



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

## **Grado en Biología**

**Facultad de Ciencias**

Memoria del Trabajo de Fin de Grado

**Papel de la disfunción mitocondrial en la activación de caspasa 1 en  
células mesoteliales**

**Papel da disfunción mitocondrial na activación de caspasa 1 en  
células mesoteliais**

**Role of mitochondrial dysfunction in caspase 1 activation in  
mesothelial cells**

**Isabel Rodríguez Sánchez**

Curso: 2021-2022. Convocatoria: junio

*Director 1: Antonio Manuel Castro Castro*

*Director 2: Olalla Ramil Gómez*

D. Antonio Manuel Castro Castro, Profesor Titular del Departamento de Biología de la Universidad de A Coruña (UDC), y Dña. Olalla Ramil Gómez, Investigadora Posdoctoral en el Instituto de Investigación Biomédica de A Coruña (INIBIC),

Informan,

Que el Trabajo de Fin de Grado presentado por Isabel Rodríguez Sánchez con título “Papel de la disfunción mitocondrial en la activación de caspasa 1 en células mesoteliales” ha sido realizado bajo la supervisión de ambos, y considerándolo finalizado, autorizamos su envío y defensa ante el correspondiente tribunal calificador.

Y para que así conste, expedimos el presente informe en A Coruña, a 23 de junio de 2022.

CASTRO CASTRO  
ANTONIO  
MANUEL - DNI  
32823383Z

Firmado digitalmente  
por CASTRO CASTRO  
ANTONIO MANUEL -  
DNI 32823383Z  
Fecha: 2022.06.23  
09:50:15 +02'00'

Fdo: Antonio Manuel Castro Castro

RAMIL  
GOMEZ  
OLALLA -  
17760548V

Firmado  
digitalmente por  
RAMIL GOMEZ  
OLALLA -  
17760548V  
Fecha: 2022.06.23  
09:38:38 +02'00'

Fdo: Olalla Ramil Gómez

# ÍNDICE

RESUMEN/ RESUMO/ SUMMARY .....	1
1. INTRODUCCIÓN .....	4
1.1 ENVEJECIMIENTO POBLACIONAL Y ENFERMEDAD RENAL .....	4
1.2 DIÁLISIS PERITONEAL Y TRANSICIÓN EPITELIO-MESENQUIMAL .....	5
1.3 DISFUNCIÓN MITOCONDRIAL E INFLAMASOMA .....	7
1.4 RESVERATROL .....	10
2. OBJETIVOS .....	11
3. MATERIAL Y MÉTODOS .....	11
3.1 AISLAMIENTO DE CÉLULAS MESOTELIALES PRIMARIAS DEL EFLUENTE PERITONEAL DE PACIENTES EN DIÁLISIS PERITONEAL .....	11
3.2 CULTIVO CELULAR Y ESTIMULACIÓN .....	12
3.2.1 Cultivo celular .....	12
3.2.2 Depleción .....	12
3.2.3 Estimulación .....	12
3.3 INMUNOFLUORESCENCIA .....	13
3.3.1 Fijación de las células .....	14
3.3.2 Permeabilización celular y bloqueo de uniones inespecíficas .....	14
3.3.3 Incubación de anticuerpos .....	14
3.3.4 Tinción nuclear con DAPI .....	14
3.3.5 Análisis mediante microscopía y cuantificación de la señal .....	15
3.3.6 Estudio descriptivo .....	15
4. RESULTADOS .....	15
4.1 EFECTO DE LA DISFUNCIÓN MITOCONDRIAL Y LA INFLAMACIÓN SOBRE LA EXPRESIÓN DE CASPASA 1 .....	15
4.2 MEDIADORES IMPLICADOS EN LA ACTIVACIÓN DE CASPASA 1 INDUCIDA POR PARAQUAT Y TNF- $\alpha$ .....	16
4.3 EFECTO DEL RESVERATROL SOBRE LA ACTIVACIÓN DE CASPASA 1 INDUCIDA POR PARAQUAT Y TNF- $\alpha$ .....	18
5. DISCUSIÓN .....	19
6. CONCLUSIONES/ CONCLUSIÓN/ CONCLUSIONS .....	23
7. BIBLIOGRAFÍA .....	25

## RESUMEN

La diálisis peritoneal (DP) es un tratamiento sustitutivo renal que presenta resultados similares en términos de eficacia a los de la hemodiálisis a un menor coste. Su principal desventaja es que el contacto continuo de los líquidos de diálisis con la membrana peritoneal promueve el estrés oxidativo y la inflamación del peritoneo, derivando en alteraciones estructurales como la transición epitelio-mesenquimal que pueden desembocar en el fracaso de la técnica. Ya que el estrés oxidativo es fundamental en el desarrollo del daño peritoneal, la mitocondria podría tener un papel clave en la fisiopatología del peritoneo al ser la principal fuente de especies reactivas de oxígeno (ROS). Estos compuestos pueden actuar como patrones moleculares asociados al daño (DAMPs; del inglés: *Damage-Associated Molecular Patterns*) activando el inflamasoma NLRP3, que provoca la activación de la caspasa 1 y la consecuente secreción de IL-1 $\beta$  e IL-18, desencadenantes de la respuesta inflamatoria. Por este motivo, el objetivo de este trabajo fue evaluar el papel de la mitocondria en la activación del inflamasoma mediante el estudio del efecto de la disfunción mitocondrial en la activación de caspasa 1. Para ello, se realizó un análisis descriptivo de la expresión de caspasa 1 en células mesoteliales procedentes del efluente peritoneal de pacientes en terapia de DP.

En primer lugar, se observó que existe una relación entre el daño mitocondrial y el inflamasoma, ya que la disfunción mitocondrial indujo *per se* un aumento de la expresión proteica de caspasa 1 en las células mesoteliales del efluente peritoneal. Asimismo, también se observó que la citoquina proinflamatoria TNF- $\alpha$  tiene la capacidad de aumentar la activación de caspasa 1. En cuanto a los mediadores implicados, se mostró que el inflamasoma NLRP3 y los ROS procedentes de la mitocondria están involucrados en la activación del inflamasoma. Finalmente, se testó el efecto del antioxidante natural resveratrol y se observó que previene la activación de caspasa 1 inducida por disfunción mitocondrial y citoquinas proinflamatorias.

Estos resultados podrían contribuir a obtener un mayor conocimiento del desarrollo de la respuesta inflamatoria en el peritoneo durante el tratamiento con DP y por tanto ayudar a la búsqueda de nuevas dianas terapéuticas.

**Palabras clave:** Diálisis peritoneal, Transición epitelio-mesenquimal, Inflamasoma NLRP3, Caspasa 1, ROSmt, Resveratrol.

## RESUMO

A diálise peritoneal (DP) é unha tratamento de substitución renal que, en termos de eficacia, ten resultados similares aos da hemodiálise a un custo inferior. A súa principal desvantaxe é que o contacto continuo dos fluídos de diálise coa membrana peritoneal favorece o estrés oxidativo e a inflamación do peritoneo, provocando alteracións estruturais como a transición epitelio-mesenquimal que poden levar ao fracaso da técnica. Dado que o estrés oxidativo é esencial no desenvolvemento do dano peritoneal, as mitocondrias poderían desempeñar un papel fundamental na fisiopatoloxía do peritoneo ao ser a fonte principal de especies reactivas de osíxeno (ROS). Estes compostos poden actuar como padróns moleculares asociados ao dano (DAMPs; do inglés: Damage-Associated Molecular Patterns) activando o inflammasoma NLRP3, que provoca a activación da caspasa 1 e a conseguinte secreción de IL-1 $\beta$  e IL-18, desencadeantes da resposta inflamatoria. Por este motivo, o obxectivo deste traballo foi avaliar o papel da mitocondria na activación do inflammasoma mediante o estudo do efecto da disfunción mitocondrial na activación de caspasa 1. Para iso, realizouse unha análise descritiva da expresión de caspasa 1 en células mesoteliais procedentes do efluente peritoneal de pacientes en terapia de PD.

En primeiro lugar, observouse que existe unha relación entre o dano mitocondrial e o inflammasoma, xa que a disfunción mitocondrial per se induciu un aumento da expresión proteica de caspasa 1 nas células mesoteliais do efluente peritoneal. Así mesmo, tamén se observou que a citoquina proinflamatoria TNF- $\alpha$  ten a capacidade de aumentar a activación de caspasa 1. En canto aos mediadores implicados, mostrouse que o inflammasoma NLRP3 e os ROS procedentes da mitocondria están implicados na activación do inflammasoma. Finalmente, probouse o efecto do antioxidante natural resveratrol e observouse que impide a activación de caspasa 1 inducida pola disfunción mitocondrial e citoquinas proinflamatorias.

Estes resultados poderían contribuír a obter unha mellor comprensión do desenvolvemento da resposta inflamatoria no peritoneo durante o tratamento con DP e, polo tanto, axudar na busca de novas dianas terapéuticas.

**Palabras clave:** Diálise peritoneal, Transición epitelio-mesenquimal, Inflammasoma NLRP3, Caspasa 1, ROSmt, Resveratrol.

## SUMMARY

Peritoneal dialysis (PD) is a renal replacement therapy that has similar results in terms of efficacy to hemodialysis at a lower cost. Its main disadvantage is that the continuous contact of dialysis fluids with the peritoneal membrane promotes oxidative stress and inflammation of the peritoneum, leading to structural alterations such as epithelial-to-mesenchymal transition that can lead to the failure of the technique. Because oxidative stress is essential to the development of peritoneal damage, mitochondria may play a key role in the pathophysiology of the peritoneum as they are the main source of reactive oxygen species (ROS). These compounds may act as Damage-Associated Molecular Patterns (DAMPs) by activating the NLRP3 inflammasome, which triggers the activation of caspase 1 and the consequent IL-1 $\beta$  and IL-18 secretion, which trigger the inflammatory response. For this reason, the aim of this study was to assess the role of mitochondria in inflammasome activation by studying the effect of mitochondrial dysfunction on caspase 1 activation. To this end, a descriptive analysis of caspase 1 expression in mesothelial cells from the peritoneal effluent of patients on PD therapy was performed.

First, a link between mitochondrial damage and the inflammasome was observed, as mitochondrial dysfunction induced per se an increase in caspase 1 protein expression in mesothelial cells from peritoneal effluent. Furthermore, it was also observed that the proinflammatory cytokine TNF- $\alpha$  has the ability to increase caspase 1 activation. Related to the mediators involved, the NLRP3 inflammasome and ROS from mitochondria were shown to be implicated in inflammasome activation. Finally, the effect of the natural antioxidant resveratrol was tested, and we found that prevents caspase 1 activation induced by mitochondrial dysfunction and proinflammatory cytokines.

These results could contribute to a better understanding of the development of the inflammatory response in the peritoneum during PD treatment and could help in the search for new therapeutic targets.

**Keywords:** Peritoneal dialysis, Epithelial-to-mesenchymal transition, NLRP3 inflammasome, Caspase 1, mtROS, Resveratrol.

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 ENVEJECIMIENTO POBLACIONAL Y ENFERMEDAD RENAL

El envejecimiento de la población a nivel mundial es un hecho irrefutable, a la vista de los estudios demográficos realizados en los últimos años. De hecho, del año 2000 al 2020 la población menor de 14 años disminuyó del 30 al 25%, mientras que la población mundial mayor de 65 años aumentó del 7 al 9% (1), y se espera que esta cifra alcance el 16% en 2050 (2). En lo referente a España, el porcentaje de mayores de 65 años se sitúa en el 19,3% (3) (de ellos, aproximadamente el 25% corresponde a personas octogenarias) y se estima que en 2050 alcanzará un 30%. Este proceso de envejecimiento se ha producido de forma exponencial, de manera que el número de personas mayores se ha duplicado en menos de 30 años. Fundamentalmente, este fenómeno se debe al aumento de la longevidad debido a las mejoras en la calidad de vida y a las bajas tasas de natalidad (4).

Si se analizan los problemas de salud en la tercera edad, las enfermedades crónicas son las que tienen una mayor presencia en la actualidad (5), y la enfermedad renal crónica (ERC) no es una excepción (6). La ERC se define como la pérdida de la tasa de filtración glomerular por debajo de 60 ml/min/1,73m<sup>2</sup> o la presencia de daño renal, persistentes durante al menos 3 meses (7). A nivel mundial, cerca de 850 millones de personas sufren esta enfermedad y en España alcanza la cifra de aproximadamente 7 millones. Además, el índice de mortalidad de esta enfermedad ha experimentado un notable aumento durante los últimos años en nuestro país, por lo que si sigue a este ritmo se convertirá en la segunda causa de muerte (8).

El avance en la gravedad de esta patología hace necesario sustituir la función renal y para ello existen dos opciones de Tratamiento Renal Sustitutivo (TRS): el trasplante renal y la diálisis (9). El trasplante renal se considera la mejor opción de tratamiento, ya que mejora la calidad de vida del paciente y aumenta la supervivencia en comparación con la diálisis (10). Pese a ello, los tiempos de espera son prolongados y no todos los pacientes son susceptibles a este tratamiento (11). Por ejemplo, en el año 2020, solo un 4,5% de los pacientes tuvo acceso a un trasplante, convirtiendo a la diálisis en el tratamiento mayoritario para los enfermos renales (12). La diálisis es una técnica que se basa en la difusión de los productos metabólicos tóxicos y del exceso de líquidos desde la sangre del paciente a un líquido de diálisis a través de una membrana semipermeable que actúa modo de filtro, sustituyendo así la función de los riñones dañados. Dentro de esta modalidad, existen dos tipos: la hemodiálisis y la diálisis peritoneal. La hemodiálisis (HD) utiliza un filtro extracorpóreo denominado dializador, a través del cual es bombeada la

sangre que vuelve limpia al organismo, mientras que la diálisis peritoneal (DP) se basa en la utilización de la membrana peritoneal del propio paciente como filtro para eliminar el exceso de toxinas y líquidos (13).

En España, en el año 2020, 64 600 personas se encontraban en TRS, de los cuales el 54,6% de los pacientes presentaban un trasplante renal funcionando, un 40,4% se encontraban en tratamiento de hemodiálisis y un 5% en diálisis peritoneal (9, 12).

En este contexto, los recursos económicos necesarios para proporcionar TRS a los pacientes suponen una gran carga al sistema sanitario. En España, se destina un 2,5% del presupuesto del sistema nacional de salud y más del 4% de la atención especializada a una población menor al 1% (14). Este hecho ha promovido la realización de estudios económicos que muestran que la DP representa un gasto menor, obteniendo resultados similares a la HD, en términos de eficacia dialítica y morbimortalidad (15).

## **1.2 DIÁLISIS PERITONEAL Y TRANSICIÓN EPITELIO-MESENQUIMAL**

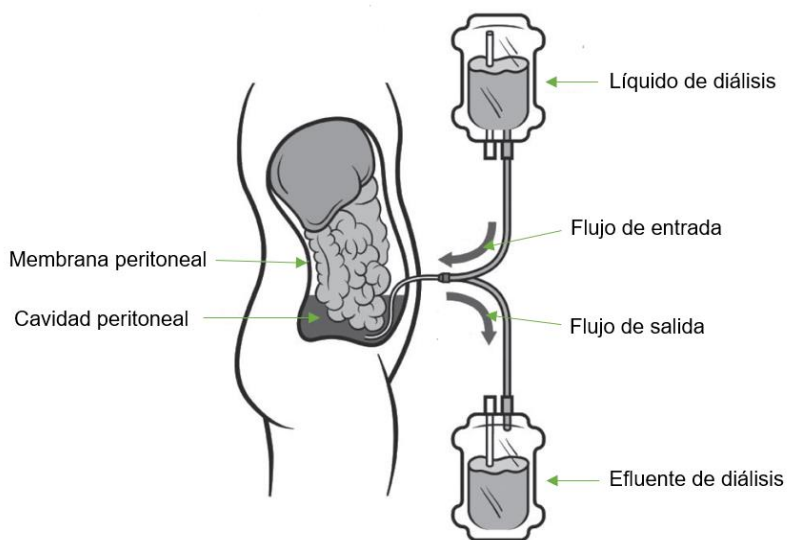
La DP consiste en la instilación de un líquido de diálisis (LD) hiperosmótico a la cavidad peritoneal del paciente a través de un catéter (16) que permite el transporte a favor de gradiente de concentración de los productos metabólicos de desecho y el exceso de agua desde la sangre al LD mediante ósmosis (17). En este proceso, el peritoneo funciona como una membrana semipermeable a través de la cual se produce la ultrafiltración y la difusión. De este modo, la renovación periódica del LD permite eliminar los desechos que los riñones no son capaces de filtrar (16, 18) (**Figura 1**).

El uso de la DP se encuentra en aumento debido a que es una terapia rentable y que se puede realizar en el domicilio, por lo que aumenta la calidad de vida del paciente con respecto a la HD, siendo la eficacia de ambas técnicas muy similar (17, 19). Además, la DP se asocia con una menor disminución de la función renal residual (19). Sin embargo, esta técnica también presenta ciertas desventajas ya que el contacto constante de los LD con el peritoneo y los episodios infecciosos pueden conducir al deterioro funcional de la membrana peritoneal y como consecuencia al fracaso de la técnica (18).

Estructuralmente, el peritoneo está formado por una capa de células mesoteliales con características epiteliales que cubre una región submesotelial compuesta por tejido conectivo, en el que podemos encontrar fibroblastos, mastocitos, macrófagos y vasos sanguíneos (16, 18). Las células mesoteliales representan la barrera en contacto con los LD, cuya composición los hace bioincompatibles debido principalmente a que el agente osmótico más frecuente es la glucosa en concentraciones muy superiores a las que encontramos fisiológicamente. Además, la esterilización por calor de los LD tiene como



consecuencia la formación de productos de degradación de la glucosa (GDPs; del inglés: *Glucose Degradation Products*), causantes de la aparición de productos finales de glicosilación avanzada (AGEs; del inglés: *Advanced Glycation End Products*). Como consecuencia, tanto la glucosa como sus productos de degradación, así como el pH de los LD empleados, desencadenan diversos eventos intracelulares en el peritoneo, como el estrés oxidativo debido al aumento de la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y el desarrollo de la respuesta inflamatoria (17). Durante este proceso las células mesoteliales y los macrófagos reclutan células inflamatorias (fagocitos mononucleares, linfocitos y neutrófilos), que producen un número elevado de citoquinas (interleuquina 1 beta, IL-1 $\beta$ ; interleuquina 8, IL-8; factor de necrosis tumoral alfa, TNF- $\alpha$ ), factores de crecimiento (factor de crecimiento fibroblástico 2, FGF-2; factor de crecimiento endotelial vascular, VEGF; factor de crecimiento transformante beta, TGF- $\beta$ ) y quimiocinas generando una respuesta inflamatoria crónica de bajo grado en el peritoneo. A largo plazo, estos mediadores pueden acabar provocando alteraciones estructurales en la membrana peritoneal, como la pérdida de la monocapa de células mesoteliales, la fibrosis submesotelial y la formación de nuevos vasos sanguíneos mediante angiogénesis. Estas alteraciones afectan a la permeabilidad del peritoneo y, como consecuencia, a su capacidad dialítica (18).



**Figura 1. Representación esquemática del tratamiento de diálisis peritoneal.** El líquido de diálisis se introduce en la cavidad peritoneal por medio de un catéter. El gradiente de concentración que se crea entre la sangre y el LD permite la ultrafiltración y difusión a través del peritoneo, que actúa como una membrana semipermeable. Finalmente, el líquido resultante es drenado a través del catéter. Imagen modificada de <https://www.kidney.org/content/what-peritoneal-dialysis>

Se ha demostrado que en respuesta a los LD las células mesoteliales del peritoneo comienzan a perder progresivamente su fenotipo epitelial y adquieren características fibroblásticas mediante un proceso denominado transición epitelio-mesenquimal (TEM) o

transdiferenciación (18, 20, 21). Una de las moléculas clave que promueve la TEM es TGF- $\beta$ , cuya activación y secreción se produce como respuesta al pH ácido y la elevada concentración de glucosa de los LD (20, 21). Este proceso comienza con la interrupción de las uniones entre las células mesoteliales y la pérdida de la polaridad apicobasal (18, 20, 21) que continúa con la activación de los fibroblastos dando lugar a los miofibroblastos, células con características intermedias entre un fibroblasto y una célula muscular lisa, que se caracterizan por la expresión de  $\alpha$ -actina del músculo liso ( $\alpha$ -SMA). Los miofibroblastos presentan una mayor capacidad migratoria e invasiva que les permite alcanzar el estroma submesotelial (18), donde comienzan a liberar diversos componentes de la matriz extracelular, citoquinas inflamatorias, proangiogénicas y profibróticas (17, 22) promoviendo el estrés oxidativo peritoneal y la inflamación, que mantenida en el tiempo puede dar lugar al desarrollo de la fibrosis (22).

Como ya se ha mencionado, los cambios estructurales que tienen lugar durante el tratamiento con diálisis peritoneal provocan la pérdida de la integridad del peritoneo y por tanto de su función dialítica, conduciendo al fallo de ultrafiltración y al fracaso de la técnica (18). Por ello, es imprescindible buscar estrategias que permitan conservar la integridad de la membrana peritoneal durante el mayor tiempo posible (16, 18, 21). En este sentido, la fibrosis tiene lugar como consecuencia de una respuesta inflamatoria prolongada. Así, la prevención de esta respuesta podría impedir el desarrollo de la fibrosis y conservar la integridad del peritoneo durante el tratamiento con diálisis peritoneal (18).

### **1.3 DISFUNCIÓN MITOCONDRIAL E INFLAMASOMA**

El contacto continuo de los LD con el peritoneo del paciente durante la DP provoca en la zona un aumento de ROS dando lugar a un estado de estrés oxidativo (23). La mitocondria juega un papel principal en el desarrollo de este estado, puesto que representa la fuente más importante de ROS. Además, las mitocondrias también son sensibles a estos compuestos, ya que causan una disfunción mitocondrial que a su vez provoca un aumento de la producción de ROS mitocondriales (ROSmt), generándose así un círculo vicioso de estrés oxidativo (22).

En el ámbito de la DP, se ha demostrado *ex vivo* que las células mesoteliales con fenotipo fibroblástico producen una mayor cantidad de ROSmt y que sus mitocondrias presentan una disminución del potencial de membrana mitocondrial en comparación con las células con características epiteliales, indicativo de que sufren un daño mitocondrial durante el proceso de TEM. Asimismo, se ha observado que la preincubación de las células mesoteliales con un secuestrador específico de ROSmt previene la TEM inducida por

TGF- $\beta$ . En conjunto, todo ello sugiere que la mitocondria juega un papel importante en la fisiopatología de la membrana peritoneal durante la terapia de DP (22).

Los ROSmt y el ADN mitocondrial (ADNmt) liberados por las mitocondrias dañadas (22) actúan como patrones moleculares asociados al daño (DAMPs; del inglés: *Damage-Associated Molecular Patterns*), que al igual que los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs; del inglés: *Pathogen-Associated Molecular Patterns*) son reconocidos por los receptores de reconocimiento de patrones (PRR; del inglés: *Pattern Recognition Receptors*) (24) y desencadenan cascadas de señalización que provocan la respuesta inflamatoria (22, 24) mediante la producción de interferón de tipo I (IFN) y de citoquinas proinflamatorias (25).

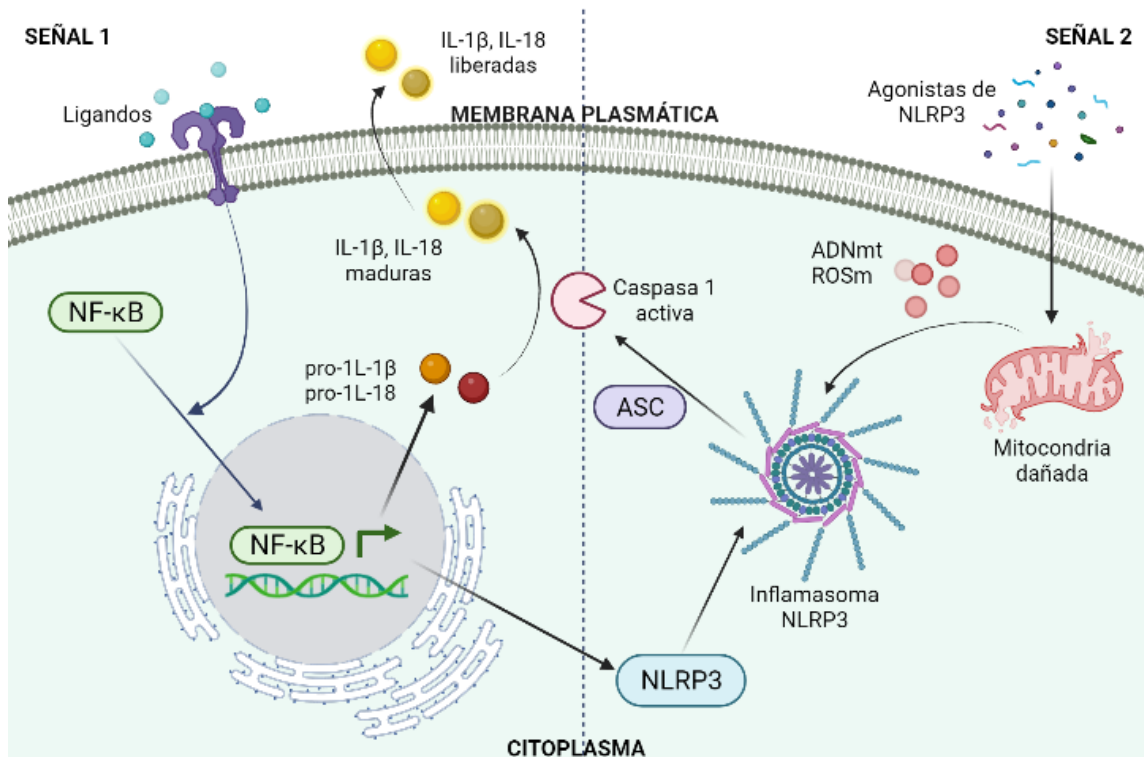
Los PRR pueden ser receptores transmembrana o intracelulares, y dentro de estos últimos se encuentran las proteínas de unión a nucleótidos ricas en repeticiones de leucina (NLR; del inglés: *Nod-like receptor*). Un subgrupo de estos NLR tiene la capacidad de disparar un mecanismo de defensa que consiste en el ensamblaje de complejos proteicos citosólicos denominados inflamomas (26), que provocan la activación de caspasa 1, dando lugar a la secreción de IL-1 $\beta$  e IL-18 y a la inducción de la piroptosis (24, 26).

Existen varios tipos de NLR y el mejor caracterizado es el NLRP3, que está compuesto por el NLRP3 como PRR, que actúa como sensor, la proteína adaptadora ASC y la procaspasa 1 como molécula efectora (24).

El modelo de activación de la vía de señalización del inflamoma NLRP3 consta de dos señales, tal y como se refleja en la **Figura 2**:

- Fase de cebado (señal 1): los PAMPs o DAMPs actúan como ligandos de los receptores tipo toll (TRL; del inglés: *Toll Receptor Like*) o de los receptores de citoquinas e inducen la activación y translocación al núcleo del factor nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B; del inglés: *Nuclear Factor  $\kappa$ B*), que promueve la transcripción de las formas pro-IL-1 $\beta$  y pro-IL-18, además del gen NLRP3 (24).
- Fase de activación (señal 2): la célula se expone a agonistas del NLRP3 (ATP, toxinas formadoras de poros, sustancias cristalinas, ácidos nucleicos, hialuronato y patógenos bacterianos, virales y fúngicos) (25, 26, 27) que inducen múltiples eventos de señalización molecular y celular que desencadenan la activación y ensamblaje del inflamoma. Entre estos eventos se encuentran el flujo de iones, el daño lisosomal, la disfunción mitocondrial, la producción de ROSmt (27, 28), la liberación de ADNmt o del fosfolípido mitocondrial cardiolipina y la liberación citosólica de catepsinas lisosomales (25, 26).

Cuando se produce la activación de las dos vías de señalización, la proteína NLRP3 se oligomeriza y se produce el reclutamiento de la proteína adaptadora ASC y la procaspasa 1. Posteriormente, la caspasa 1 se activa y escinde las citoquinas proinflamatorias IL-1 $\beta$  e IL-18 en sus formas maduras y biológicamente activas (28). Además, el inflamasoma NLRP3 ensamblado provoca la escisión de una proteína formadora de poros denominada Gasdermina D (GSDM), que da lugar a la piroptosis, un tipo de muerte celular en la que las células muestran una hinchazón citoplasmática y la ruptura de la membrana plasmática, con la consecuente liberación del contenido intracelular (24, 26).



**Figura 2. Representación esquemática de la vía de activación del inflamasoma.** Para la activación del inflamasoma se necesitan dos señales paralelas. La señal 1 permite la translocación del NF- $\kappa$ B al núcleo y la consecuente transcripción de los genes que codifican para NLRP3, pro-IL-1 $\beta$  y pro-IL-18. La señal 2 permite la activación de caspasa 1, que escinde las citoquinas inmaduras en sus formas biológicamente activas. Imagen creada con la aplicación *BioRender.com*

La producción de IL-1 $\beta$  es clave en el desarrollo de la respuesta inflamatoria y también puede desencadenar la activación de mediadores inflamatorios secundarios, como IL-6 y la proteína C reactiva. Así, la continua activación del inflamasoma NLRP3 aumenta la liberación de nuevos DAMPs, dando lugar a un bucle de retroalimentación, amplificando la respuesta inflamatoria (27).

Estudios recientes han relacionado la activación del inflamasoma con la peritonitis asociada al tratamiento con DP (29), y como ya hemos mencionado previamente, la mitocondria sufre un daño durante el proceso de TEM. Con relación a estas premisas, los ROSmt liberados como respuesta al daño mitocondrial podrían contribuir a generar un estado de estrés oxidativo en el peritoneo, y actuar como DAMPs, una de las señales efectoras de activación del inflamasoma. Por tanto, sería interesante conocer si la disfunción mitocondrial tiene algún efecto sobre la activación del inflamasoma en la fisiopatología de la membrana peritoneal durante el tratamiento con DP. De ser así, el mantenimiento de una población mitocondrial sana podría prevenir la activación del inflamasoma y con ello evitar el desarrollo de la respuesta inflamatoria que precede a la TEM de las células que conforman el peritoneo y al consecuente fallo de la ultrafiltración (22).

#### **1.4 RESVERATROL**

Las estrategias terapéuticas con compuestos presentes de manera natural en la dieta han sido ampliamente utilizadas a lo largo de la historia (30). Algunos de estos compuestos, como los polifenoles, presentan propiedades antioxidantes, por ejemplo, el resveratrol (3,5,4'-trihidroxiestilbeno) (RSV), que es producido por diversas plantas en respuesta a las infecciones y otras condiciones adversas. Su estructura química consiste en la unión de dos anillos aromáticos unidos por un doble enlace estireno (31), y se puede presentar en las formas *cis* y *trans*, aunque la forma *trans* es la más común en la naturaleza (30, 32). Este compuesto está presente en multitud de alimentos habituales en nuestra dieta, siendo las principales fuentes de RSV los arándanos, los cacahuetes, las uvas rojas, las moras, la soja, las granadas, el chocolate negro y los pistachos (32).

El RSV presenta una amplia gama de beneficios para la salud, entre las que destacan sus propiedades antioxidantes, neuroprotectoras, anticancerígenas, inmunomoduladoras, antienvjecimiento, cardioprotectoras, antiinflamatorias y antidiabéticas (30, 32). Por este motivo, en los últimos años, los profesionales sanitarios y nutricionistas han puesto gran atención en este compuesto (32).

Uno de los efectos del RSV más estudiado es su poder antioxidante mediante la eliminación de ROS y la regulación de las defensas antioxidantes de las células (30, 32). Además, el RSV también tiene la capacidad de modular la respuesta inflamatoria a través de la regulación de vías de señalización, como NF- $\kappa$ B, y de inhibir la producción de factores inflamatorios (32, 33).

Como se ha comentado previamente, no hay duda de que el estrés oxidativo y la respuesta inflamatoria juegan un papel clave en la fisiopatología de la membrana peritoneal durante el tratamiento con DP (22), por lo que sería de gran interés evaluar si el RSV podría prevenir la activación del inflammasoma gracias a sus propiedades antioxidantes.

## 2. OBJETIVOS

El objetivo de este estudio es evaluar el papel de la mitocondria en la activación del inflammasoma en células mesoteliales humanas, para lo que se estudiará, en concreto, el efecto de la disfunción mitocondrial en la activación de caspasa 1. Finalmente, se testará el efecto del resveratrol sobre este proceso.

## 3. MATERIAL Y MÉTODOS

### 3.1 AISLAMIENTO DE CÉLULAS MESOTELIALES PRIMARIAS DEL EFLUENTE PERITONEAL DE PACIENTES EN DIÁLISIS PERITONEAL

Las células mesoteliales se obtuvieron a partir de los efluentes peritoneales de pacientes en tratamiento con diálisis peritoneal de la Unidad de Diálisis del Complejo Hospitalario Universitario de A Coruña (CHUAC). En todos los casos, tras obtener el consentimiento informado de los pacientes, las muestras fueron codificadas con el fin de mantener su anonimato. El procedimiento fue aprobado por el Comité Ético de Investigación de A Coruña y Ferrol (Código de registro: 2014/454).

El procesamiento de los efluentes se realizó en condiciones de esterilidad, en una campana de flujo laminar. En primer lugar, se trasvasó el efluente peritoneal de los pacientes a recipientes de 500 ml y se centrifugaron a 1500 rpm durante 10 minutos (min). El sobrenadante se desechó y el *pellet* celular fue resuspendido en 5 ml de medio de cultivo *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI; *Corning*, EE. UU.) enriquecido con 20% de suero bovino fetal (SBF; *Corning*), previamente inactivado a 55 °C durante 45 min, y suplementado con 1% de penicilina-estreptomina (P/E; *Gibco*, EE. UU.) y 100U/ml de insulina humana (*Actrapid*, Dinamarca). A continuación, el líquido resultante se pasó a un tubo Falcon de 50 ml y se realizó una segunda centrifugación a 1500 rpm durante 10 min para obtener una muestra más limpia. Se volvió a desechar el sobrenadante y el *pellet*

se resuspendió en 5 ml de medio de cultivo, homogeneizando el contenido con la pipeta para asegurarnos de sembrar la misma densidad celular en todos los casos.

Las células mesoteliales obtenidas mediante este procedimiento son muy interesantes para realizar estudios *ex vivo*, puesto que proceden de la descamación del peritoneo de los pacientes y son representativas de su estado.

## **3.2 CULTIVO CELULAR Y ESTIMULACIÓN**

### **3.2.1 Cultivo celular**

Del volumen obtenido tras el aislamiento de las células mesoteliales, se sembraron 500  $\mu$ l por pocillo en una *chamber* (*Millicell*, Alemania) y se incubaron en la estufa a 37 °C con 5% de CO<sub>2</sub> y en humedad a saturación.

Además de las células mesoteliales, las muestras de efluente pueden contener otros tipos celulares, como las células sanguíneas. Por ello, 24 horas (h) después de sembrarlas, se realizó un lavado enérgico de los pocillos con medio de cultivo con el objetivo de eliminar las células sanguíneas que, a diferencia de las células mesoteliales, no se adhieren a la *chamber*. A partir de este momento, se renovó el medio cada dos días.

### **3.2.2 Depleción**

Cuando las células alcanzaron una confluencia del 80%, se deplecionaron, en condiciones de esterilidad, con el objetivo de mantenerlas en un estado quiescente para detener la división celular. Para ello, las células se lavaron con suero fisiológico y se añadieron 300  $\mu$ l de medio RPMI enriquecido con 1% de SBF inactivado y suplementado con 1% de P/E y 100U/ml de insulina humana a cada pocillo. Posteriormente se mantuvieron *overnight* en la estufa a 37 °C con 5% de CO<sub>2</sub> y humedad a saturación.

### **3.2.3 Estimulación**

Después de las 24 h de depleción, se renovó el medio con 300  $\mu$ l de medio de cultivo RPMI suplementado con 1% de SBF inactivado, 1% de P/E y 100U/ml de insulina humana y se procedió a la estimulación de las células con los reactivos que se recogen en la **Tabla 1**. Todo ello en condiciones de esterilidad en campana de flujo laminar.

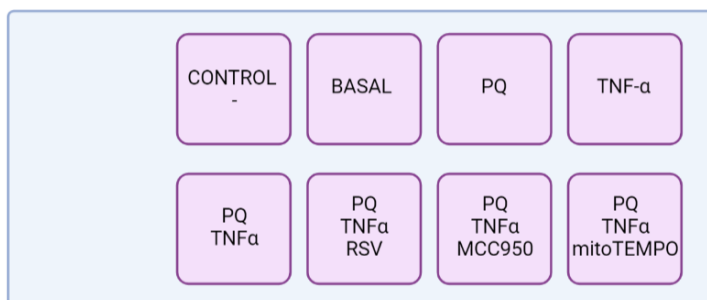
Se utilizó paraquat (PQ; *Sigma-Aldrich*, EE. UU.) para inducir la disfunción mitocondrial y el TNF- $\alpha$  (*R&D systems*, EE. UU.) como inductor de la respuesta inflamatoria, ya que

provoca la translocación de NF- $\kappa$ B al núcleo y la consecuente transcripción de NLRP3. Además, se empleó MCC950 (*Millipore*, EE. UU.) como un inhibidor selectivo de NLRP3; y mitoTEMPO (*Santa Cruz Biotechnology*, EE. UU.) como un secuestrador selectivo de ROSmt. Finalmente, se evaluó el tratamiento con resveratrol (RSV; *Sigma-Aldrich*) debido a sus propiedades antioxidantes y antiinflamatorias.

**Tabla 1. Estímulos y concentraciones empleados en las diferentes condiciones experimentales.**

Estímulo	Concentración
Paraquat	1 mM
TNF- $\alpha$	1 ng/ml
Resveratrol	5 $\mu$ M
MCC950	10 $\mu$ M
mitoTEMPO	10 $\mu$ M

En primer lugar, las células se preincubaron durante 30 min a 37 °C con RSV, MCC950 o mitoTEMPO y a continuación se añadió el paraquat durante 30 min. Finalmente, se incubaron las células con TNF- $\alpha$  durante 18 h en la estufa a 37 °C con 5% de CO<sub>2</sub> y humedad a saturación. La distribución de los estímulos en la *chamber* se puede observar en la **Figura 3**.



**Figura 3. Representación esquemática de la estimulación de la *chamber*.**

### 3.3 INMUNOFLUORESCENCIA

La detección de caspasa 1 activa se llevó a cabo mediante inmunofluorescencia indirecta. Esta técnica consiste en la unión de un anticuerpo primario a la proteína (antígeno), y la posterior unión de un anticuerpo secundario asociado a un fluoróforo. Finalmente, la placa se observó en un microscopio de fluorescencia.



### **3.3.1 Fijación de las células**

Tras el periodo de estimulación, se retiró el medio y se lavaron los pocillos dos veces con suero fisiológico. Posteriormente se fijaron las células con paraformaldehído (*ThermoFisher scientific*, EE. UU.) diluido al 4% durante 30 min a temperatura ambiente.

### **3.3.2 Permeabilización celular y bloqueo de uniones inespecíficas**

Se realizaron dos lavados con tampón fosfato salino (PBS; del inglés: *Phosphate Buffered Saline*) (*Dako*, Dinamarca) 1X y se llevó a cabo una incubación con PBS 1X con 0,5% de Triton® (*Fisher Scientific*, EE. UU.) (PBST) durante 10 min para permeabilizar la membrana celular y otra con PBST con un 0,2% de seroalbúmina bovina (BSA; *Sigma-Aldrich*) durante 10 min para bloquear las uniones inespecíficas.

### **3.3.3 Incubación de anticuerpos**

Se realizó una incubación de 2 h a temperatura ambiente con el anticuerpo primario *rabbit anti-caspasa 1* (*Affinity Biosciences*, EE. UU.) a una concentración 1:250 en PBST, a excepción del control negativo.

Posteriormente, se realizaron tres lavados de 5 min con PBST seguidos de una incubación de 1 h a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario *donkey anti-rabbit Alexa Fluor™ 568* (*Invitrogen*, EE. UU.) a una concentración 1:400 en PBS 1X. En el pocillo correspondiente al control negativo se realizó la incubación de anticuerpo secundario en ausencia de anticuerpo primario. A partir de aquí, el protocolo se llevó a cabo en oscuridad.

### **3.3.4 Tinción nuclear con DAPI**

Tras realizar tres lavados con PBS 1X durante 5 min, el siguiente paso consistió en incubar las células durante 1 min con una dilución 1:500 de 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI; *Sigma-Aldrich*), un marcador fluorescente que se une al DNA para poder visualizar los núcleos celulares. Después, se realizó un lavado con PBS 1X (5 min), otro con agua destilada (5 min) y se desmontó la *chamber* cubriendo el portaobjetos resultante con 4 gotas de glicergel (*Dako*) previamente atemperado a 60 °C. Finalmente, se colocó un cubreobjetos cuidadosamente para evitar la formación de burbujas.

### 3.3.5 Análisis mediante microscopía y cuantificación de la señal

Para la visualización de las muestras, se empleó un microscopio *Olympus BX61* (*Olympus*, Japón) con el que se tomaron las imágenes que posteriormente fueron analizadas y cuantificadas con el programa informático *ImageJ* versión 1.50e (*NIH*, EE. UU.).

### 3.3.6 Estudio descriptivo

Los datos procedentes de la cuantificación de imágenes realizada con el programa *ImageJ* se trataron en el software *GraphPad PRISM®* versión 5.01 (*GraphPad Software*, EE. UU.). Los datos representados gráficamente se corresponden con la media $\pm$ EEM (error estándar de la media) (n=2).

## 4. RESULTADOS

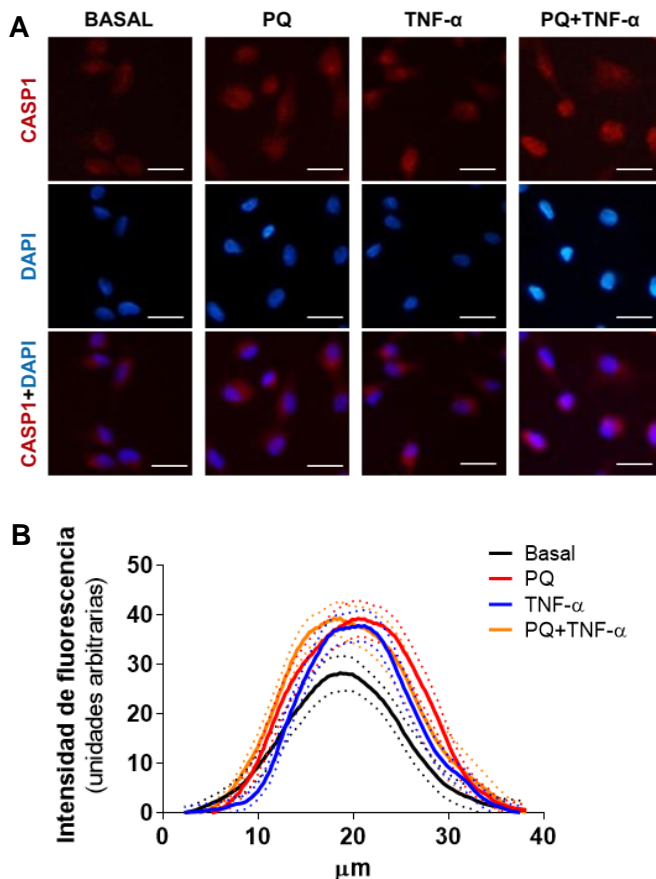
### 4.1 EFECTO DE LA DISFUNCIÓN MITOCONDRIAL Y LA INFLAMACIÓN SOBRE LA EXPRESIÓN DE CASPASA 1

La bioincompatibilidad de los LD provoca en el peritoneo una respuesta inflamatoria de bajo grado durante el tratamiento con DP y, como consecuencia, se produce un aumento de la expresión de citoquinas proinflamatorias en la zona (18). En este contexto, los niveles de citoquinas como IL-18 (34) o IL-1 $\beta$  en el efluente de diálisis actúan como biomarcadores de la inflamación peritoneal, cuya maduración precisa de la activación de caspasa 1. Asimismo, se ha descrito que las células mesoteliales sufren un daño mitocondrial durante la TEM que tiene lugar como consecuencia del tratamiento, que se caracteriza por un aumento de la producción de ROSmt (22) por parte de las células mesoteliales. En base a estos antecedentes, en primer lugar, se evaluó el efecto de la disfunción mitocondrial y la inflamación sobre la activación de caspasa 1. Para simular el posible escenario que tiene lugar en el peritoneo durante la DP, las células mesoteliales de pacientes fueron tratadas con el inductor de disfunción mitocondrial paraquat y la citoquina proinflamatoria TNF- $\alpha$ , para finalmente determinar la expresión proteica de caspasa 1 mediante inmunofluorescencia indirecta.

En las **Figura 3 A y B** se observa que la disfunción mitocondrial inducida por paraquat tuvo la capacidad de aumentar *per se* la señal de caspasa 1 en comparación con la condición basal. Del mismo modo, la inducción de la respuesta inflamatoria con TNF- $\alpha$  se correspondió con un aumento de la activación de la proteína de interés. Cuando las

células fueron estimuladas con ambos compuestos, se observó una respuesta de intensidad similar a la obtenida con los estímulos por separado.

Estos resultados sugieren que tanto el daño mitocondrial como la respuesta inflamatoria tienen la capacidad de inducir la expresión proteica de caspasa 1.

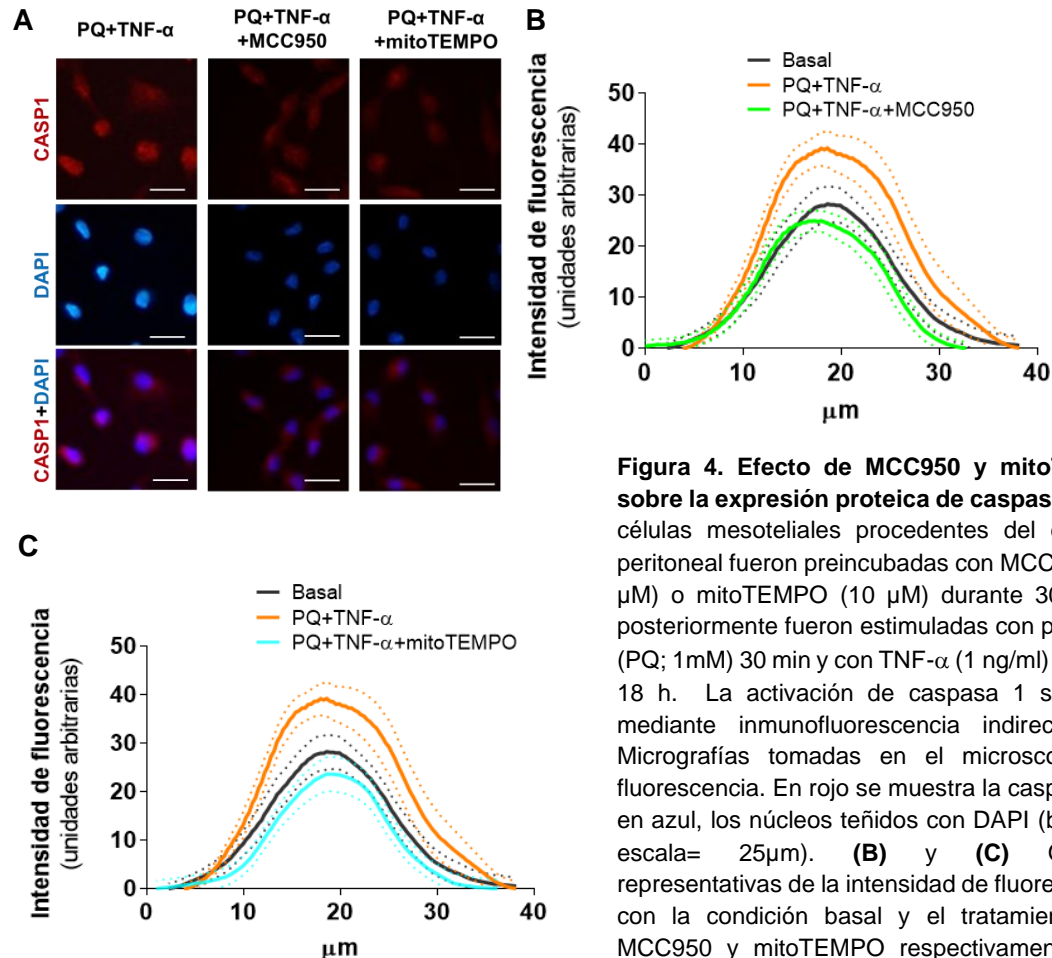


**Figura 3. Efecto de la disfunción mitocondrial y la respuesta inflamatoria sobre la expresión proteica de caspasa 1.** Las células mesoteliales procedentes del efluente peritoneal de pacientes en DP fueron sembradas en una *chamber* y aquellas con fenotipo epitelial fueron deplecionadas *overnight* tras alcanzar el 80% de confluencia. A continuación, las células fueron preincubadas con paraquat (PQ; 1 mM) durante 30 min y estimuladas 18 h con TNF- $\alpha$  (1 ng/ml). Finalmente, la activación de caspasa 1 se midió mediante inmunofluorescencia indirecta (n=2). **(A)** Micrografías tomadas en el microscopio de fluorescencia. En rojo se muestra la caspasa 1 y en azul, los núcleos teñidos con DAPI (barra de escala= 25 $\mu$ m). **(B)** Gráfica representativa de la intensidad de fluorescencia correspondiente a la expresión proteica de caspasa 1. Las líneas continuas representan la media de intensidad y las discontinuas el error estándar.

## 4.2 MEDIADORES IMPLICADOS EN LA ACTIVACIÓN DE CASPASA 1 INDUCIDA POR PARAQUAT Y TNF- $\alpha$

Como ya se ha comentado, la activación del inflamasoma NLRP3 necesita dos señales para que se produzca la oligomerización de la proteína NLRP3 y el reclutamiento de ASC y procaspasa 1, cuya activación da lugar a las formas activas de IL-1 $\beta$  e IL-18 (28). Tras comprobar que tanto la respuesta inflamatoria como el daño mitocondrial induce la expresión proteica de caspasa 1, se evaluó la implicación del inflamasoma NLRP3 en la activación de esta proteína, y para ello se utilizó el inhibidor específico de NLRP3 MCC950. Como era de esperar, en las **Figuras 4 A y B** se puede apreciar que el tratamiento de las células con este compuesto disminuyó la intensidad de la señal hasta

alcanzar valores próximos al basal. Este resultado muestra que la inhibición de NLRP3 reduce la expresión de caspasa 1 activa.

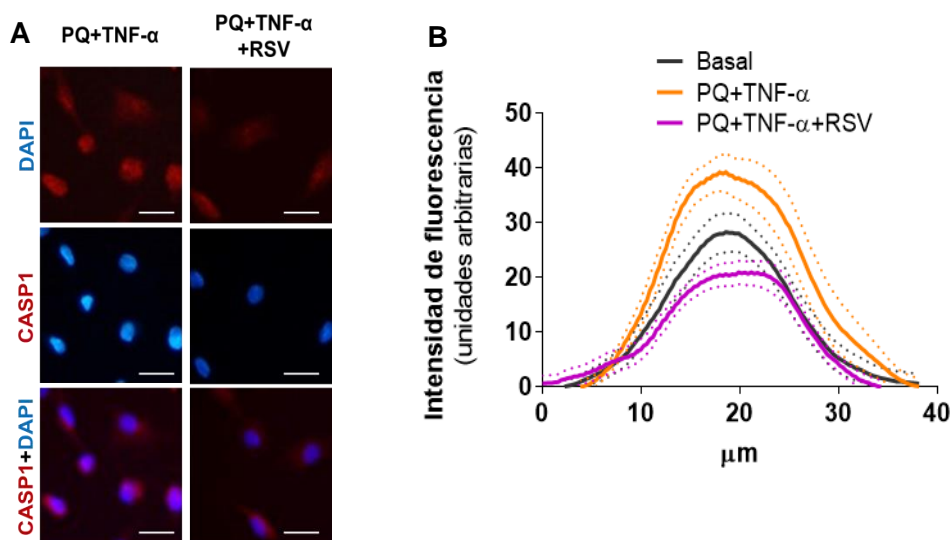


**Figura 4. Efecto de MCC950 y mitoTEMPO sobre la expresión proteica de caspasa 1.** Las células mesoteliales procedentes del efluente peritoneal fueron preincubadas con MCC950 (10  $\mu\text{M}$ ) o mitoTEMPO (10  $\mu\text{M}$ ) durante 30 min y posteriormente fueron estimuladas con paraquat (PQ; 1mM) 30 min y con TNF- $\alpha$  (1 ng/ml) durante 18 h. La activación de caspasa 1 se midió mediante inmunofluorescencia indirecta. **(A)** Micrografías tomadas en el microscopio de fluorescencia. En rojo se muestra la caspasa 1 y en azul, los núcleos teñidos con DAPI (barra de escala= 25 $\mu\text{m}$ ). **(B)** y **(C)** Gráficas representativas de la intensidad de fluorescencia con la condición basal y el tratamiento con MCC950 y mitoTEMPO respectivamente. Las líneas continuas representan la media de intensidad y las líneas discontinuas el error estándar.

Otro de los efectos nocivos que provoca el LD en el peritoneo es la estimulación de la producción de ROS, contribuyendo al estado de estrés oxidativo, que actúa como uno de los desencadenantes de la respuesta inflamatoria durante el tratamiento con DP. A su vez, los ROS pueden actuar como DAMPs, una de las señales que puede desencadenar la activación de NLRP3. Ya que las mitocondrias son los principales productores de ROS, en el siguiente bloque de resultados se evaluó la implicación de los ROS mitocondriales en la activación de caspasa 1, para lo que se empleó el sequestrador selectivo de ROSmt mitoTEMPO. Como se puede observar en las **Figuras 4 A** y **C**, la intensidad de la señal disminuyó con respecto a la obtenida con la estimulación con paraquat y TNF- $\alpha$ , sugiriendo que los ROSmt están implicados en la ruta de activación de caspasa 1.

### 4.3 EFECTO DEL RESVERATROL SOBRE LA ACTIVACIÓN DE CASPASA 1 INDUCIDA POR PARAQUAT Y TNF- $\alpha$

El RSV es un compuesto natural que está presente en nuestra dieta, cuyos efectos han sido muy estudiados debido a sus propiedades antiinflamatorias y antioxidantes. Ya que los resultados obtenidos en los apartados anteriores sugieren que la disfunción mitocondrial por paraquat y la inflamación provocada por TNF- $\alpha$  inducen la activación de caspasa 1, y que los ROSmt están implicados en este proceso, se empleó el RSV para comprobar si sus propiedades antioxidantes y antiinflamatorias podrían prevenir la activación del inflamasoma.



**Figura 5. Efecto del resveratrol sobre la expresión proteica de caspasa 1.** Las células mesoteliales procedentes del efluente peritoneal de pacientes en DP fueron preincubadas con resveratrol (RSV; 5  $\mu$ M) durante 30 min y a continuación se estimularon con paraquat (PQ; 1 mM) 30 min y con TNF- $\alpha$  (1 ng/ml) 18 h. **(A)** Micrografías tomadas en el microscopio de fluorescencia. En rojo se muestra la caspasa 1 y en azul, los núcleos teñidos con DAPI (barra de escala= 25  $\mu$ m). **(B)** Gráfica representativa de la intensidad de fluorescencia correspondiente a la expresión proteica de caspasa 1. Las líneas continuas representan la media de intensidad y las líneas discontinuas el error estándar.

Como se observa en las **Figuras 5 A** y **B** la preincubación con este polifenol natural disminuyó la expresión proteica de caspasa 1 inducida por paraquat y TNF- $\alpha$ . Estos resultados sugieren que el RSV tiene la capacidad de prevenir la activación de caspasa 1 en células mesoteliales humanas y, por tanto, la activación del inflamasoma.

## 5. DISCUSIÓN

La DP es un tratamiento renal sustitutivo domiciliario que se presenta como una buena alternativa a la HD (17, 19), puesto que además de suponer un menor coste al sistema de sanidad público, se asocia con una menor disminución de la función renal residual (19) siendo los resultados de ambas técnicas similares en términos de eficacia (17, 19). Pese a ello, la bioincompatibilidad de los LD y las posibles infecciones pueden llevar a la pérdida de la integridad del peritoneo y, en última instancia, al fracaso de la técnica (18).

Los LD presentan un pH ácido y un alto contenido en glucosa que, junto a sus productos de degradación, conduce al desarrollo del estrés oxidativo e inflamación en el peritoneo (17). Durante estos procesos son liberados diversos factores que pueden provocar alteraciones estructurales de la membrana peritoneal, que a su vez pueden afectar a la permeabilidad del peritoneo (18).

Como respuesta al contacto continuo de los LD, las células mesoteliales sufren un proceso de transdiferenciación, durante el cual comienzan a adquirir características fibroblásticas y pierden su fenotipo epitelial de manera progresiva (18, 20, 21). Los miofibroblastos resultantes, a su vez, también liberan una serie de compuestos que promueven la inflamación y el estrés oxidativo en el peritoneo (17, 22). En este sentido, el estrés oxidativo se genera como consecuencia del desequilibrio entre la producción de ROS y los mecanismos de defensa celulares antioxidantes, por lo que la mitocondria juega un papel crucial al ser la fuente principal de estas señales (22, 23). Se ha demostrado que las células mesoteliales del efluente peritoneal de pacientes en DP que han sufrido el proceso de TEM producen ROSmt en mayores cantidades, y que además se produce una despolarización de la membrana de sus mitocondrias. Esto sugiere que la mitocondria juega un papel central en la fisiopatología de la membrana peritoneal durante el tratamiento con DP, debido a su implicación en el mantenimiento de la integridad de la membrana peritoneal (22).

El daño mitocondrial tiene como consecuencia la liberación de ROSmt y ADNmt, que actúan como DAMPs y desencadenan el desarrollo de la respuesta inflamatoria (22, 24). Estas señales pueden ser reconocidas por receptores intracelulares, como el inflamasoma NLRP3, cuya activación provoca la activación de caspasa 1 y la consecuente escisión y secreción de las citoquinas proinflamatorias IL-1 $\beta$  e IL-18 en sus formas maduras (24, 26, 28). Por lo tanto, la disfunción mitocondrial podría estar implicada en la activación del inflamasoma y, en consecuencia, en el desarrollo de la respuesta inflamatoria (22).

Con el fin de inducir la disfunción mitocondrial en las células mesoteliales procedentes de los efluentes peritoneales de pacientes en DP, se empleó paraquat, un reactivo muy tóxico para los seres humanos y los animales que se acumula en los pulmones, el hígado y los riñones (35). Uno de los principales mecanismos de toxicidad de este compuesto es la inducción del estrés oxidativo con generación de ROS e inflamación mediante el aumento de la secreción de citoquinas proinflamatorias (35, 36). Prueba de ello es que estudios previos han demostrado un aumento de la producción de ROS en células epiteliales tubulares renales después de su tratamiento con paraquat (36). En este trabajo, hemos observado que la disfunción mitocondrial inducida por paraquat produce un aumento de la expresión proteica de caspasa 1. Se ha visto que dicho compuesto también activa el inflamasoma NLRP3 en células epiteliales tubulares de riñón de rata, con la consecuente activación de caspasa 1 y la secreción de IL-1 $\beta$  e IL-18 (36). Además, se observó que la activación de NLRP3 está regulada por el factor nuclear NF- $\kappa$ B, que recientemente ha sido descrito como uno de los mediadores implicados en el agravamiento de la respuesta inflamatoria por disfunción mitocondrial en células mesoteliales humanas (37). Otros trabajos realizados en células mesoteliales de rata también han mostrado un aumento tiempo dependiente de la expresión de ARNm de NLRP3 y caspasa 1 en respuesta al tratamiento con paraquat (35). Por tanto, nuestros resultados son coherentes con la literatura existente hasta el momento.

Para poder evaluar el efecto de la inflamación sobre la expresión de caspasa 1 se utilizó el mediador inflamatorio TNF- $\alpha$ . En este trabajo, se ha visto que el tratamiento de las células mesoteliales con dicho factor promueve un aumento de la expresión de caspasa 1. Estos resultados coinciden con los obtenidos en otros estudios (38) en los que se ha observado que la exposición de una línea celular de neuroblastoma humano a TNF- $\alpha$  promueve la activación de caspasa 1 y que, además, este proceso es activado principalmente por el estrés oxidativo generado por el aumento de la producción de ROSmt (38).

Las células estimuladas con paraquat y TNF- $\alpha$  mostraron una respuesta similar a la obtenida al utilizar ambos estímulos por separado. Como ya se ha mencionado previamente, para activar el inflamasoma son necesarias dos señales, una de cebado y otra de activación, y por ello, al estimular las células mesoteliales humanas con paraquat y TNF- $\alpha$ , esperábamos que la expresión de caspasa 1 fuese superior a la obtenida con ambos estímulos por separado. Una posible explicación a este resultado es que TNF- $\alpha$  podría provocar un daño mitocondrial en las células mesoteliales, y que por ello la respuesta sea similar a la obtenida con el tratamiento con paraquat. Del mismo modo, podría suceder que el paraquat esté induciendo una respuesta inflamatoria fruto de su

efecto prooxidante, y que por ello obtengamos resultados similares a los obtenidos al tratar las células con TNF- $\alpha$ . Sin embargo, sería necesario realizar más estudios para poder afirmar esta hipótesis.

Una vez que observamos que la disfunción mitocondrial y la inflamación inducen la activación de caspasa 1, el siguiente paso fue evaluar los posibles mediadores implicados en este proceso.

El compuesto MCC950 es un inhibidor selectivo del inflamasoma NLRP3, puesto que impide su activación, reduciendo en consecuencia la respuesta inflamatoria. En un estudio (39) sobre el efecto farmacológico de MCC950 realizado en un modelo experimental de lesión de la médula espinal se analizó el ensamblaje del inflamasoma NLRP3 y la liberación de citoquinas proinflamatorias. Expusieron ratones a la privación de oxígeno y glucosa y a lipopolisacáridos y observaron un aumento de la actividad del inflamasoma y liberación TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-18. Sin embargo, cuando estos ratones se trataron con MCC950 experimentaron una reducción en el ensamblaje de los complejos NLRP3-ASC y NLRP3-procaspasa 1, así como de las citoquinas proinflamatorias (39). Nuestros resultados concuerdan con los obtenidos en este estudio, ya que el tratamiento con MCC950 provocó una disminución de la expresión de caspasa 1 en las células mesoteliales procedentes del efluente peritoneal de pacientes en DP estimuladas con paraquat y TNF- $\alpha$ . Esta disminución podría estar relacionada con el bloqueo del ensamblaje de NLRP3-procaspasa 1, necesario para la activación de caspasa 1, pero sería necesario realizar más estudios para poder confirmarlo.

Hay evidencias de que tanto la disfunción mitocondrial como el inflamasoma desempeñan un papel importante en la progresión de la ERC (40). Por ejemplo, en un modelo animal de daño renal inducido por aldosterona, los ratones mostraron un deterioro de la función renal, un aumento de la producción de ROSmt y una mayor activación del inflamasoma NLRP3. Además, sus mitocondrias presentaban alteraciones como la hinchazón y crestas desorganizadas y fragmentadas. Sin embargo, cuando los ratones fueron pretratados con el secuestrador de ROSmt mitoTEMPO mostraron mejores resultados en cuanto a función renal, así como una disminución en la acumulación de ROSmt y una notable disminución de la activación del inflamasoma NLRP3 (40). La producción de ROSmt también se ha relacionado con patologías como la miocardiopatía diabética o la diabetes, por lo que estrategias terapéuticas dirigidas a los ROSmt podrían ser beneficiosas para prevenir estas enfermedades al disminuir el estrés oxidativo (41). Estos resultados concuerdan con los obtenidos en este trabajo, ya que el pretratamiento de las células mesoteliales de pacientes en DP con mitoTEMPO mostraron una reducción notable de la señal de caspasa 1 inducida por paraquat y TNF- $\alpha$ . Así, la reducción del nivel de ROSmt,



que pueden actuar como DAMPs participando en la activación del inflamasoma NLRP3, podría prevenir la posterior activación de caspasa 1.

El RSV es un compuesto natural presente en numerosas plantas que se encuentran habitualmente en nuestra dieta (30, 31), conocido por sus propiedades beneficiosas con carácter antiinflamatorio, antioxidante, neuroprotector y anticancerígeno (30, 32). Estudios realizados en macrófagos mostraron que el RSV reduce la expresión de caspasa 1 e IL-1 $\beta$  inducidas por ATP mediante la inhibición de ROSmt (42). En cuanto a la disfunción mitocondrial, también se comprobó que el RSV reduce la liberación de ADNmt al citosol provocada por una sobreproducción de ROSmt, que promueve un aumento de la permeabilidad de la membrana mitocondrial liberando su material genético, que a su vez es uno de los activadores del complejo inflamasoma NLRP3. Todo esto indica que la estabilización mitocondrial es clave en la reducción de la activación del inflamasoma NLRP3 (42). En base a estos antecedentes y ya que durante el tratamiento con DP se desarrolla un estado de estrés oxidativo y una respuesta inflamatoria de bajo grado en el peritoneo (18), además de una disfunción mitocondrial en las células que revisten el peritoneo (22), nos pareció interesante testar el efecto del RSV sobre la activación del inflamasoma, ya que juega un papel clave en la maduración de las citoquinas proinflamatorias IL-1 $\beta$  e IL-18. Como resultado, observamos que el tratamiento con RSV redujo la expresión proteica de caspasa 1 inducida por paraquat y TNF- $\alpha$  en las células mesoteliales procedentes del efluente peritoneal de pacientes en DP, posiblemente mediante los mecanismos anteriormente citados.

En conjunto, los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que la disfunción mitocondrial está implicada en la activación del inflamasoma, ya que la estimulación con el prooxidante paraquat induce *per se* un aumento de la expresión de caspasa 1. Por otra parte, la citoquina proinflamatoria TNF- $\alpha$  también incrementa la activación de caspasa 1, sin embargo, no se obtuvo un aumento sinérgico al combinar ambos estímulos. Asimismo, se observó que tanto NLRP3 como los ROS derivados de la mitocondria están implicados en la activación de la producción de caspasa 1, por lo que el mantenimiento de una población mitocondrial sana podría prevenir la respuesta inflamatoria por activación del inflamasoma NLRP3 en el peritoneo de los pacientes en DP. Por último, testamos el efecto del antioxidante natural RSV sobre la expresión de caspasa 1 y observamos una reducción de su activación que alcanzó niveles cercanos a los basales. Por tanto, el resveratrol podría ser una buena estrategia terapéutica para prevenir el fallo de la técnica de DP derivado de la pérdida de la integridad de la membrana peritoneal.

Finalmente, cabe destacar que los resultados obtenidos durante este trabajo no alcanzaron la significancia estadística y sería necesario aumentar el número de experimentos para poder afirmar estas hipótesis.

## 6. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos sugieren que la disfunción mitocondrial está implicada en la activación del inflammasoma, ya que la estimulación con el prooxidante paraquat y la citoquina proinflamatoria TNF- $\alpha$  induce un aumento de la expresión de caspasa 1. Además, se ha visto que NLRP3 y los ROSmt están implicados en la activación de la producción de caspasa 1. Estos datos apuntan a que el mantenimiento de una población mitocondrial sana podría ser una buena manera de evitar la inflamación, consecuencia de la activación del inflammasoma NLRP3. Se ha descrito al resveratrol como una buena estrategia terapéutica para prevenir la respuesta inflamatoria en el peritoneo, ya que los niveles de expresión de caspasa 1 descendieron al tratar las células mesoteliales de pacientes en terapia con DP con este polifenol natural.

El presente trabajo supone un punto de inicio, pero en un futuro sería necesario aumentar el tamaño muestral y hacer uso de marcadores de disfunción mitocondrial para poder corroborar la interpretación de los resultados obtenidos.

## CONCLUSIÓNS

Os resultados obtidos suxiren que a disfunción mitocondrial está implicada na activación do inflammasoma, xa que a estimulación co prooxidante paraquat e a citocina proinflamatoria TNF- $\alpha$  induce un aumento da expresión de caspasa 1. Ademais, viuse que NLRP3 e os ROSmt están implicados na activación da produción de caspasa 1. Estes datos apuntan a que o mantemento dunha poboación mitocondrial sa podería ser unha boa forma de evitar a inflamación, consecuencia da activación do inflammasoma NLRP3. O resveratrol podería ser unha boa estratexia terapéutica a seguir para previr a resposta inflamatoria no peritoneo, xa que os niveis de expresión da caspasa 1 diminuíron cando as células mesoteliais de pacientes en terapia de DP foron tratadas con este polifenol natural.

O presente traballo supón un punto de partida, pero no futuro cómpre aumentar o tamaño da mostra e facer uso de marcadores de disfunción mitocondrial para poder corroborar a interpretación dos resultados obtidos.

## CONCLUSIONS

The results suggest that mitochondrial dysfunction is involved in inflammasome activation, as stimulation with the prooxidant paraquat and the proinflammatory cytokine TNF- $\alpha$  induces an increase in caspase 1 expression. Furthermore, NLRP3 and mtROS have been shown to be involved in the activation of caspase 1 production. These data suggest that maintaining a healthy mitochondrial population may be a good way to prevent inflammation as a consequence of NLRP3 inflammasome activation. Resveratrol has been described as a good therapeutic strategy to prevent inflammatory response in the peritoneum, as caspase 1 expression levels decreased when mesothelial cells from patients on PD therapy were treated with this natural polyphenol.

The present study is a starting point, but in the future, it would be necessary to increase the sample size and make use of mitochondrial dysfunction markers to corroborate the interpretation of the results.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

1. Banco Mundial-Desarrollo sostenible, resiliencia y crecimiento económico. 2018 [citado 2022 Jun 7]. Disponible en: <https://www.bancomundial.org/es/home>
2. United Nations Department of Public Information. New York: United Nations. Nota de prensa, Creciendo a un ritmo menor, se espera que la población mundial alcanzará 9.700 millones en 2050 y un máximo de casi 11.000 millones alrededor de 2100: informe de la ONU, 17 junio 2019 [citado 19 mayo 2022]. Disponible en: [https://population.un.org/wpp/Publications/Files/WPP2019\\_PressRelease\\_ES.pdf](https://population.un.org/wpp/Publications/Files/WPP2019_PressRelease_ES.pdf)
3. Pérez J, Abellán A, Aceituno P, Ramiro D. Un perfil de las personas mayores en España, 2020. Indicadores estadísticos básicos. Madrid: Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Centro de Ciencias Humanas y Sociales (CCHS); 2020 [citado 2022 May 19]. Disponible en: <http://envejecimiento.csic.es/documentos/documentos/enred-indicadoresbasicos2020.pdf>
4. Fernández JL, Parapar C, Ruíz M. Population ageing. *Lychnos* (Madrid). 2010; 02:6-11 [citado 2022 May 19]. Disponible en: [https://fgcsic.es/lychnos/upload/publicacion.6.ficPDF\\_ingles.Lychnos\\_02\\_eng.pdf](https://fgcsic.es/lychnos/upload/publicacion.6.ficPDF_ingles.Lychnos_02_eng.pdf)
5. Envejecimiento, enfermedades crónicas y factores de riesgo: una mirada en el tiempo. Santiago de Chile: Observatorio del Envejecimiento para un Chile con futuro; 2021 p. Informe nº: Año 2, v. 8, 2021. [citado 2022 May 19]. Disponible en: <https://observatorioenvejecimiento.uc.cl/wp-content/uploads/2021/06/Reporte-Envejecimiento-enfermedades-cro%CC%81nicas-y-factores-de-riesgo.pdf>
6. Tonelli M, Riella M. Chronic kidney disease and the aging population. *Am J Nephrol*. 2014; 39:248–251. <https://doi.org/10.1159/000359957>
7. Levey A, de Jong PE, Coresh J, Nahas ME, Astor BC, Matsushita K, *et al*. The definition, classification, and prognosis of chronic kidney disease: a KDIGO Controversies Conference report. *Kidney Int*. 2011; 80(1): 17-28. <https://doi.org/10.1038/ki.2010.483>
8. Gabinete de comunicación de la Sociedad Española de Nefrología. Madrid: Sociedad Española de Nefrología. Nota de prensa, La enfermedad renal crónica (ERC) alcanza ya a siete millones de españoles, pero podría prevenirse actuando contra sus factores riesgo como la diabetes, la hipertensión, la obesidad o el tabaquismo, 14 marzo 2019 [citado 2022 Jun 7]. Disponible en: <https://www.semfy.com/prensa/la-enfermedad-renal-cronica-erc-alcanza-ya-a-7-millones-de-espanoles-pero-podria-prevenirse-actuando-contrasusfactoresriesgo-como-la-diabetes-la-hipertension-la-obesidad-o-el-tabaquismo/>
9. La enfermedad renal crónica en España 2022. Sociedad Española de Nefrología. 2022 [citado 2022 May 19]. Disponible en: <https://www.seden.org/documentos/la-enfermedad-renal-cronica-erc-en-espana-2022>

10. Voora S, Adey DB. Management of kidney transplant recipients by general nephrologists: core curriculum 2019. *Am J Kidney Dis.* 2019; 73(6): 866-879. <https://doi.org/10.1053/j.ajkd.2019.01.031>
11. Augustine J. Kidney transplant: new opportunities and challenges. *Cleve Clin J Med.* 2018; 85(2): 138-144. <https://doi.org/10.3949/ccjm.85gr.18001>
12. Registro Español de Enfermos Renales (REER): Informe 2020 – datos preliminares. Sociedad Española de Nefrología; 2021 [citado 2022 Jun 7]. Disponible en: <https://www.senefro.org/modules.php?name=webstructure&idwebstructure=29>
13. Vadakedath S, Kandi V. Dialysis: a review of the mechanisms underlying complications in the management of chronic renal failure. *Cureus.* 2017; 9(8): e1603. <https://doi.org/10.7759/cureus.1603>
14. Arrieta J. Evaluación económica del tratamiento sustitutivo renal (hemodiálisis, diálisis peritoneal y trasplante) en España. *Nefrología.* 2010 [citado 2022 May 7]; 1(1):37-47. Disponible en: <https://www.revistanefrologia.com/es-evaluacion-economica-del-tratamiento-sustitutivo-articulo-X2013757510002348>
15. Pérez-Fontán M, Rodríguez-Carmona A. Visión general e histórica de la diálisis peritoneal. *Nefrología al Día.* 2022 [citado 2022 May 13]. Disponible en: <https://www.nefrologiaaldia.org/es-articulo-vision-general-e-historica-dialisis-460>
16. López-Cabrera M. Mesenchymal conversion of mesothelial cells is a key event in the pathophysiology of the peritoneum during peritoneal dialysis. *Adv Med.* 2014: 473134. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/473134>
17. Bartosova M, Schmitt CP. Biocompatible peritoneal dialysis: the target is still way off. *Front Physiol.* 2019; 9:1853. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.01853>
18. Aroeira LS, Aguilera A, Sánchez-Tomero JA, Bajo MA, del Peso G, Jiménez-Heffernan JA, *et al.* Epithelial to mesenchymal transition and peritoneal membrane failure in peritoneal dialysis patients: pathologic significance and potential therapeutic interventions. *J Am Soc Nephrol.* 2007; 18(7):2004-2013. <https://doi.org/10.1681/asn.2006111292>
19. François K, Bargman JM. Evaluating the benefits of home-based peritoneal dialysis. *Int J Nephrol Renovasc Dis.* 2014; 7:447-455. <https://doi.org/10.2147/ijnrd.s50527>
20. Selgas R, Bajo A, Jiménez-Heffernan JA, Sánchez-Tomero JA, del Peso G, Aguilera A, *et al.* Epithelial-to-mesenchymal transition of the mesothelial cell—its role in the response of the peritoneum to dialysis. *Nephrol Dial Transplant.* 2006; 21(2):ii2-7. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfl183>
21. Aguilera A, Yáñez-Mo M, Selgas R, Sánchez-Madrid F, López-Cabrera M. Epithelial to mesenchymal transition as a triggering factor of peritoneal membrane fibrosis and angiogenesis in peritoneal dialysis patients. *Curr Opin Investig Drugs.* 2005; 6(3):262-268. *Citado en: PubMed; PMID 15816502.*

22. Ramil-Gómez O, Rodríguez-Carmona A, Fernández-Rodríguez JA, Pérez-Fontán M, Ferreiro-Hermida T, López-Pardo M. Mitochondrial dysfunction plays a relevant role in pathophysiology of peritoneal membrane damage induced by peritoneal dialysis. *Antioxidants*. 2021; 10(3):447. <https://doi.org/10.3390/antiox10030447>
23. Hung KY, Liu SY, Yang TC, Liao TL, Kao SH. High-dialysate-glucose-induced oxidative stress and mitochondrial-mediated apoptosis in human peritoneal mesothelial cells. *Oxid Med Cell Longev*. 2014; 2014:642793. <https://doi.org/10.1155/2014/642793>
24. Alsadiq AA, Saturnino MH, Teodoro T. The role of NLRP3 inflammasome activation in the epithelial to mesenchymal transition process during the fibrosis. *Front Immunol*. 2020; 11:883. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00883>
25. Guo H, Callaway JB, Ting JP. Inflammasomes: mechanism of action, role in disease, and therapeutics. *Nat Med*. 2015; 21(7):667-687. <https://doi.org/10.1038/nm.3893>
26. Lamkanfi M, Dixit VM. Mechanisms and functions of inflammasomes. *Cell*. 2014; 157(5):1013-22. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.04.007>
27. Bai B, Yang Y, Wang Q, Li M, Tian C, Liu Y. NLRP3 inflammasome in endothelial dysfunction. *Cell Death Dis*. 2020; 11(9):776. <https://doi.org/10.1038/s41419-020-02985-x>
28. 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. <https://doi.org/10.3390/ijms20133328>
29. Hautem N, Morelle J, Sow A, Corbet C, Feron O, Goffin E, *et al*. The NLRP3 Inflammasome Has a Critical Role in Peritoneal Dialysis-Related Peritonitis. *J Am Soc Nephrol*. 2017; 28(7):2038-2052. <https://doi.org/10.1681/asn.2016070729>
30. Salehi B, Mishra AP, Nigam M, Sener B, Kilic M, Sharifi-Rad M. Resveratrol: a double-edged sword in health benefits. 2018; 6(3):91. <https://doi.org/10.3390/biomedicines6030091>
31. Gambini J, López-Gruesso R, Olaso-González G, Inglés M, Abdelazid K, El Alami M. Resveratrol: distribución, propiedades y perspectivas. *Rev Esp Geriatr Gerontol*. 2013; 48(2):79–88. <https://doi.org/10.1016/j.regg.2012.04.007>
32. Zhang LX, Li CX, Kakar MU, Khan MS, Wu PF, Amir RM. Resveratrol (RV): a pharmacological review and call for further research. *Biomed Pharmacother*. 2021; 143:112164. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.112164>
33. Meng T, Xiao D, Muhammed A, Deng J, Chen L, He J. Anti-Inflammatory Action and Mechanisms of Resveratrol. *Molecules*. 2021; 26(1):229. <https://doi.org/10.3390/molecules26010229>

34. Wang HH, Lin CY. Interleukin-12 and -18 levels in peritoneal dialysate effluent correlate with the outcome of peritonitis in patients undergoing peritoneal dialysis: implications for the Type I/Type II T-cell immune response. *Am J Kidney Dis.* 2005; 46(2):328-38. <https://doi.org/10.1053/j.ajkd.2005.05.008>
35. Liu Z, Zhao H, Liu W, Li T, Wang Y, Zhao M. NLRP3 inflammasome activation is essential for paraquat-induced acute lung injury. *Inflammation.* 2015; 38(1):433-44. <https://doi.org/10.1007/s10753-014-0048-2>
36. Liu Z, Wang X, Wang Y, Zhao M. NLRP3 inflammasome activation regulated by NF- $\kappa$ B and DAPK contributed to paraquat-induced acute kidney injury. *Immunol Res.* 2017; 65(3):687-698. <https://doi.org/10.1007/s12026-017-8901-7>
37. Ramil-Gómez O, López-Pardo M, Rodríguez-Carmona A, Fernández-Rodríguez JA, Carlos Vaamonde-García C, Pérez-Fontán M, *et al.* MO712: Involvement of mitochondrial dysfunction in the inflammatory response in human mesothelial cells from peritoneal dialysis effluent. *Nephrol Dial Transplant.* 2022; 37(3):gfac078.049. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfac078.049>
38. Álvarez S, Muñoz-Fernández MÁ. TNF-A may mediate inflammasome activation in the absence of bacterial infection in more than one way. *PLoS One.* 2013; 8(8):e71477. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0071477>
39. Jiao J, Zhao G, Wang Y, Ren P, Wu M. MCC950, a selective inhibitor of NLRP3 inflammasome, reduces the inflammatory response and improves neurological outcomes in mice model of spinal cord injury. *Front Mol Biosci.* 2020; 7:37. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2020.00037>
40. Ding W, Liu T, Bi X, Zhang Z. Mitochondria-targeted antioxidant mito-Tempo protects against aldosterone-induced renal injury in vivo. *Cell Physiol Biochem.* 2017; 44(2):741-750. <https://doi.org/10.1159/000485287>
41. Ni R, Cao T, Xiong S, Ma J, Fan GC, Lacefield JC, *et al.* Therapeutic inhibition of mitochondrial reactive oxygen species with mito-TEMPO reduces diabetic cardiomyopathy. *Free Radic Biol Med.* 2016; 90:12-23. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2015.11.013>
42. Chang YP, Ka SM, Hsu WH, Chen A, Chao LK, Lin CC, *et al.* Resveratrol inhibits NLRP3 inflammasome activation by preserving mitochondrial integrity and augmenting autophagy. *J Cell Physiol.* 2015; 230(7):1567-79. <https://doi.org/10.1002/jcp.24903>