiento, la hinchazón, el calor, el dolor y la pérdida de la función tisular, que son el resultado de las respuestas locales de las células inmunitarias, vasculares e inflamatorias a la infección o la lesión (Wang et al., 2020).

La disfunción mitocondrial desempeña un papel central en la inflamación, induciendo la síntesis de citoquinas y metaloproteinasas de la matriz extracelular (Blanco y Rego-Pérez, 2018). Esto se ha relacionado con varios escenarios patológicos como las enfermedades degenerativas y agudas, así como el proceso de envejecimiento (Vaamonde-García y López-Armada, 2019). Las mitocondrias dañadas o disfuncionales liberan alarminas o DAMPs (*Damage-Associated Molecular Patterns*). Estas últimas son moléculas endógenas, como las ROS o el ADNmt, reconocidas por el sistema inmunitario y que, posteriormente, desencadenan una respuesta inflamatoria e inmunitaria. Dependiendo de la clase de alerta mitocondrial recibida, se inducen diferentes respuestas innatas (Rongvaux, 2018).

Entre los principales inductores exógenos de la respuesta inflamatoria destaca el lipopolisacárido bacteriano (LPS). Es el principal componente de la membrana externa de la gran mayoría de las bacterias Gram negativa (Gram -). Está formado por una región de polisacáridos u oligosacáridos que se encuentra anclada a la membrana bacteriana externa. La unión entre dicha región y la membrana bacteriana se produce a través de una fracción lipídica de carbohidrato específica denominada lípido A. El componente lípido A es el principal centro inmunoestimulador de los LPS (Figura 2) (Gu et al., 2019; Muñoz-Carrillo et al., 2021).

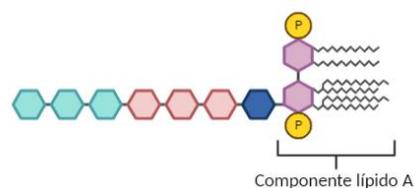


Figura 2: Representación esquemática de la estructura del lipopolisacárido bacteriano (LPS), destacando el principal centro inmunoestimulador, el componente lípido A (Imagen de autoría propia creada con la aplicación BioRender.com).

Las señales de peligro (DAMPs, LPS, etc.) activan rutas de señalización intracelular, principalmente a través de los receptores de membrana TLRs (*Toll-like receptors*), culminando con la activación de factores de transcripción proinflamatorios como el factor nuclear κ B (NF- κ B) o la activación directa del inflammasoma (Geto et al., 2020).

El inflammasoma es un complejo proteico citoplásmico de alto peso molecular, que controla la activación de la caspasa-1 inflamatoria, lo que promueve la maduración de citoquinas como la interleuquina-1 β (IL-1 β) y la IL-18, componentes importantes de la respuesta inflamatoria (Paik et al., 2021). Existen varios inflammasomas, y cada uno de ellos se define por su proteína sensora, PRR (*Pattern Recognition Receptor*) capaz de reaccionar ante

patrones moleculares exógenos asociados a patógenos, PAMPs (*Pathogen-Associated Molecular Patterns*) y DAMPs (Institute for Molecular Bioscience, 2020). De los cinco miembros de la familia de PRRs, destaca el NLRP3 (*Nucleotide-Binding Oligomerization Domain-Like Receptor Pyrin Domain-Containing-3*) por ser uno de los receptores mejor caracterizados y por su relevancia en muchas enfermedades inflamatorias y autoinmunes como la artritis reumatoide (AR). La activación del complejo inflamasoma requiere dos señales (Figura 3) (Biasizzo y Kopitar-Jerala, 2020). Por un lado, en la primera señal, la IL-1 β y el factor de necrosis tumoral (TNF- α) (ambos mediadores proinflamatorios) se unen a proteínas transmembrana. Posteriormente se unen a sus respectivos receptores e inhiben la expresión del inhibidor de NF- κ B (I κ B). De esta forma, NF- κ B se transloca al núcleo y se transcriben los genes proinflamatorios, la pro-IL-1 β (inactiva), la pro-IL-18 (inactiva) y el NLRP3 (Zhong et al., 2016; Fernández-Rodríguez, 2022). Para que la IL-1 β y la IL-18 se activen, se precisa de una segunda señal, producida por agonistas del NLRP3, que forman el complejo del inflamasoma. Este está constituido por la proteína adaptadora ASC (*Apoptosis-Associated Speck-Like Protein Containing a Caspase-Recruitment Domain*), la caspasa-1 inactiva (pro-caspasa) y el propio NLRP3. Los agonistas del NLRP3 pueden provocar daños en la mitocondria, generando entre otros fenómenos la aparición y liberación de ROS y cardiolipina. La liberación de estos compuestos activa el inflamasoma, facilitando el ensamblaje del NLRP3 a través de la proteína adaptadora ASC y la activación de la caspasa-1. Esto estimula la activación y la maduración de las interleuquinas IL-1 β y la IL-18, que serán liberadas al espacio intercelular, desencadenando una respuesta inflamatoria (Green et al., 2011; Fernández-Rodríguez, 2022).

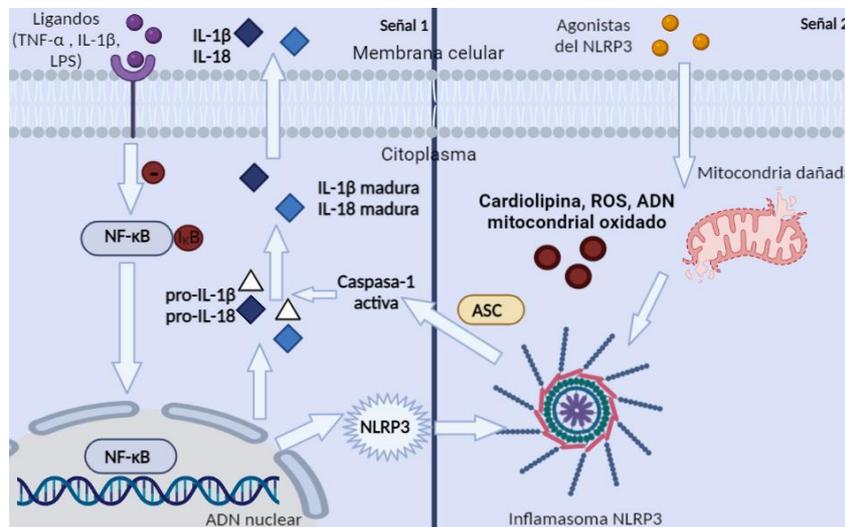


Figura 3. Representación esquemática de las dos señales que intervienen en la activación del inflamasoma y en la producción de la inflamación. La señal 1 (izquierda) da lugar a la activación de NF- κ B y a la transcripción de los genes pro IL-1 β , pro IL-18 y NLRP3. La señal 2 (derecha) permite el ensamblaje del complejo inflamasoma, así como la activación de la caspasa-1 que conduce finalmente a la maduración y liberación de la IL-1 β y la IL-18 que producen la inflamación (Imagen de autoría propia creada con la aplicación BioRender.com).

En la mitocondria, al activarse los TLRs, se induce la formación de más ROS, facilitando de nuevo la activación de los TLRs. Como consecuencia, se genera un bucle de

amplificación de la respuesta inflamatoria inicial, mecanismo que aparece asociado a muchas enfermedades humanas. Esto revela la conexión existente entre la disfunción mitocondrial y las enfermedades inflamatorias crónicas, así como con el proceso del envejecimiento (Vaamonde-García y López-Armada, 2019; Paik et al., 2021). En el caso del LPS, este desencadena la activación del receptor TLR-4, que a su vez activa factores de transcripción como el NF- κ B, provocando la liberación de más mediadores inflamatorios. Por esta razón se emplea como control positivo en los estudios de respuesta inmune (Gu et al., 2019; Muñoz-Carrillo et al., 2021).

1.3. La artritis reumatoide

La artritis reumatoide (AR) es un trastorno sistémico crónico y autoinmune que se manifiesta como una inflamación de las articulaciones sinoviales, lo que conduce a la destrucción y deformidad de las mismas (Yap et al., 2018). Presenta una distribución simétrica, afectando principalmente a las pequeñas articulaciones diartrodiales de manos, pies y rodillas (Valcárcel Ares, 2014). Aunque la AR no es una enfermedad mortal, en general, las complicaciones asociadas a ella, como las enfermedades cardíacas y los problemas respiratorios, pueden disminuir la esperanza de vida (Yap et al., 2018; Scherer et al., 2020). Las manifestaciones clínicas de la artritis reumatoide aparecen entre los 20 y los 40 años, con una prevalencia que oscila entre el 0,4% y el 1,3% de la población (Lin et al., 2020). Es más común en las mujeres que en los hombres, con una proporción de 2-3:1 (Chen et al., 2019).

A pesar de que la etiología de la artritis reumatoide todavía se escapa de su completa comprensión, en los últimos años, se ha hecho evidente que en su desarrollo están implicados factores genéticos y epigenéticos. El medio ambiente también desempeña un papel importante en la evolución de la enfermedad (exposición al humo del tabaco o al polvo) (Scherer et al., 2020). Parece que existe una importante interacción entre los componentes del sistema inmunitario adaptativo y el sistema inmunitario innato (Weyand y Goronzy, 2021). Las células inmunitarias, principalmente las células B, las células T y los macrófagos, desempeñan un papel fundamental en la patogénesis de la AR. Estas células pueden residir en el tejido sinovial o circular en la sangre periférica (Zhang et al., 2019). Las células B segregan proteínas fisiológicamente importantes, como el factor reumatoide (FR), los anticuerpos contra las proteínas citrulinadas (ACPAs) y las citoquinas proinflamatorias que favorecen la AR. Todos estos pueden ser empleados como biomarcadores de la AR (Sanmartí y Gómez-Puerta, 2011). En la AR, la función principal de las células T es activar los macrófagos y los fibroblastos, transformándolos en células destructoras de tejidos (Maeda et al., 2022). Al igual que las células T y B, los macrófagos activados producen una variedad de citoquinas y quimiocinas que favorecen la inflamación en las articulaciones (Nature Video, 2016; Yap et al., 2018).

Durante el progreso de la AR, se produce una alteración en la composición, morfología y función del tejido sinovial. Este es un tejido conjuntivo altamente especializado que recubre el interior de la cápsula articular y produce el líquido sinovial, manteniendo la articulación lubricada (Valcárcel Ares, 2014). En un intento de reforzar la importancia del diagnóstico precoz y de la instauración de un tratamiento farmacológico dirigido lo antes posible, se ha sugerido una clasificación en 4 etapas: fase desencadenante, con individuos genéticamente predispuestos a la AR expuestos a diversos desencadenantes

ambientales; fase de maduración, en individuos sin sinovitis pero positivos para ACPA; fase de focalización, en individuos seropositivos a los ACPA con artralgia; y enfermedad fulminante, caracterizada por una AR establecida (Yap et al., 2018; Fonseca et al., 2019). Las manifestaciones clínicas de las primeras fases de la AR son el edema tisular, la proliferación vascular y la hiperplasia sinovial. Esto ocurre debido a que los linfocitos que se hayan en la membrana sinovial se activan. Como consecuencia, se liberan mediadores proteicos proinflamatorios (citoquinas), que aumentan la respuesta inflamatoria de células residentes del tejido (osteoclastos, sinoviocitos, condrocitos) y reclutan células no residentes (monocitos y macrófagos) desencadenando deterioro articular. En las fases más avanzadas de la AR (AR establecida), aparece una inflamación articular persistente y daños en la articulación provocados por la proliferación de fibroblastos del tejido sinovial, así como por el tráfico de linfocitos T y B, neutrófilos y monocitos hacia la membrana sinovial (Wei et al., 2021; Weyand y Goronzy, 2021). La inflamación también provoca una hipertrofia de la membrana, dando lugar a un tejido anormal denominado *pannus*, que invade y destruye las estructuras articulares locales. Las células del *pannus* de la AR expresan citoquinas proinflamatorias, quimiocinas y metaloproteinasas de matriz que contribuyen a la destrucción progresiva del cartilago y el hueso (Figura 4) (Nucleus Medical Media, 2014; Edilova et al., 2021).

La AR también está relacionada con un incremento en el estrés oxidativo. Este contribuye al inicio y al establecimiento de un entorno proinflamatorio para los pacientes que presenten AR. En condiciones fisiológicas, la producción y la eliminación de ROS debe mantenerse en un equilibrio dinámico. Sin embargo, en condiciones patológicas (Figura 4), estas moléculas, son producidas a gran velocidad por los neutrófilos articulares, los monocitos y los macrófagos, siendo capaces de dañar diferentes estructuras celulares (Fonseca et al., 2019).

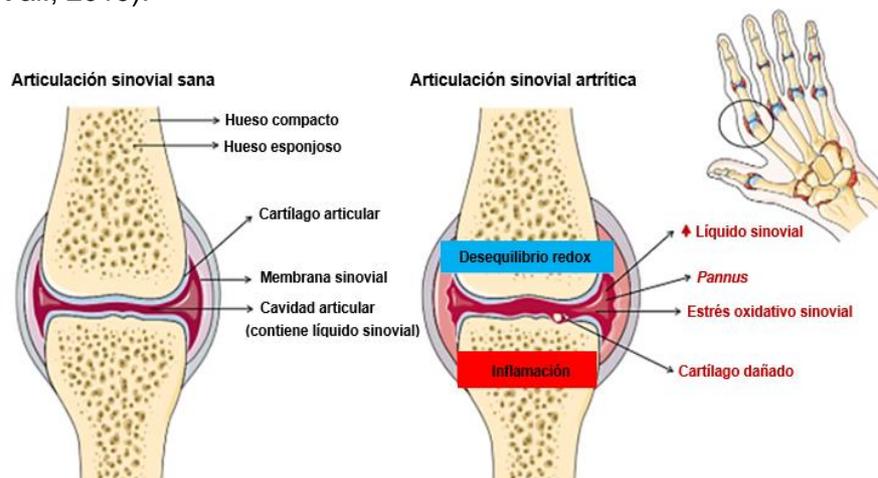


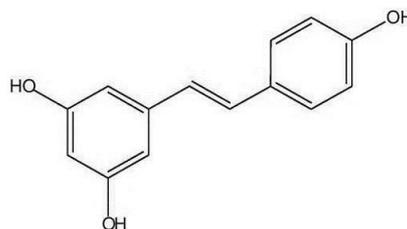
Figura 4. Representación esquemática de las diferencias entre las características de una articulación normal (izquierda) frente a una artrítica (derecha) (Imagen modificada de Fonseca et al., 2019).

Dado que la AR es una enfermedad crónica, los tratamientos se centran en aliviar el dolor, prevenir o limitar el daño articular, mejorar o preservar la función de las articulaciones y optimizar la calidad de vida. Los medicamentos antirreumáticos modificadores de la enfermedad (DMARDs) son actualmente la primera línea de tratamiento de la AR. Funcionan modulando varios aspectos inmunitarios e inflamatorios que causan las

manifestaciones clínicas de la AR. El fármaco antirreumático modificador de la enfermedad (FAME) más utilizado es el metotrexato (MTX) (Guo et al., 2018; Fonseca et al., 2019).

1.4. Tratamiento antioxidante natural

La comunidad científica pone de manifiesto la importancia que presentan ciertos compuestos derivados de las plantas y los hongos, por su capacidad de atenuar los síntomas de la AR y de otras enfermedades inflamatorias. Estos reciben el nombre de antioxidantes naturales, por ser capaces de disminuir los niveles de estrés oxidativo (Castro et al., 2021). Uno de ellos es el resveratrol (trans-3,4',5-trihidroxiestilbeno) (Figura 5), un polifenol natural que aparece en múltiples frutos rojos como los arándanos o las grosellas, así como en los cacahuetes. Su mayor concentración se encuentra en semillas de uvas rojas, o en su principal derivado, el vino tinto (Zimmermann-Franco et al., 2018; Castro et al., 2021).



El resveratrol se puede presentar como isómero cis o trans, siendo este último la forma isomérica más predominante y estable (Truong et al., 2018).

Figura 5. Estructura química del isómero trans-resveratrol (Gambini et al., 2013).

Los estudios clínicos en humanos con resveratrol son reducidos, sin embargo, existe una amplia lista que muestra sus beneficios en estudios *in vitro* y en modelos animales (Zimmermann-Franco et al., 2018; Castro et al., 2021; Chhabra et al., 2021; Fernández-Rodríguez, 2022). Entre los efectos beneficiosos que se mencionan en estos trabajos se encuentra su capacidad antioxidante, cardioprotectora, neuroprotectora, antitumoral y antiinflamatoria.

2. OBJETIVOS

El propósito de este trabajo es profundizar en el desarrollo de la respuesta inmune que caracteriza a la artritis reumatoide. Así, sus principales objetivos son:

- 1) Inducir la respuesta inflamatoria empleando el estímulo positivo lipopolisacárido bacteriano en la línea celular de monocitos THP-1 y valorar la posible respuesta inflamatoria mediante cuantificación de mediadores inflamatorios.
- 2) Evaluar la acción de un tratamiento antiinflamatorio natural (resveratrol) sobre la modulación de la respuesta inflamatoria en la línea celular de monocitos THP-1.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Cultivo celular

La manipulación directa de las células se llevó a cabo bajo condiciones de esterilidad en una campana de cultivo de flujo laminar.

3.1.1. Obtención de muestras de cultivo celular

Para la realización de este trabajo, se ha empleado la línea celular THP-1 monocítica humana (Figura 6). Es una línea comercial que se ha adquirido en la ATTC (*American Type Culture Collection*). Se mantuvo en la estufa a 37°C en un frasco de cultivo de 275 mL con 30 mL del medio de cultivo Roswell Park Memorial Institute (RPMI), enriquecido

con un 10% de suero bovino fetal (SBF) inactivado, 100 U/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomina (Gibco BRL, Paisley, UK).

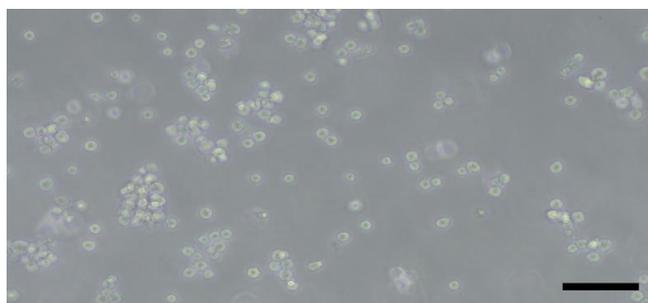


Figura 6. Línea celular THP-1 monocítica humana en suspensión. La imagen fue tomada en un microscopio invertido a una magnificación de 10x. La barra de escala equivale a 100 µm (Imagen de autoría propia).

3.1.2. Contaje de células y cambios de medio de cultivo

Para el correcto desarrollo de los experimentos, hubo un importante proceso de mantenimiento de la línea celular. Se realizaron cambios del medio de cultivo dos días a la semana, manteniendo un volumen de 30 mL en el frasco de cultivo de las THP-1. Una vez a la semana, se llevó a cabo el contaje de células. Para ello, se partió de 1 mL del cultivo de la línea celular. Posteriormente, con ayuda de una pipeta Pasteur, se depositó una gota de la suspensión anterior en una cámara de Neubauer, que es un instrumento empleado para el recuento de células. Una vez hecho el recuento, se realizaron los cálculos para saber que volumen de la suspensión de la línea celular de partida era necesaria para hacer un pase de la misma con una ratio mínima de 2×10^5 células/mL. Este volumen se tomó del frasco de cultivo inicial y se pasó a un tubo falcon, para centrifugarlo durante 5 min a 300 g. El contenido del falcon se depositó en un nuevo frasco de cultivo de 275 mL, añadiendo tanto medio de cultivo como fuese necesario hasta alcanzar los 30 mL.

3.1.3. Diferenciación de THP-1 y sembrado de células

Para la diferenciación de los monocitos (Figura 6) a macrófagos (marcadores específicos de la inflamación) se tomaron 20 mL de volumen de células y se centrifugaron a 300 g durante 5 min en un falcon. Una vez realizada la centrifugación, se decantó el sobrenadante (restos de medio) y se trabajó con el pellet. A este se le aplicaron unos golpes para deshacerlo y posteriormente, se resuspendió en 10 mL de medio, el mismo que se había empleado para el cultivo de las THP-1.

El siguiente paso fue añadir un inductor de la diferenciación de monocitos, el forbol-12-miristato-13-acetato (PMA), a una concentración de 0,5 µM. Una vez realizado esto, se pasó todo el contenido del falcon a un frasco de cultivo de 50 mL y se dejó incubar durante 3 h en la estufa a 37°C. Transcurrido este tiempo, se vertió de nuevo el contenido del frasco de cultivo en un falcon y se centrifugó, repitiendo el proceso anterior.

A continuación, se realizó el contaje de células, con el procedimiento explicado en el apartado 3.1.2. La confluencia buscada fue del 80%, siendo la ratio mínima de 2×10^5 células/mL, y necesitando alcanzar el de 1×10^6 células/mL. Cuando se obtuvo esto, se procedió a la depleción del medio de cultivo, reduciendo la concentración de SBF al 2%.

Este porcentaje tan bajo hace que las células se mantengan en un estado quiescente, cesando la tasa de división celular.

El siguiente paso fue el de sembrado en una placa de 6 pocillos. El número de placas utilizadas depende del número de condiciones experimentales que se vayan a realizar. En este caso se emplearon 3 placas, teniendo un total de $1,2 \times 10^7$ de células. Se tomaron 2 mL del medio deplecionado (volumen de suspensión necesario para contener 1×10^6 células) y se depositaron en cada uno de los pocillos de la placa. Se dejó reposar hasta el día siguiente en la estufa a 37°C .

3.1.4. Estimulación celular

Cuando las células se encontraban diferenciadas y sembradas, se mantuvieron en la estufa durante 24 h, en medio de cultivo deplecionado RPMI 2% de SBF inactivado. En el momento de la estimulación, se retiró todo el medio utilizado para sembrar en las placas. A continuación, se depositó 1 mL por pocillo del mismo medio deplecionado anterior. Finalmente, se emplearon los siguientes tratamientos para estimular la respuesta inflamatoria en las células:

- **BASAL:** Las células de los pocillos correspondientes a la categoría BASAL no son tratadas con ningún tipo de estímulo, actuando como control.
- **LPS:** Las células de los pocillos correspondientes a la categoría LPS son tratadas con lipopolisacárido (LPS), componente de la membrana externa de las bacterias Gram – que desencadena la respuesta inflamatoria. Se utilizó a una concentración de $1 \mu\text{g/mL}$.
- **LPS+Resveratrol:** Las células de los pocillos correspondientes a la categoría LPS+Resveratrol son tratadas con una mezcla de lipopolisacárido bacteriano junto con el antioxidante natural resveratrol. Se utilizó una concentración de LPS de $1 \mu\text{g/mL}$ y una concentración de resveratrol de $50 \mu\text{M}$.

El tiempo de estimulación empleado en los experimentos destinados a los estudios de expresión del ARNm de marcadores inflamatorios (IL-8, IL- 1β , Caspasa-1 y NLRP3) fue de 6, 18 y 24 h.

3.2. Estudios de expresión génica

La expresión génica de los marcadores inflamatorios IL-8, IL- 1β , Caspasa-1 y NLRP3, se analizó mediante PCR a tiempo real. Esta técnica combina la amplificación y la detección en un mismo paso, al correlacionar el producto de PCR obtenido en cada uno de los ciclos con una señal de intensidad de fluorescencia. A continuación, se detalla la técnica empleada.

3.2.1. Extracción y cuantificación de ARNm

El ARN empleado en los experimentos se aisló a partir de las células sembradas en placas de 6 pocillos (1×10^6 células/pocillo). Para la extracción del ARN celular se empleó el reactivo TRIzol Reagent® (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Este es una solución monofásica de fenol y tiocianato de guanidina que permite el lisado celular y la extracción de ARN total mientras que inhibe de forma efectiva la actividad ARNasa. Las células se lavaron 2 veces con suero salino frío y se les añadió $300 \mu\text{L}$ de TRIzol Reagent. Se dejaron 5 min incubando en agitación constante. A continuación, se recogió el homogenado y se depositó en su correspondiente tubo eppendorf, añadiendo $60 \mu\text{L}$ de

cloroformo, lo que permitió la separación en una fase acuosa (donde se encuentra el ARN) y en una fase orgánica. Una vez realizado esto, se centrifugaron los tubos a 12000 g durante 15 min a 4°C. Se recogió la fase acuosa en nuevos tubos, y se provocó la precipitación del ARN mediante la incubación con 150 µL de isopropanol. Se realizó una nueva centrifugación, a 12000 g durante 5 min y a 4°C. Por último, se descartó el sobrenadante y se realizaron 2 lavados del ARN con etanol 70% y etanol 100%. Se dejó secar antes de poder disolver el precipitado en 8 µL de agua libre de ARNasas a 55°C.

La cuantificación de la concentración del ARN obtenido se llevó a cabo empleando el espectrofotómetro *NanoDrop ND-1000* (Thermo Fisher Scientific) midiendo su absorbancia a 260 nm. La pureza de la muestra se determinó a partir de la ratio entre la absorbancia a 260 nm y 280 nm ($A_{260/280}$). Otro indicador de pureza empleado fue la ratio 260/230.

3.2.2. Retrotranscripción de ARNm a ADNc

La retrotranscripción se realizó empleando el *NZY First Strand cDNA Synthesis Kit* (NZYTech), siguiendo las recomendaciones del fabricante. El ADNc se sintetizó a partir de 500 ng de ARN (muestras con tiempos de estimulación de 6 h y 24 h) y de 1 µg de ARN (muestras con tiempo de estimulación de 18 h). Para ello, se preparó la reacción añadiendo 10 µL de tampón 2X (cebadores oligo-dT₁₈, hexámeros al azar, MgCl₂ y desoxinucleótidos trifosfato) y 2 µL de una mezcla enzimática de transcriptasa inversa (ARNasa H) y un inhibidor de ribonucleasa (evitando la degradación del ARN ante una potencial contaminación por ribonucleasas). A continuación, la mezcla de reacción se llevó hasta 20 µL con agua libre de ARNasas y se introdujo en un termociclador. Mediante un programa de incubación durante 30 min a 50°C se produjo la reacción de retrotranscripción. Seguidamente, se calentó la muestra durante 5 min a 85°C para la inactivación de la enzima. Por último, se añadió 1 µL de ARNasa H (*E. coli*) y se incubó durante 20 min a 37°C para degradar las impurezas de ARN tras la síntesis de ADNc (pueden interferir en el proceso de la PCR a tiempo real). Las muestras se almacenaron a -20°C hasta el momento de su utilización.

3.2.3. PCR a tiempo real (qPCR)

Las muestras se sometieron a una PCR a tiempo real empleando LightCycler® 480 Instrument II (Roche, Basilea, Suiza). La reacción se llevó a cabo añadiendo 10 µL de la mezcla de reacción descrita en la Tabla 1 a cada uno de los pocillos que constituyen una placa opaca de PCR de 96 pocillos, específica para el aparato LightCycler® 480.

Tabla 1. Composición de la mezcla de reacción de la qPCR. Los cebadores se utilizaron a una concentración final de 0,7 µM cada uno, y la solución madre de estos cebadores estaba a una concentración de 20 µM (Tabla de autoría propia).

Componentes de la mezcla de reacción de la qPCR	Volumen (µL)
Mezcla de reacción para sondas UPL 2X (<i>LightCycler® 480 Probes Master</i>)	5,00
Cebador sentido	0,35
Cebador antisentido	0,35
Sonda UPL	0,10
Agua libre de ARNasas	2,20
ADNc	2,00

Para la realización de la qPCR, se emplearon las sondas UPL (*Universal Probe Library*; Roche). Estas son sondas fluorescentes de tipo TaqMan de 8 o 9 nucleótidos de longitud. Poseen dos fluoróforos, un reportero unido al extremo 5' y un apagador (*quencher*) en el extremo 3' que evita la emisión de fluorescencia por parte del fluoróforo. De esta forma, cuando la sonda está intacta, la fluorescencia del reportero es suprimida casi por completo por el *quencher*. Cuando la sonda se hibrida con su secuencia de ADN diana del gen de interés, se escinde por la actividad exonucleasa 5'-3' de la Taq polimerasa, eliminando uno de los extremos y alejando el *quencher* del reportero. De esta manera se produce la emisión de fluorescencia.

Una vez que la placa se encontraba cargada adecuadamente, se realizó la qPCR, siguiendo el protocolo de amplificación detallado en la Tabla 2:

Tabla 2. Protocolo de amplificación empleado para realizar la qPCR con sondas UPL (Tabla de autoría propia).

Ciclos	Temperatura	Duración	Etapas
1	95°C	10 min	Pre-incubación Activación de la FastStart Taq ADN Polimerasa
50	95°C	10 s	Amplificación Desnaturalización de las dobles cadenas de ADN
	60°C	30 s	Alineamiento de los cebadores con su secuencia complementaria del ADN de cadena sencilla
	72°C	1 s	Elongación o síntesis de la nueva cadena de ADN
1	40°C	20 s	Enfriamiento

Los cebadores específicos para los genes validados por este método, junto con la sonda correspondiente a cada par de oligos fueron diseñados utilizando la herramienta informática "*Universal Probe Library Assay Design Center*" (https://lifescience.roche.com/en_es.html; Roche). El diseño fue optimizado para longitudes comprendidas entre los 20 y 26 nucleótidos (nt) y unas temperaturas de anillamiento de 59-60°C, con un contenido en guanina/citosina de aproximadamente 50% y una longitud de amplicón no superior a 120 nt.

La relación de los genes analizados se expone en la Tabla 3, así como los cebadores y las sondas UPL utilizados. La expresión génica de cada uno de ellos se normalizó tomando como gen de referencia el TBP (*TATA-binding protein*), puesto que no se modula bajo ninguna de las condiciones estudiadas. Cada muestra se amplificó por duplicado, expresando los resultados finales como la ratio de incremento respecto a la condición basal (normalizado a 1).

Tabla 3. Lista de cebadores y sondas empleadas para la obtención de los productos de amplificación de interés (Tabla de autoría propia).

Gen diana	Descripción	Cebadores (sentido y antisentido) 5'-3'		Sonda UPL
IL8	Interleuquina-8	S	GCCCATAGTGATCTTTGCAGT	#72
		A	ATGGTTCCTTCCGGTGGT	
IL1 β	Interleuquina-1 beta	S	TACCTGTCCTGCGTGTTGAA	#78
		A	TCTTTGGGTAATTTTTGGGATCT	
CASP1	Caspasa-1, una cisteína peptidasa relacionada con la apoptosis	S	CCAGGACATTAATAAATAAGGAAACTGT	#4
		A	CCAAAACCTTTACAGAAGGATCTC	
NLRP3	Criopirina	S	CACGTGTTTCGAATCCCACT	#72
		A	AACCCATCCACTCCTCTTCA	
TBP	Proteína de unión a TATA	S	GCCCATAGTGATCTTTGCAGT	#67
		A	CGCTGGAACCTCGTCTCACTA	

3.3. Análisis estadístico

Se realizó un análisis descriptivo de los datos obtenidos, calculando la media de las réplicas, la desviación típica y el error típico. Los resultados se expresan en gráficos de barras, incluyendo las barras de error cuya longitud hace referencia al error estándar de la media. No se ha realizado un análisis inferencial estadístico debido al bajo tamaño muestral.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Diferenciación de los monocitos de la línea celular THP-1 a macrófagos mediada por PMA

La diferenciación a macrófagos de las células monocíticas se llevó a cabo empleando el forbol-12- miristato-13-acetato (PMA), a una concentración de 0,5 μ M (Figura 7A). Esta concentración está consensuada en la literatura científica, para que no pueda regular al alza las expresiones de algunos genes en los macrófagos diferenciados. Si esto ocurriese, anularía los aumentos de expresión génica inducidos por otros estímulos, imposibilitando continuar con el estudio u ofreciendo unos resultados alejados de la realidad (Daigneault et al., 2010; Chanput et al., 2014; Feuerer et al., 2022). Una vez transcurridas 3 h de tratamiento con PMA en la estufa a 37°C, los monocitos se diferencian a macrófagos, un tipo celular clave en la respuesta inflamatoria (Figuras 7B y 7C). Posteriormente, los macrófagos bajo la influencia del estímulo proinflamatorio LPS se vuelven altamente especializados, con un fenotipo y función determinada.

A pesar de que para este estudio se haya empleado el inductor de la diferenciación PMA, existen otros tratamientos diferentes como la 25-dihidroxitamina D3 (vD3) o el factor estimulante de colonias (M-CSF), siendo el más estandarizado el PMA (Chanput et al., 2014).

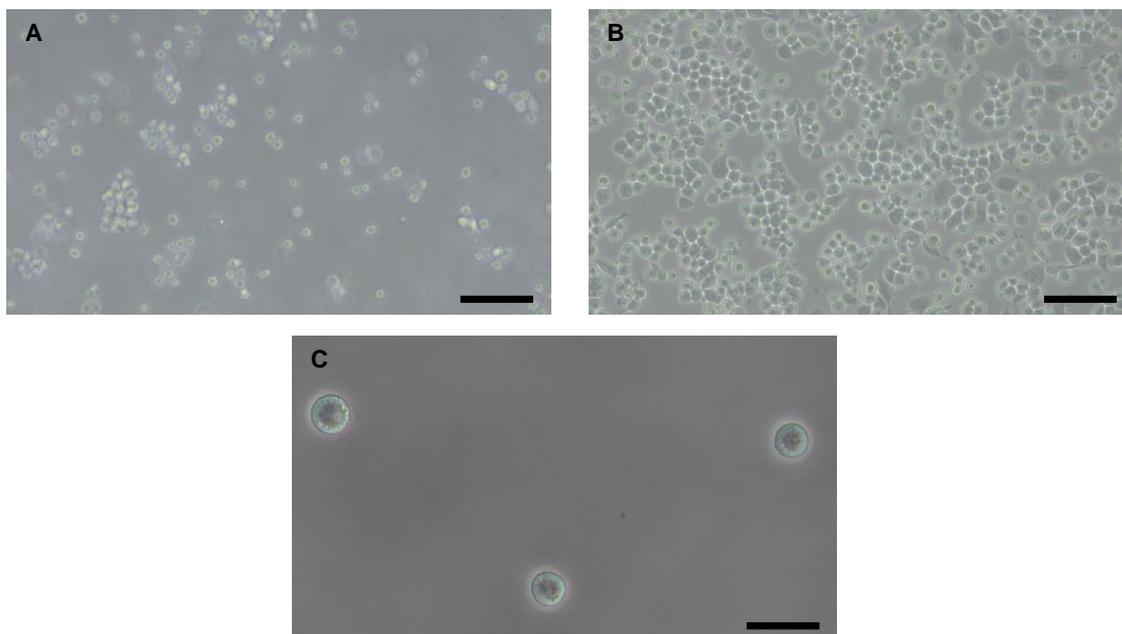


Figura 7. Inducción de la diferenciación en la línea celular THP-1 monocítica humana a macrófagos mediada por PMA. Las imágenes fueron tomadas en un microscopio invertido a una magnificación de 10x (A y B) y de 40x (C). La barra de escala equivale a 100 μm . (A) Línea celular THP-1 en suspensión. (B) Macrófagos diferenciados a partir de la línea celular THP-1. (C) Representación en detalle de los macrófagos diferenciados a partir de la línea celular THP-1 (Imágenes de autoría propia).

Si se comparan citológicamente los macrófagos diferenciados por PMA con los monocitos, se pueden apreciar diferencias claras, atendiendo a características morfológicas y de adhesión. La más notable fue el incremento del tamaño de las células tratadas con PMA (Figuras 7A y 7B). Se observó una reducción en la relación núcleo-citoplasma, debido a un aumento del volumen citoplasmático en las células diferenciadas. Como se esperaba, los macrófagos derivados de monocitos humanos aumentaron su volumen citoplasmático en comparación con los monocitos (Figura 7C). Por otra parte, también se apreció un aumento de la adhesencia de las células. Las THP-1 sin tratar presentaban un crecimiento en suspensión, sin adhesión, mientras que en las tratadas ocurría todo lo contrario. Estas mostraron un crecimiento en monocapa, estableciéndose una adhesión firme al frasco de cultivo. Estas diferencias también fueron observadas en otros estudios, obteniéndose los mismos resultados (Daigneault et al., 2010; Chanput et al., 2014; Feuerer et al., 2022).

Las diferencias expuestas tienen un carácter visual, puesto que para describirlas se ha empleado únicamente el microscopio invertido. Si se quisiesen explicar otras diferencias como la granularidad celular, o profundizar más en la morfología, sería necesario el empleo de técnicas como la citometría de flujo (Daigneault et al., 2010), no siendo este el objetivo del trabajo.

4.2. Efecto del LPS sobre la producción de citoquinas y su modulación por el resveratrol en la línea celular THP-1 monocítica humana

La expresión génica de citoquinas proinflamatorias (IL-1 β , IL-8) y de mediadores inflamatorios (Caspasa-1 y NLRP3) fue analizada en células THP-1 diferenciadas a macrófagos, para los tiempos de 6 h, 18 h y 24 h. Los resultados se expresaron como la media de dos réplicas por tratamiento junto con la barra de error. En el análisis, los niveles

de expresión de ARNm de los genes de las citoquinas y de los mediadores inflamatorios se determinaron por una qPCR. Para ello fue necesario estimular las células en tres condiciones diferentes: Basal, LPS (1 µg/mL) y LPS+Resveratrol (1 µg/mL y 50 µM, respectivamente), posteriormente extraer el ARNm y realizar una retrotranscripción. La condición Basal actúa de control, puesto que las células no son tratadas con ningún estímulo. De esta forma, en los resultados de la qPCR, se podrá apreciar el incremento relativo de la expresión de ARNm de los diferentes mediadores al ser estimulados, tomando el control como referencia. La condición LPS actúa como control positivo, puesto que induce en las células la respuesta inflamatoria, siendo este uno de los objetivos del estudio, observándose que aumenta la expresión de ARNm de los diferentes mediadores inflamatorios (Figuras 8, 9 y 10). La condición LPS+Resveratrol tiene como función determinar si el compuesto antioxidante y antiinflamatorio resveratrol es capaz de modular la respuesta inmune desencadenada por el estímulo positivo LPS. Este sería otro de los objetivos del estudio, apreciándose una disminución clara en la expresión de ARNm de los mediadores (Figuras 8, 9 y 10).

Cuando se tratan las células con LPS durante 6 h, se confirma que este actúa como control positivo, induciendo la respuesta inflamatoria de los macrófagos (Figura 8). Si se compara la condición LPS en los diferentes mediadores con el Basal normalizado a 1, se observa un claro incremento de la expresión de ARNm de todos los genes inflamatorios evaluados. En este caso, se puede apreciar como las mayores expresiones de ARNm corresponden con la citoquina IL-1β (Figura 8A) y la IL-8 (Figura 8D), y las menores expresiones se corresponden con la Caspasa-1 (Figura 8B) y el NLRP3 (Figura 8C). Estos resultados son esperables, puesto que la liberación de las citoquinas (IL-1β y IL-8, en este caso) constituye la primera barrera inflamatoria de defensa del organismo, siendo estas mismas capaces de viajar a otras células (de los macrófagos a células dendríticas, fibroblastos, etc.) e inducir la liberación de más citoquinas. Es probable que la mayor expresión de la IL-1β en comparación con los otros mediadores esté relacionado con la ruta de activación del inflammasoma NLRP3 (Figura 3, señal 1). La liberación inicial de la IL-1β induce la activación de TLRs específicos de la membrana de los macrófagos, los cuales, por la ruta explicada en la Figura 3 activan la expresión del inflammasoma NLRP3. Este participa en la activación de la Caspasa-1, y ambos van a originar la forma madura de la IL-1β, liberándose al exterior de la célula. Así, esta podría ser una de las razones por las que los mayores niveles de expresión de ARNm se aprecian en la IL-1β y los menores en la Caspasa-1 y el NLRP3.

Cuando las células se estimulan durante 18 h y 24 h con el tratamiento LPS (Figuras 9 y 10), se observa el mismo patrón de expresión de ARNm de los marcadores inflamatorios que el descrito previamente para las 6 h. De esta manera, la IL-1β (Figuras 9A y 10A) y la IL-8 (Figuras 9D y 10D) son las que presentan mayores niveles de expresión, mientras que la Caspasa-1 (Figuras 9B y 10B) y el NLRP3 (Figuras 9C y 10C) tienen una expresión menor. Para cualquiera de los tres tiempos (Figuras 8, 9 y 10), el tamaño del error estándar de IL-1β e IL-8 es pequeño, lo que quiere decir que, a pesar de tener un tamaño muestral bajo, no existe mucha variabilidad entre los datos. En cambio, el tamaño del error estándar es mayor en la expresión del marcador Caspasa-1 (Figuras 8B, 9B) para las 6 h y 18 h. Esto también ocurre con el marcador NLRP3 para cualquiera de los tres tiempos (Figuras

8C, 9C y 10C), lo que indica que la dispersión en los valores obtenidos es mayor, pero no tiene por qué estar relacionado con la menor expresión de ARNm de estos marcadores.

En el caso del resveratrol, las células que se encuentran bajo la acción de la combinación de este estímulo con el LPS son capaces de reducir la respuesta inflamatoria que se desencadena. Este tratamiento sólo fue aplicado para los períodos de 6 h y 18 h (Figuras 8 y 9), por ser los tiempos en los que mejores resultados se obtenían. *A priori*, no parece que este tratamiento tenga una mayor influencia sobre unos mediadores u otros, no siendo específico de ninguno de ellos (reduce en todos menos del 50 % de la respuesta inmune desencadenada por el LPS). El efecto del resveratrol es relativamente proporcional al nivel de inflamación que se produce, siendo este más apreciable cuanto mayor sea el grado de la inflamación. Si se compara la disminución de la expresión de la IL-1 β (Figuras 8A y 9A) y la IL-8 (Figuras 8D y 9D) con la Caspasa-1 (Figuras 8B y 9B) y el NLRP3 (Figuras 8C y 9C), tanto en 6 h como en 18 h, se puede observar que esta ocurre en una ligera mayor proporción en la IL-1 β y en la IL-8. De todas formas, debido a que el tamaño muestral es reducido, no se puede asumir que este patrón de disminución se cumpla para otras observaciones con otros tiempos diferentes. Al igual que ocurría en el caso anterior, para cualquiera de los dos tiempos (Figuras 8 y 9), el error estándar es pequeño, siendo este mayor en la Caspasa-1 (Figuras 8B y 9B) y en el NLRP3 (Figuras 8C y 9C).

Resultados similares a los obtenidos aparecen en los estudios de Jiang et al. (2016) y Feuerer et al. (2022), en los cuales también emplean el LPS como control positivo de la inflamación y hacen uso de otros estímulos proinflamatorios como el IFN- γ o el TNF- α . Como agente que regula la respuesta inflamatoria también emplean el resveratrol, entre otros moduladores.

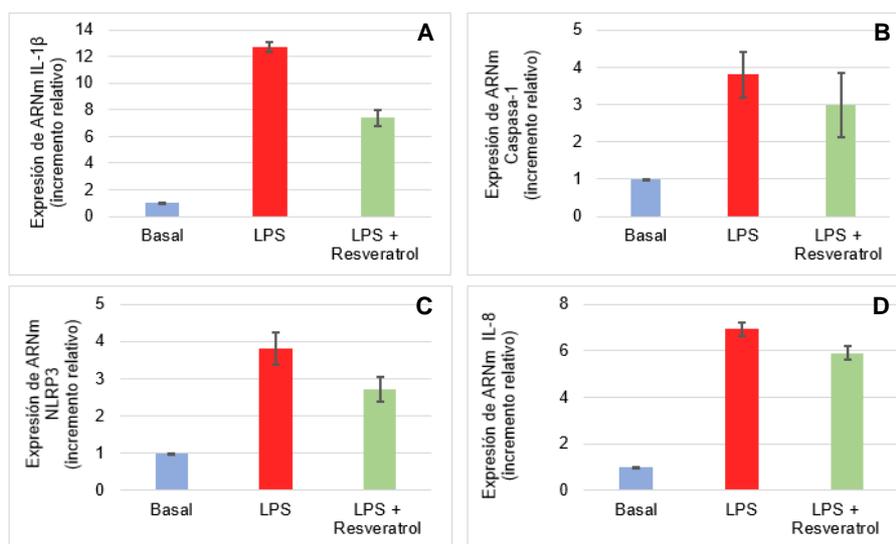


Figura 8. Expresión de ARNm de los distintos marcadores inflamatorios tras 6 h expuestos a las condiciones Basal, LPS y LPS+Resveratrol. La expresión de ARNm se muestra como un incremento relativo de la de la IL-1 β (A), de la Caspasa-1 (B), del NLRP3 (C) y de la IL-8 (D) ante los estímulos LPS y LPS+Resveratrol frente al Basal (Gráficos de autoría propia).

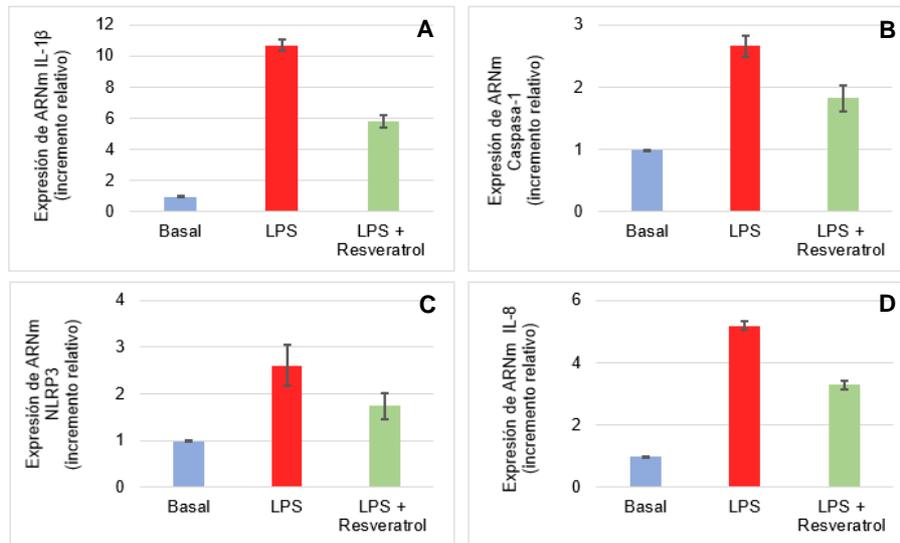


Figura 9. Expresión de ARNm de los distintos marcadores inflamatorios tras 18 h expuestos a las condiciones Basal, LPS y LPS+Resveratrol. La expresión de ARNm se muestra como un incremento relativo de la de la IL-1 β (A), de la Caspasa-1 (B), del NLRP3 (C) y de la IL-8 (D) ante los estímulos LPS y LPS+Resveratrol frente al Basal (Gráficos de autoría propia).

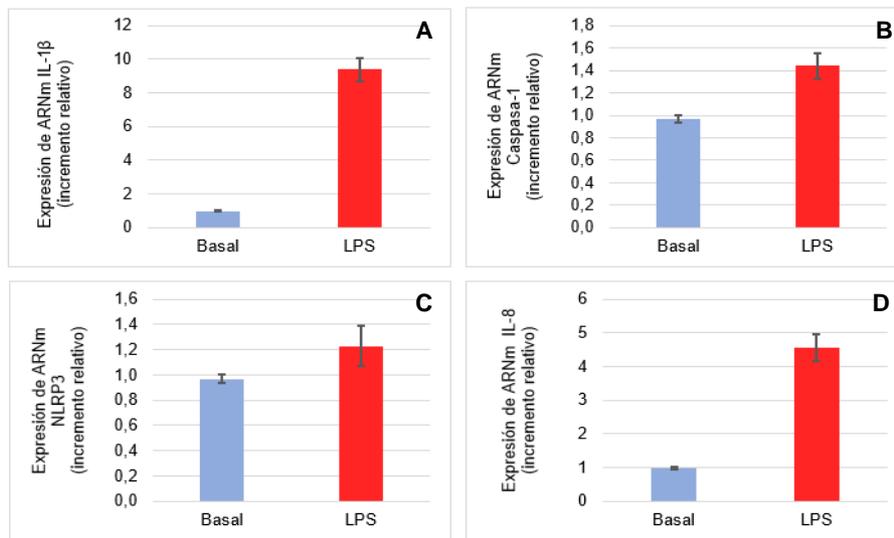


Figura 10. Expresión de ARNm de los distintos marcadores inflamatorios tras 24 h expuestos a las condiciones Basal y LPS. La expresión de ARNm se muestra como un incremento relativo de la de la IL-1 β (A), de la Caspasa-1 (B), del NLRP3 (C) y de la IL-8 (D) ante el estímulo LPS frente al Basal (Gráficos de autoría propia).

A pesar de que, para los tres tiempos, el LPS actúe como control positivo aumentando los niveles de expresión de ARNm de los diferentes marcadores inflamatorios, este no lo hace de la misma forma. Haciendo una representación gráfica en la que se tenga en cuenta la variación con respecto al tiempo, se puede apreciar cómo, a media que pasan las horas, la respuesta inflamatoria que se produce es menor, para cualquiera de los cuatro marcadores (Figura 11). *A priori*, parecería lógico que, cuanto más tiempo estuviesen las células bajo la influencia del estímulo inflamatorio, mayor expresión de los marcadores de la inflamación habría, pero no es así. Esto puede deberse a varias causas. Una de ellas podría ser que, a partir de un momento dado, en las células se activen mecanismos de

protección ante el LPS y de regulación de la inflamación, que hacen que se reduzca la expresión de los mediadores inflamatorios, al reducir la capacidad inflamatoria del LPS. Por otra parte, la propia capacidad del LPS de desencadenar la respuesta inflamatoria a una concentración de 1 µg/mL, se puede ver comprometida con el paso del tiempo, teniendo por lo tanto una actividad mayor a bajos tiempos de estimulación. En el gráfico de barras (Figura 11) se puede observar que, al igual que en los casos anteriores, los mayores niveles de expresión de ARNm son los de la IL-1β y la IL-8, respectivamente (Figuras 11A, 11D), mientras que los menores son los de la Caspasa-1 y el NLRP3 (Figuras 11B, 11C), existiendo un solapamiento de estos dos últimos (valores de expresión muy próximos). Este solapamiento puede deberse a que ambos marcadores de la inflamación están involucrados en la maduración y liberación de la IL-1β, observándose valores de expresión muy similares. En lo que respecta al resveratrol (Figura 11), la actividad antioxidante del mismo también disminuye, en consonancia con la respuesta inflamatoria inducida por el LPS, como se explicaba en los gráficos anteriores.

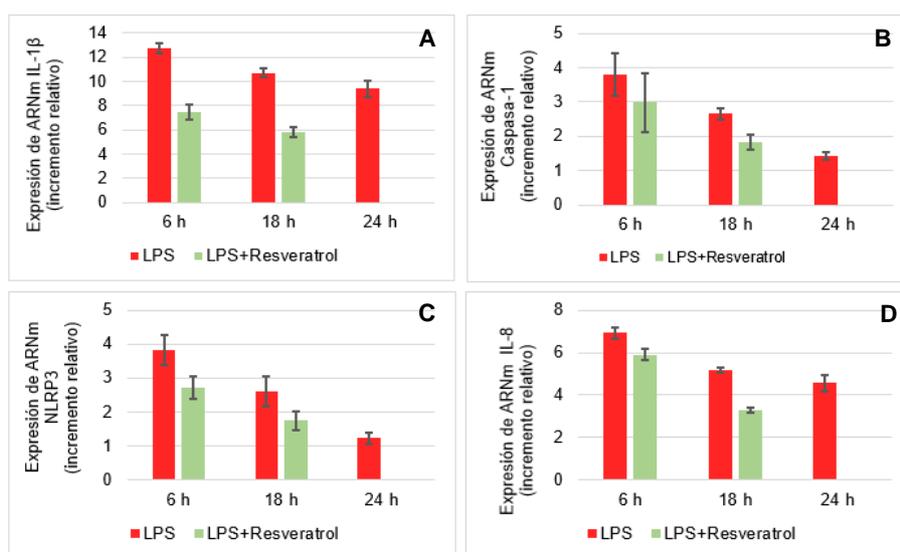


Figura 11. Variación temporal de la expresión de ARNm de cada uno de los distintos marcadores inflamatorios en 6 h, 18 h y 24 h al ser expuestos a las condiciones Basal, LPS y LPS+Resveratrol. Se muestra como varía la expresión de ARNm de la IL-1β (A), de la Caspasa-1 (B), del NLRP3 (C) y de la IL-8 (D) a lo largo de los tiempos indicados (Gráficos de autoría propia).

Con estos resultados se corroboró que la línea celular THP-1 monocítica humana producía una respuesta positiva ante un estímulo proinflamatorio, el LPS. También se observó como el resveratrol era capaz de modular la respuesta inflamatoria, reduciendo los niveles de los mediadores inflamatorios IL-8, IL-1β, Caspasa-1 y NLRP3 que son los que intervienen en la respuesta inmune que caracteriza a la AR.

La AR es uno de los trastornos inflamatorios crónicos más comunes. Se caracteriza por una poliartritis simétrica y erosiva, resultante de una sinovitis crónica, es decir, una inflamación de la membrana sinovial. Esta va a ser impulsada por la infiltración de células inmunitarias, incluidas las células de la inmunidad innata y adaptativa. A su vez, la inflamación conduce a la proliferación de las células estromales residentes en la sinovia (sinoviocitos), lo que provoca el engrosamiento de la capa íntima, acompañado del crecimiento de nuevos vasos sanguíneos (Yap et al., 2018; Fernández-Rodríguez, 2022). Estos van a facilitar la perpetuación de la respuesta inflamatoria mediante la entrada de

más células inflamatorias procedentes de la circulación sistémica. Los procesos descritos son mecanismos patogénicos bien establecidos de la AR. En los últimos años, se han acumulado amplios conocimientos sobre los mediadores celulares y moleculares implicados (algunos se representan en las figuras 8, 9, 10, 11), lo que ha permitido el desarrollo de tratamientos muy específicos (Ait Eldjoudi et al., 2022). Estos se dirigen, por ejemplo, contra mediadores solubles como el TNF- α , la IL-6, la IL-8, la IL-1 β , células inmunitarias como los linfocitos B, moléculas coestimuladoras y, más recientemente, vías de señalización intracelular (como la explicada en la Figura 3). Estas terapias biológicas (tratamientos de origen biológico) dirigidas pueden ser muy eficaces y han transformado el tratamiento clásico de la AR (Guo et al., 2018; Li et al., 2022; Rivellese y Pitzalis, 2022). Sin embargo, una proporción significativa de pacientes, hasta el 30-40%, son resistentes a los tratamientos biológicos individuales. Al menos en parte, esto se puede deber a que las vías a las que se dirigen no son igualmente activas en todos los pacientes (Chen et al., 2019; Scherer et al., 2020). Hay que tener en cuenta que la respuesta inflamatoria en la AR puede ser muy heterogénea. En otras palabras, aunque el papel de la sinovitis crónica en la patogénesis de la AR está bien establecido, los mecanismos exactos que impulsan la inflamación sinovial en términos de células inmunitarias y mediadores específicos a nivel de cada paciente no están del todo claros (Zhang et al., 2019). El tratamiento de la AR sigue basándose en gran medida en las características clínicas, así como en la evaluación económica de la salud, en lugar de un enfoque basado en la vía objetiva. Esto se debe principalmente a la falta de biomarcadores clínicos para predecir la respuesta a los fármacos individuales para la AR. También influye nuestra limitada comprensión de los acontecimientos patobiológicos que subyacen a la heterogeneidad clínica de la AR. De esta forma, el mejor sistema de clasificación sigue siendo el de los pacientes positivos o negativos para los marcadores de autoinmunidad sistémica como el Factor Reumatoide (FR) o los anticuerpos contra los péptidos citrulinados (ACPA) (Sanmartí y Gómez-Puerta, 2011; Rivellese y Pitzalis, 2022).

Con estos antecedentes, el objetivo de este ensayo es servir como prueba piloto para profundizar en el desarrollo de la respuesta inmune que caracteriza a la AR. El estudio se encuentra en fase *in vitro* y se decidió trabajar con la línea celular THP-1. Esta es una línea celular monocítica de leucemia humana, que se ha utilizado ampliamente para estudiar las funciones de los monocitos/macrófagos, los mecanismos, las vías de señalización y el transporte de nutrientes y fármacos. Por ello se ha convertido en un modelo habitual para estimar la modulación de las actividades de monocitos y macrófagos, entendiendo así, desde el punto de vista *in vitro*, lo que ocurre en el interior de nuestro cuerpo (Chanput et al., 2014). Debido a limitaciones financieras o éticas, inevitablemente relacionadas con los estudios *in vivo* en animales y humanos, los experimentos *ex vivo* o *in vitro* se convierten en los más importantes para el desarrollo de aplicaciones específicas. Los sistemas *ex vivo* tienen la ventaja de su origen natural. Sin embargo, la viabilidad de los donantes y la alta variación individual pueden hacer que el análisis e interpretación de los resultados sean más complejos. Las líneas celulares de ratón o humanas, originadas de células cancerosas, son por lo tanto importantes herramientas *in vitro* para estudiar funciones, mecanismos y respuestas celulares (Bosshart y Heinzelmann, 2016). Entre las ventajas que presenta el empleo de las THP-1 frente a los monocitos derivados de PBMC (*peripheral blood mononuclear cell*) se pueden destacar:

menor tiempo medio de duplicación (35-50 h); ausencia de virus infecciosos o productos tóxicos; es una línea celular inmortalizada, que puede cultivarse *in vitro* hasta el pase 25 (sobre 3 meses) sin que se produzcan cambios en la sensibilidad y la actividad de las células, mientras que la disponibilidad de los monocitos derivados de PBMCs es limitada (Chanput et al., 2014; Jiang et al., 2016; Feuerer et al., 2022).

Cuando las células monocíticas se encuentran en contacto con el PMA, sufren una diferenciación a macrófagos. En nuestro cuerpo ocurre algo equitativo, cuando los monocitos derivados de los PBMCs se diferencian a macrófagos al extravasarse y ser activados por una vía de señalización ante cualquier tipo de peligro (Rivellese y Pitzalis, 2022). En los resultados se muestra como efectivamente el PMA puede actuar como un factor inductor de la diferenciación de los monocitos (Figura 7), cuando estos se dejan 3 h en incubación. Será sobre los macrófagos dónde se aprecie la respuesta inflamatoria. Para ello, se emplea un estímulo proinflamatorio, en este caso, el LPS, y se ha visto como es capaz de desencadenar la respuesta inmune en las células al activarlas, en comparación con las que no están tratadas. Para poder apreciar esta respuesta, se han observado las ratios normalizadas de la qPCR. Estas provienen de las medias de los CPs (*crossing points*), las cuales se obtienen directamente de las coordenadas de los puntos en los que la línea de umbral cruza los gráficos de fluorescencia obtenidos tras el filtrado de ruido. En los gráficos del LightCycler® 480 Instrument II, cuanto antes apareciesen los CPs, significaba que mayor expresión de ARNm del gen a estudio existía. Por tanto, las mayores expresiones de ARNm de los diferentes marcadores inflamatorios (IL-8, IL-1 β , Caspasa-1 y NLRP3) se apreciaron bajo la influencia del LPS (Figuras 8, 9, 10, 11).

En nuestro cuerpo, los monocitos constituyen entre el 2% y el 10% de los glóbulos blancos, siendo células inmunitarias relativamente abundantes de la sangre periférica. Durante la respuesta inflamatoria, los mediadores proinflamatorios, especialmente el MCP-1 (*monocyte chemoattractant protein 1*), contribuyen a la migración de los monocitos circulatorios hacia el tejido circundante, atrayendo específicamente a los monocitos hacia la zona inflamada, promoviendo el daño tisular y la enfermedad. El aumento rápido de las citoquinas y quimioquinas inflamatorias indica que funcionan como detectores sensibles a la presencia de estímulos perjudiciales en la circulación, actuando como potentes inductores de una respuesta inmune. Las citoquinas inflamatorias tradicionales son la IL-1 α , IL-1 β , IL-6 y TNF- α . Estas regulan la expresión de la IL-8, un potente quimioatrayente de los neutrófilos. Es, por tanto, una de las células clave para combatir un estímulo perjudicial. También un activador de la fagocitosis, de la formación de trampas extracelulares de neutrófilos (NET) y, posteriormente, de la angiogénesis, siendo muy importante en la respuesta inflamatoria (Zhang et al., 2019; Lara et al., 2022; Rivellese y Pitzalis, 2022). Cuando todo este proceso se descontrola, ya sea debido a causas genéticas, epigenéticas, ambientales, a un incremento del estrés oxidativo o al propio envejecimiento, se pueden producir enfermedades autoinmunes como la AR descrita anteriormente. Con los resultados de este estudio se ha podido comprobar *in vitro* cómo reacciona la línea celular de monocitos humana ante el estímulo positivo LPS. La Caspasa-1, el NLRP3 y la IL-1 β son mediadores relacionados con el inflammasoma, activándose a través de la vía NF- κ B (Figura 3). La IL-8 es una citoquina que no forma parte del complejo inflammasoma, pero es muy importante en la respuesta inflamatoria y se ve modulada por la vía NF- κ B. Con el LPS aumenta la expresión de la IL-1 β (Figuras 8, 9,

10, 11) la cual a su vez regula la expresión de la IL-8, incrementándola. Además, la propia IL-1 β es capaz de inducir la vía de activación de la NF- κ B, formándose un ciclo vicioso, que es lo que ocurriría en la AR.

En este trabajo también se ha podido comprobar el papel del resveratrol sobre la respuesta inflamatoria. Es un compuesto antioxidante y antiinflamatorio, capaz de inhibir la síntesis y la liberación de varios mediadores proinflamatorios como el óxido nítrico (NO) y una amplia gama de citoquinas (IL-1 β , IL-6, IL-12 y TNF- α) (Truong et al., 2018). Además, suprime importantes enzimas implicadas en la síntesis de mediadores proinflamatorios, como la ciclooxigenasa-1 (COX-1) o la ciclooxigenasa-2 (COX-2) (Zimmermann-Franco et al., 2018). Los resultados obtenidos en este ensayo concuerdan con los estudios de Truong et al. (2018) y de Zimmermann-Franco et al. (2018), entre otros. Queda demostrado como se reducen los niveles de expresión de los mediadores inflamatorios escogidos. Con respecto a la AR, el resveratrol resultó eficaz para prevenir la hiperplasia de las células sinoviales en modelos animales, así como en células humanas aisladas. Recientemente, en ratones alimentados con resveratrol, se descubrió que disminuyen en el tejido articular los niveles de TNF- α , IL-1 β , IL-6 y de la proteína quimioatrayente de monocitos 1, así como del ligando del receptor soluble del NF- κ B (Yang et al., 2018). Además, el resveratrol fue capaz de inducir la apoptosis de sinoviocitos similares a fibroblastos (FLS) derivados de pacientes con AR a través de la activación de la caspasa-8. Este es un proceso que modula la maquinaria apoptótica de las mitocondrias (Khojah et al., 2018).

Como continuación del estudio, se podrían emplear otros estímulos proinflamatorios o que estén implicados en el proceso de la inflamación (inhibidor de la Caspasa-1, mitoTEMPO, paraquat, TNF- α , etc.) para observar cómo afectan a la expresión de ARNm de los distintos mediadores. Además, también sería interesante profundizar en la relación entre la disfunción mitocondrial y la respuesta inflamatoria en las células mononucleares humanas en la artritis reumatoide. Esto se debe a que el proceso inflamatorio también puede estar desencadenado por el aumento del estrés oxidativo causado por la disfunción mitocondrial y favoreciendo así el curso del envejecimiento. De esta forma una mitocondria disfuncional podría incrementar los niveles de ROS y su liberación induciría la ruta de activación del inflamasoma, desencadenándose la respuesta inmune.

5. CONCLUSIONES

Con el propósito de profundizar en la respuesta inflamatoria que caracteriza la artritis reumatoide y a la vista de los resultados se ha podido comprobar que:

- 1) El lipopolisacárido bacteriano (LPS) es capaz de inducir la respuesta inflamatoria en la línea celular THP-1 monocítica humana, al incrementar la expresión génica de IL-1 β , Caspasa-1, NLRP3 e IL-8. Es por esto por lo que se puede considerar un control positivo del estudio piloto.
- 2) El compuesto antiinflamatorio resveratrol es capaz de disminuir la respuesta inflamatoria en las células THP-1, reduciendo la expresión de ARNm de la IL-1 β , Caspasa-1, NLRP3 e IL-8.

CONCLUSIÓNS

Co propósito de profundar na resposta inflamatoria que caracteriza a artrite reumatoide e á vista dos resultados comprobouse que:

- 1) O lipopolisacárido bacteriano (LPS) é capaz de inducir a resposta inflamatoria na liña celular THP-1 monocítica humana, ao incrementar a expresión xénica de IL-1 β , Caspasa-1, NLRP3 e IL-8. É por isto polo que se pode considerar un control positivo do estudo piloto.
- 2) O composto antiinflamatorio resveratrol é capaz de diminuír a resposta inflamatoria nas células THP-1, reducindo a expresión de ARNm da IL-1 β , Caspasa-1, NLRP3 e IL-8.

CONCLUSIONS

With the purpose of deepening in the inflammatory response that characterizes rheumatoid arthritis and in view of the results it has been possible to prove that:

- 1) Bacterial lipopolysaccharide (LPS) is able to induce the inflammatory response in the human monocytic THP-1 cell line, increasing gene expression of IL-1 β , Caspase-1, NLRP3 and IL-8. This is why it can be considered a positive control of the pilot study.
- 2) The anti-inflammatory compound resveratrol is able to decrease the inflammatory response in THP-1 cells, reducing the mRNA expression of IL-1 β , Caspase-1, NLRP3 and IL-8.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Ait Eldjoudi, D., Cordero Barreal, A., Gonzalez-Rodríguez, M., Ruiz-Fernández, C., Farrag, Y., Farrag, M., Lago, F., Capuozzo, M., Gonzalez-Gay, M. A., Mera Varela, A., Pino, J., y Gualillo, O. (2022). Leptin in osteoarthritis and rheumatoid arthritis: Player or bystander?. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(5), 2859. <https://doi.org/10.3390/ijms23052859>
- Biasizzo, M., y Kopitar-Jerala, N. (2020). Interplay between NLRP3 inflammasome and autophagy. *Frontiers in Immunology*, 11, 591803. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.591803>
- Blanco, F. J., y Rego-Pérez, I. (2018). Mitochondria and mitophagy: biosensors for cartilage degradation and osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage*, 26(8), 989-991. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2018.05.018>
- Bosshart, H., y Heinzelmann, M. (2016). THP-1 cells as a model for human monocytes. *Annals of Translational Medicine*, 4(21), 438. <https://doi.org/10.21037/atm.2016.08.53>
- Castro, L. S., Bracht, L., Peralta, R. M., Maróstica, H. V. P., Comar, J. F., Sá-Nakanishi, A. B., y Bracht, A. (2021). Actions of multiple doses of resveratrol on oxidative and inflammatory markers in plasma and brain of healthy and arthritic rats. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 128(1), 80-90. <https://doi.org/10.1111/bcpt.13475>
- Chanput, W., Mes, J. J., y Wichers, H. J. (2014). THP-1 cell line: an in vitro cell model for immune modulation approach. *International Immunopharmacology*, 23(1), 37-45. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2014.08.002>

- Chen, L., Deng, H., Cui, H., Fang, J., Zuo, Z., Deng, J., Li, Y., Wang, X., y Zhao, L. (2018). Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs. *Oncotarget*, 9(6), 7204-7218. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.23208>
- Chen, Z., Bozec, A., Ramming, A., y Schett, G. (2019). Anti-inflammatory and immune-regulatory cytokines in rheumatoid arthritis. *Nature Reviews Rheumatology*, 15(1), 9-17. <https://doi.org/10.1038/s41584-018-0109-2>
- Chhabra, G., Singh, C. K., Amiri, D., Akula, N., y Ahmad, N. (2021). Recent advancements on immunomodulatory mechanisms of resveratrol in tumor microenvironment. *Molecules*, 26(5), 1343. <https://doi.org/10.3390/molecules26051343>
- Daigneault, M., Preston, J. A., Marriott, H. M., Whyte, M. K. B., y Dockrell, D. H. (2010). The identification of markers of macrophage differentiation in PMA-stimulated THP-1 cells and monocyte-derived macrophages. *PloS One*, 5(1), e8668. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008668>
- De Jaeger, C. (2018). Fisiología del envejecimiento. *EMC-Kinesiterapia-Medicina Física*, 39(2), 1-12. [https://doi.org/10.1016/S1293-2965\(18\)89822-X](https://doi.org/10.1016/S1293-2965(18)89822-X)
- Edilova, M. I., Akram, A., y Abdul-Sater, A. A. (2021). Innate immunity drives pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Biomedical Journal*, 44(2), 172-182. <https://doi.org/10.1016/j.bj.2020.06.010>
- Fernández-Rodríguez, J. A. (2022). *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)*. [Tesis doctoral, Universidade da Coruña]. Repositorio Institucional da Universidade da Coruña (RUC). <http://hdl.handle.net/2183/30514>
- Feuerer, N., Carvajal Berrio, D. A., Billing, F., Segan, S., Weiss, M., Rothbauer, U., Marzi, J., y Schenke-Layland, K. (2022). Raman microspectroscopy identifies biochemical activation fingerprints in THP-1-and PBMC-derived Macrophages. *Biomedicines*, 10(5), 989. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10050989>
- Fonseca, L. J. S., Nunes-Souza, V., Goulart, M. O. F., y Rabelo, L. A. (2019). Oxidative stress in rheumatoid arthritis: What the future might hold regarding novel biomarkers and add-on therapies. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2019, 7536805. <https://doi.org/10.1155/2019/7536805>
- Gambini, J., López-Gruoso, R., Olaso-González, G., Inglés, M., Abdelazid, K., El Alami, M., Bonet-Costa, V., Borrás, C., y Viña, J. (2013). Resveratrol: distribución, propiedades y perspectivas. *Revista Española de Geriatria y Gerontología*, 48(2), 79-88. <https://doi.org/10.1016/j.regg.2012.04.007>
- Geto, Z., Molla, M. D., Challa, F., Belay, Y., y Getahun, T. (2020). Mitochondrial dynamic dysfunction as a main triggering factor for inflammation associated chronic non-communicable diseases. *Journal of Inflammation Research*, 13, 97-107. <https://doi.org/10.2147/JIR.S232009>
- Green, D. R., Galluzzi, L., y Kroemer, G. (2011). Mitochondria and the autophagy–inflammation–cell death axis in organismal aging. *Science*, 333(6046), 1109-1112. <https://doi.org/10.1126/science.1201940>

- Gu, L., Meng, R., Tang, Y., Zhao, K., Liang, F., Zhang, R., Xue, Q., Chen, F., Xiao, X., Wang, H., Wang, H., Billiar, T. R., y Lu, B. (2019). Toll-like receptor 4 signaling licenses the cytosolic transport of lipopolysaccharide from bacterial outer membrane vesicles. *Shock*, 51(2), 256-265. <https://doi.org/10.1097/SHK.0000000000001129>
- Guo, Q., Wang, Y., Xu, D., Nossent, J., Pavlos, N. J., y Xu, J. (2018). Rheumatoid arthritis: pathological mechanisms and modern pharmacologic therapies. *Bone Research*, 6(1), 15. <https://doi.org/10.1038/s41413-018-0016-9>
- Hernando Espinilla, A. (2020). *Marcadores de estrés oxidativo y envejecimiento. El ejercicio físico controlado sobre los niveles de parámetros oxidativos en mujeres mayores. Estudio especial del estado redox y la modificación oxidativa del ADN*. [Tesis doctoral, Universitat de València]. Repositorio Institucional de la Universitat de València (RODERIC). <https://hdl.handle.net/10550/73238>
- Institute for Molecular Bioscience. (2020). *What is an inflammasome?* [Vídeo]. YouTube. <https://youtu.be/2812ion3aUk>
- Jiang, L., Zhang, L., Kang, K., Fei, D., Gong, R., Cao, Y., Pan, S., Zhao, M., y Zhao, M. (2016). Resveratrol ameliorates LPS-induced acute lung injury via NLRP3 inflammasome modulation. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 84, 130-138. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2016.09.020>
- Khojah, H. M., Ahmed, S., Abdel-Rahman, M. S., y Elhakeim, E. H. (2018). Resveratrol as an effective adjuvant therapy in the management of rheumatoid arthritis: a clinical study. *Clinical Rheumatology*, 37(8), 2035-2042. <https://doi.org/10.1007/s10067-018-4080-8>
- Lara, S., Akula, S., Fu, Z., Olsson, A. K., Kleinau, S., y Hellman, L. (2022). The human monocyte—a circulating sensor of infection and a potent and rapid inducer of inflammation. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(7), 3890. <https://doi.org/10.3390/ijms23073890>
- Li, R., Ma, Y., Hong, J., y Ding, Y. (2022). Nanoengineered therapy aiming at the etiology of rheumatoid arthritis. *Nano Today*, 42, 101367. <https://doi.org/10.1016/j.nantod.2021.101367>
- Liguori, I., Russo, G., Curcio, F., Bulli, G., Aran, L., Della-Morte, D., Gargiulo, G., Testa, G., Cacciatore, F., Bonaduce, D., y Abete, P. (2018). Oxidative stress, aging, and diseases. *Clinical Interventions in Aging*, 13, 757-772. <https://doi.org/10.2147/CIA.S158513>
- Lin, Y. J., Anzaghe, M., y Schülke, S. (2020). Update on the pathomechanism, diagnosis, and treatment options for rheumatoid arthritis. *Cells*, 9(4), 880. <https://doi.org/10.3390/cells9040880>
- Luo, J., Mills, K., le Cessie, S., Noordam, R., y van Heemst, D. (2020). Ageing, age-related diseases and oxidative stress: what to do next?. *Ageing Research Reviews*, 57, 100982. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2019.100982>
- Maeda, K., Yoshida, K., Nishizawa, T., Otani, K., Yamashita, Y., Okabe, H., Hadano, Y., Kayama, T., Kurosaka, D., y Saito, M. (2022). Inflammation and bone metabolism in rheumatoid arthritis: Molecular mechanisms of joint destruction and pharmacological

- treatments. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(5), 2871. <https://doi.org/10.3390/ijms23052871>
- Muñoz-Carrillo, J. L., Villalobos-Gutiérrez, P. T., Puebla-Pérez, A. M., López-Luna, A., Flores-De La Torre, J. A., Alvarez-Barreto, I., y Gutiérrez-Coronado, O. (2021). El tratamiento con resiniferatoxina exhibe propiedades antiinflamatorias en un modelo murino de inflamación inducida por lipopolisacárido. *Revista Biomédica*, 32(3), 137-146. <https://doi.org/10.32776/revbiomed.v32i3.882>
- Nature Video. (2016). *Immunology of the rheumatoid joint* [Vídeo]. YouTube. https://youtu.be/nYjzl3Xc_0E
- Nucleus Medical Media. (2014). *Rheumatoid arthritis animation* [Vídeo]. YouTube. <https://youtu.be/Yc-9dfem3IM>
- Paik, S., Kim, J. K., Silwal, P., Sasakawa, C., y Jo, E. K. (2021). An update on the regulatory mechanisms of NLRP3 inflammasome activation. *Cellular & Molecular Immunology*, 18(5), 1141-1160. <https://doi.org/10.1038/s41423-021-00670-3>
- Ramil Gómez, O. (2020). *Papel de la disfunción mitocondrial en los cambios estructurales y funcionales de la membrana peritoneal en pacientes tratados con diálisis peritoneal. Efecto de una dieta antioxidante*. [Tesis doctoral, Universidade da Coruña]. Repositorio Institucional da Universidade da Coruña (RUC). <http://hdl.handle.net/2183/26700>
- Rivellese, F., y Pitzalis, C. (2022). Cellular and molecular diversity in Rheumatoid Arthritis. In *Seminars in Immunology*. Publicación anticipada en línea. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2021.101519>
- Rongvaux, A. (2018). Innate immunity and tolerance toward mitochondria. *Mitochondrion*, 41, 14-20. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2017.10.007>
- Sanmartí, R., y Gómez-Puerta, J. A. (2011). Biomarcadores en la artritis reumatoide. *Reumatología Clínica*, 6(suplement 3), 25-28. <https://doi.org/10.1016/j.reuma.2010.10.007>
- Scherer, H. U., Häupl, T., y Burmester, G. R. (2020). The etiology of rheumatoid arthritis. *Journal of Autoimmunity*, 110, 102400. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2019.102400>
- Truong, V. L., Jun, M., y Jeong, W. S. (2018). Role of resveratrol in regulation of cellular defense systems against oxidative stress. *Biofactors*, 44(1), 36-49. <https://doi.org/10.1002/biof.1399>
- Vaamonde-García, C., y López-Armada, M. J. (2019). Role of mitochondrial dysfunction on rheumatic diseases. *Biochemical Pharmacology*, 165, 181-195. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2019.03.008>
- Valcárcel Ares, M. N. (2014). *Implicaciones patológicas del desequilibrio redox: Estudio del papel de la mitocondria en el proceso inflamatorio del sinoviocito y estudio de la participación de Nrf2 en la capacidad angiogénica endotelial*. [Tesis doctoral, Universidade da Coruña]. Repositorio Institucional da Universidade da Coruña (RUC). <http://hdl.handle.net/2183/11895>
- Wang, X., Wang, Y., Antony, V., Sun, H., y Liang, G. (2020). Metabolism-associated molecular patterns (MAMPs). *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 31(10), 712-724. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2020.07.001>

- Wei, K., Nguyen, H. N., y Brenner, M. B. (2021). Fibroblast pathology in inflammatory diseases. *The Journal of Clinical Investigation*, 131(20), e149538. <https://doi.org/10.1172/JCI149538>
- Weyand, C. M., y Goronzy, J. J. (2021). The immunology of rheumatoid arthritis. *Nature Immunology*, 22(1), 10-18. <https://doi.org/10.1038/s41590-020-00816-x>
- Yang, G., Chang, C. C., Yang, Y., Yuan, L., Xu, L., Ho, C. T., y Li, S. (2018). Resveratrol alleviates rheumatoid arthritis via reducing ROS and inflammation, inhibiting MAPK signaling pathways, and suppressing angiogenesis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66(49), 12953-12960. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b05047>
- Yap, H. Y., Tee, S. Z. Y., Wong, M. M. T., Chow, S. K., Peh, S. C., y Teow, S. Y. (2018). Pathogenic role of immune cells in rheumatoid arthritis: implications in clinical treatment and biomarker development. *Cells*, 7(10), 161. <https://doi.org/10.3390/cells7100161>
- Zhang, F., Wei, K., Slowikowski, K., Fonseka, C. Y., Rao, D. A., Kelly, S., Goodman, S. M., Tabechian, D., Hughes, L. B., Salomon-Escoto, K., Watts, G., Jonsson, A. H., Rangel-Moreno, J., Meednu, N., Rozo, C., Apruzzese, W., Eisenhaure, T. M., Lieb, D. J., Boyle, D. L., ... Raychaudhuri, S. (2019). Defining inflammatory cell states in rheumatoid arthritis joint synovial tissues by integrating single-cell transcriptomics and mass cytometry. *Nature Immunology*, 20(7), 928-942. <https://doi.org/10.1038/s41590-019-0378-1>
- Zhong, Z., Umemura, A., Sanchez-Lopez, E., Liang, S., Shalapur, S., Wong, J., He, F., Boassa, D., Perkins, G., Ali, S. R., McGeough, M. D., Ellisman, M. H., Seki, E., Gustafsson, A. B., Hoffman, H. M., Diaz-Meco, M. T., Moscat, J., y Karin, M. (2016). NF- κ B restricts inflammasome activation via elimination of damaged mitochondria. *Cell*, 164(5), 896-910. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.12.057>
- Zimmermann-Franco, D. C., Esteves, B., Lacerda, L. M., Souza, I. O., Dos Santos, J. A., Pinto, N. D. C. C., Scio, E., da Silva, A. D., y Macedo, G. C. (2018). *In vitro* and *in vivo* anti-inflammatory properties of imine resveratrol analogues. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 26(17), 4898-4906. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2018.08.029>