

# Máster en Biología Molecular, Celular y Genética

## Trabajo de Fin de Máster

Papel de la disfunción mitocondrial en la activación del inflammasoma en células mesoteliales del efluente de pacientes tratados con diálisis peritoneal

Papel da disfunción mitocondrial na activación do inflammasoma en células mesoteliais do efluente de pacientes tratados con diálise peritoneal

Role of mitochondrial dysfunction in activation of the inflammasome in mesothelial cells from the effluent of patients treated with peritoneal dialysis

Rocío Carreja Álvarez

15 de Julio de 2022

*Directora 1: María José López Armada*

*Directora 2: Olalla Ramil Gómez*

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

Papel de la disfunción mitocondrial en la activación del inflamasoma  
en células mesoteliales de pacientes tratados con diálisis peritoneal

LOPEZ  
ARMADA  
MARIA JOSE  
- 08029604M

Firmado digitalmente  
por LOPEZ ARMADA  
MARIA JOSE -  
08029604M  
Fecha: 2022.07.15  
13:33:50 +02'00'

**Directora 1**

Dra. María José López Armada

RAMIL  
GOMEZ  
OLALLA -  
17760548V

Firmado  
digitalmente por  
RAMIL GOMEZ  
OLALLA -  
17760548V  
Fecha: 2022.07.15  
12:16:14 +01'00'

**Directora 2**

Dra. Olalla Ramil Gómez

Firmado por CARREJA  
ALVAREZ, ROCIO  
(FIRMA) el día  
15/07/2022 con un  
certificado emitido  
por AC DNIE 004

**Autora**

Rocío Carreja Álvarez

# ÍNDICE

<b>Resumen</b> .....	<b>3-4</b>
<b>1. Introducción</b> .....	<b>5-13</b>
1.1 El envejecimiento y su relación con las enfermedades de carácter crónico .....	5
1.2 La enfermedad renal crónica y el tratamiento sustitutivo renal .....	5-6
1.3 La diálisis peritoneal y la bioincompatibilidad del líquido de diálisis .....	7-8
1.4 El estrés oxidativo y la respuesta inflamatoria .....	8-10
1.5 La transición epitelio-mesenquimal .....	10-12
1.6 El resveratrol como terapia antioxidante .....	12-13
<b>2. Objetivos</b> .....	<b>13-14</b>
<b>3. Material y métodos</b> .....	<b>14-19</b>
3.1 Obtención de células mesoteliales del efluente de pacientes en diálisis peritoneal .....	14
3.2 Aislamiento de células mesoteliales y cultivo celular .....	14-15
3.3 Estimulación celular .....	15-16
3.4 Inmunofluorescencia de caspasa-1 .....	16-17
3.5 ELISA de IL-1 $\beta$ .....	17-18
3.6 Tratamiento de datos y análisis estadístico .....	19
<b>4. Resultados</b> .....	<b>20-26</b>
4.1 Efecto de la disfunción mitocondrial sobre la activación del inflamasoma en células mesoteliales humanas .....	20-21
4.2 Implicación del receptor NLRP3 en la expresión de caspasa-1 en células mesoteliales humanas .....	21-22
4.3 Implicación de los ROS mitocondriales en la activación del inflamasoma en células mesoteliales humanas .....	22-23
4.4 Implicación del factor nuclear NF-KB en la expresión de IL-1 $\beta$ en células mesoteliales humanas .....	24
4.5 Efecto del resveratrol sobre la expresión de caspasa-1 e IL-1 $\beta$ en células mesoteliales humanas .....	25-26

<b>5. Discusión .....</b>	<b>26-33</b>
5.1 Efecto de la disfunción mitocondrial sobre la activación del inflamasoma en células mesoteliales humanas .....	27-29
5.2 Implicación del receptor NLRP3 en la expresión de caspasa-1 en células mesoteliales humanas .....	29-30
5.3 Implicación de los ROS mitocondriales en la activación del inflamasoma en células mesoteliales humanas .....	30-31
5.4 Implicación del factor nuclear NF- $\kappa$ B en la expresión de IL-1 $\beta$ en células mesoteliales humanas .....	31-32
5.5 Efecto del resveratrol sobre la expresión de caspasa-1 e IL-1 $\beta$ en células mesoteliales humanas .....	32-33
<b>6. Conclusiones .....</b>	<b>34</b>
<b>Bibliografía .....</b>	<b>35-40</b>

## Resumen

La diálisis peritoneal (DP) es uno de los procedimientos que existen para tratar la enfermedad renal crónica. Pese a las ventajas que ofrece en términos de eficacia dialítica, morbimortalidad, calidad de vida y costes, es menos utilizada que la hemodiálisis debido a las complicaciones derivadas de la técnica. Los sangrados locales, las infecciones y las características bioincompatibles del líquido de diálisis (LD) conducen a la pérdida de la capacidad dialítica del peritoneo, dando lugar al fallo de ultrafiltración. La producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) por parte de la mitocondria juega un papel fundamental como detonante del estrés oxidativo y la inflamación característica de este proceso. Se ha visto que el aumento de ROS conduce al ensamblaje del inflammasoma NLRP3, un complejo multiproteico implicado en la activación de caspasa-1, que es responsable de la maduración de IL-1 $\beta$ , una de las principales citoquinas que participan en el proceso inflamatorio. El objetivo del presente trabajo consistió en evaluar el papel de la disfunción mitocondrial en la activación del inflammasoma, así como los mecanismos implicados en este proceso. Adicionalmente, también se testó la capacidad del antioxidante natural resveratrol para prevenir su activación. Los resultados obtenidos muestran que la disfunción mitocondrial induce la expresión de caspasa-1 y produce un aumento sinérgico de la expresión proteica de IL-1 $\beta$  durante la respuesta inflamatoria en las células procedentes del efluente peritoneal de pacientes en DP. Además, sugieren que el receptor NLRP3, el factor nuclear NF- $\kappa$ B y los ROS mitocondriales están implicados en este proceso. Finalmente, se ha mostrado que el resveratrol previene los efectos de la disfunción mitocondrial durante la respuesta inflamatoria, disminuyendo la expresión de caspasa-1 e IL-1 $\beta$  en las células mesoteliales humanas.

**Palabras clave:** diálisis peritoneal, disfunción mitocondrial, inflammasoma NLRP3, resveratrol

## Resumo

A diálise peritoneal (DP) é un dos procedementos que existen para tratar a enfermidade renal crónica. Pese ás vantaxes que ofrece en termos de eficacia dialítica, morbimortalidade, calidade de vida e custo, é menos empregada ca hemodiálise debido ás complicacións derivadas da técnica. Os sangrados locais, as infeccións e as características bioincompatibles do líquido de diálise (LD) provocan a perda da capacidade dialítica do peritoneo, dando lugar ao fallo de ultrafiltración. A produción de especies reactivas de osíxeno (ROS) pola mitocondria xoga un papel clave coma detonante do estrés oxidativo e da inflamación característica deste proceso. Parece ser que o aumento de ROS provoca o ensamblaxe do inflammasoma NLRP3, un complexo multiproteico implicado na activación de caspasa-1, que é responsable da maduración de IL-

1 $\beta$ , unha das principais citoquinas que participan no proceso inflamatorio. O obxectivo do presente traballo consisteu na avaliación do papel da disfunción mitocondrial na activación do inflammasoma, así coma dos mecanismos implicados no proceso. Adicionalmente, testouse a capacidade do antioxidante natural resveratrol para prever a súa activación. Os resultados obtidos amosan que a disfunción mitocondrial induce a expresión de caspasa-1 e produce un aumento sinérxico da expresión proteica de IL-1 $\beta$  durante a resposta inflamatoria nas células procedente do efluente peritoneal de pacientes en DP. Ademais, suxírense que o receptor NLRP3, o factor nuclear NF- $\kappa$ B e os ROS mitocondriais atópanse implicados neste proceso. Finalmente, mostrouse que o resveratrol prevén os efectos da disfunción mitocondrial durante a resposta inflamatoria, diminuindo a expresión de caspasa-1 e IL-1 $\beta$  nas células mesoteliais humanas.

**Palabras clave:** diálise peritoneal, disfunción mitocondrial, inflammasoma NLRP3, resveratrol

## **Abstract**

Peritoneal dialysis (PD) is one of the procedures available to treat chronic kidney disease. Despite the advantages it offers in terms of dialysis efficacy, morbidity and mortality, quality of life and costs, it is less widely used than haemodialysis due to complications arising from the technique. Local bleedings, infections and the bioincompatible characteristics of dialysis fluid (DF) lead to loss of the dialytic capacity of the peritoneum, resulting in ultrafiltration failure. The production of reactive oxygen species (ROS) by mitochondria plays a key role in triggering the oxidative stress and inflammation characteristic of this process. Increased ROS have been shown to lead to the assembly of the NLRP3 inflammasome, a multiprotein complex involved in the activation of caspase-1, which is responsible for the maturation of IL-1 $\beta$ , one of the main cytokines involved in the inflammatory process. The aim of this study was to evaluate the role of mitochondrial dysfunction in inflammasome activation, as well as the mechanisms involved in this process. In addition, the ability of the natural antioxidant resveratrol to prevent its activation was also tested. The results obtained show that mitochondrial dysfunction induces caspase-1 expression and produces a synergistic increase in IL-1 $\beta$  protein expression during the inflammatory response in cells from the peritoneal effluent of PD patients. Furthermore, they suggest that the NLRP3 receptor, nuclear factor NF- $\kappa$ B and mitochondrial ROS are involved in this process. Finally, resveratrol has been shown to prevent the effects of mitochondrial dysfunction during the inflammatory response by decreasing the expression of caspase-1 and IL-1 $\beta$  in human mesothelial cells.

**Key words:** peritoneal dialysis, mitochondrial dysfunction, NLRP3 inflammasome, resveratrol

# 1. Introducción

## 1.1 El envejecimiento y su relación con las enfermedades de carácter crónico

En las últimas décadas se ha producido un progresivo envejecimiento de la población mundial fundamentalmente debido a dos factores. Por una parte, las crecientes mejoras de la sanidad pública y el cambio en los hábitos de vida con respecto al pasado han provocado un aumento de la esperanza de vida. Por otro lado, la continua disminución de la tasa de fecundidad ha derivado en un descenso del número de nacimientos (1). En este sentido, la pirámide poblacional está cambiando, y en el año 2018, el número de personas mayores de 65 años superó, por primera vez en la historia, al de 5 años en todo el mundo. Adicionalmente, el número de personas mayores de 80 años se ha triplicado desde el año 1900, lo cual está provocando un sobrevejecimiento que, de mantenerse, supondrá un gran impacto en la evolución demográfica en el futuro (2). La población española no escapa a esta realidad y, según las estimaciones del Instituto Nacional de Estadística (INE), a mitad de siglo las personas mayores de 65 años pasarán del 19,3% al 29,4% (3).

Paralelamente a esta situación, se ha observado una tendencia ascendente en el número de patologías crónicas relacionadas con el proceso del envejecimiento, de manera que en las últimas décadas se ha triplicado la asistencia y utilización del sistema sanitario por paciente. Concretamente, se calcula que las enfermedades de carácter crónico suponen el 80% de todas las consultas de Atención Primaria (4). Además, su prevalencia se ha incrementado de tal forma que, según la Organización Mundial de la Salud (OMS), el conjunto de estas enfermedades representa actualmente la principal causa de mortalidad en el mundo. En el año 2008, 36 millones de personas murieron como consecuencia de una enfermedad crónica, de las cuales 27 millones se concentraron en las personas mayores de 60 años (5). La enfermedad renal crónica (ERC) no es una excepción y supone un verdadero problema de salud pública que ha alcanzado trascendencia epidemiológica a nivel mundial (6,7).

## 1.2 La enfermedad renal crónica y el tratamiento sustitutivo renal

La ERC engloba a un conjunto de alteraciones funcionales y/o estructurales que afectan al riñón de manera permanente e irreversible. En la actualidad, podemos definir esta afección como una disminución de la función renal, caracterizada por una tasa de filtración glomerular inferior a 60 ml/min por 1,73 m<sup>2</sup>, o por la presencia de marcadores de daño renal, o ambos, durante al menos 3 meses de duración, independientemente del motivo subyacente (8). Entre las causas más frecuentes de la ERC se encuentran la nefropatía diabética, la nefropatía

isquémica, la nefroangiosclerosis, la arteriosclerosis, la enfermedad glomerular, nefropatías congénitas o hereditarias, nefropatías intersticiales, infecciones urinarias de repetición y muchas otras enfermedades sistémicas que pueden potenciar el daño renal (9). Además, se ha observado una relación continua y creciente entre la prevalencia de la ERC y la acumulación de factores de riesgo de enfermedades cardiovasculares, como la diabetes, la hipertensión o la obesidad, que aumenta la posibilidad de sufrir morbimortalidad cardiovascular (7).

En España, la prevalencia de la ERC se sitúa en torno al 15%, afectando a 1 de cada 7 adultos, correspondiéndose el 20 % del total con personas mayores de 60 años (10). Cuando la enfermedad alcanza estadios avanzados surge la necesidad de reemplazar la función de los riñones nativos. En este sentido, según los datos aportados en el 2020 por el registro de la Organización Nacional de Trasplantes (ONT) y de la Sociedad Española de Nefrología (SEN), más de 64.000 personas se encuentran en tratamiento renal sustitutivo, que puede realizarse mediante tres modalidades: trasplante, hemodiálisis (HD) y diálisis peritoneal (DP) (11).

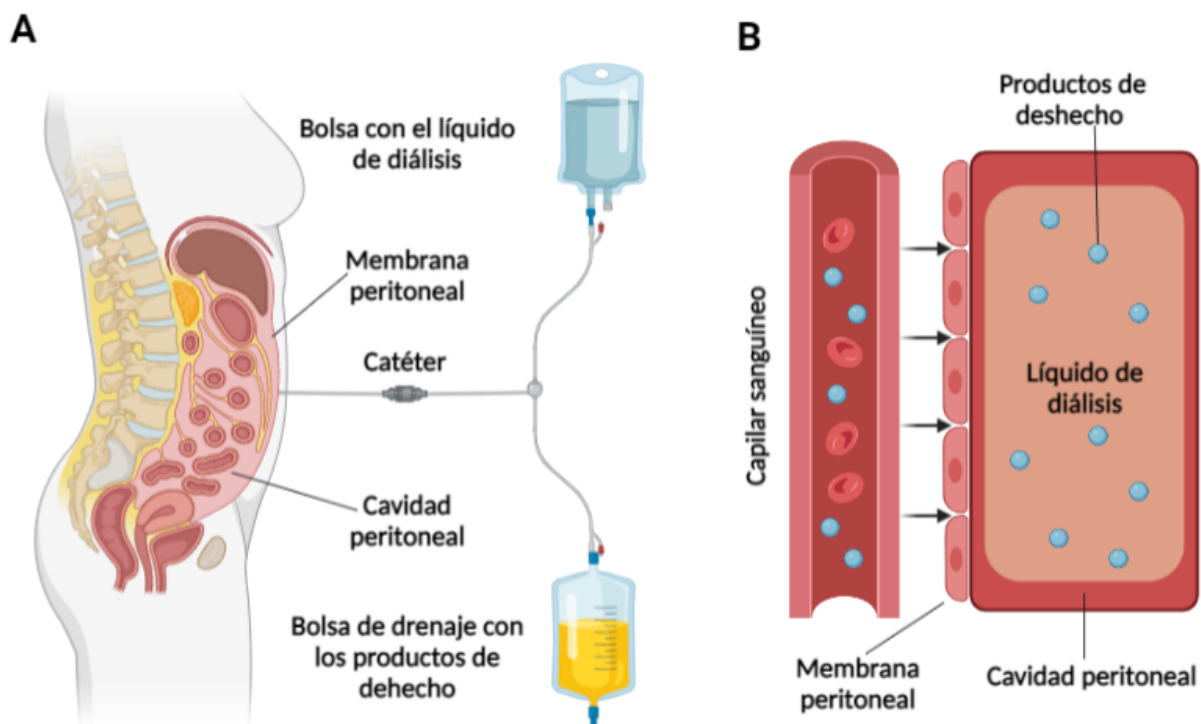
La opción preferible en términos de eficacia es el trasplante, pero debido a la carencia de suficientes órganos para realizarlo, los largos tiempos de espera y que no siempre el paciente tiene acceso potencial a este tratamiento, un gran número de personas debe elegir entre la HM o la DP (12). En este sentido, los pacientes deben ser informados de los riesgos y compensaciones de las diferentes modalidades de diálisis para que puedan seleccionar de manera óptima la opción que mejor se adapte a su salud y circunstancias personales (13). Una de las mayores ventajas que ofrece la DP es que los pacientes pueden permanecer en su domicilio particular sin tener que interrumpir sus actividades cotidianas para acudir al hospital (14). Por otra parte, ambas modalidades son equiparables en términos de eficacia dialítica y morbimortalidad, suponiendo la DP un menor coste económico (15). Actualmente, la diálisis es la terapia crónica más cara, consumiendo el 2,5 % del presupuesto general sanitario pese a proporcionar soporte únicamente al 0,1% de la población. No obstante, pese a que la DP supone un ahorro de 40.000 euros/año de vida ganado respecto a la HM, su uso no es comparable (16). Los sangrados locales, las complicaciones infecciosas y las características bioincompatibles del líquido de diálisis (LD) pueden inducir un deterioro progresivo en la membrana peritoneal que conduce a lo que se conoce como fallo de ultrafiltración (14,17). En este sentido, los registros españoles muestran que las tasas de fallo de la técnica se sitúan entre el 8-14% durante el primer año, entre 15-25% a los dos años y entre 42-55% tras cinco años (18).



### 1.3 La diálisis peritoneal y la bioincompatibilidad del líquido de diálisis

Como ya se mencionó anteriormente, la DP es uno de los tratamientos sustitutivos renales a los que puede someterse un paciente que se encuentre en un estadio avanzado de ERC. La técnica se basa en la difusión de partículas y la filtración de fluidos a través de una membrana semipermeable, constituida en este caso por el propio peritoneo del paciente, a través de la cual se pone en contacto el LD y la sangre (19). El peritoneo es una membrana continua serosa, formada por una capa simple de células mesoteliales con morfología epitelial, que recubre las vísceras alojadas en la cavidad peritoneal (20). A través de esta delicada estructura, se crea un gradiente de presión osmótica gracias a la composición del LD, que permite el paso de los productos metabólicos de deshecho desde la sangre hacia el interior de la cavidad peritoneal (**figura 1B**) (21).

Como se puede ver en la **figura 1A**, a través de un catéter se infunde el LD a la cavidad peritoneal del paciente, donde permanece varias horas absorbiendo los productos de deshecho y las toxinas que los riñones de estos pacientes no son capaces de eliminar, un proceso conocido como ultrafiltración. Posteriormente, la solución con las toxinas se drena a una bolsa vacía.



**Figura 1. Representación esquemática de la técnica y el fundamento de la diálisis peritoneal.** A) El LD se introduce en la cavidad peritoneal a través de un catéter. Una vez realizado el intercambio gracias a la capacidad dializante de la membrana peritoneal, el fluido con los productos de deshecho es eliminado del organismo, depositándose en una bolsa de drenaje. B) El LD crea un gradiente de concentración a través del peritoneo que permite el paso de los productos de deshecho desde la sangre hacia el interior de la cavidad peritoneal.

Los LD son soluciones hipertónicas compuestas por: agua; diferentes concentraciones de electrolitos como sodio ( $\text{Na}^+$ ), cloro ( $\text{Cl}^-$ ), calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) y magnesio ( $\text{Mg}^{2+}$ ), que se utilizan para mantener el equilibrio electrolítico; un tampón empleado para el mantenimiento del pH, que puede ser lactato, bicarbonato o una mezcla de ambos, y un agente osmótico, siendo el más frecuente la glucosa, que permite el balance negativo de fluidos, lo cual da lugar a la ultrafiltración (22).

Sin embargo, esta composición del LD le confiere características bioincompatibles, y como consecuencia, se ha demostrado que la exposición prolongada al mismo provoca alteraciones estructurales y funcionales en la membrana peritoneal que terminan por afectar a su capacidad dialítica. En primer lugar, para permitir la filtración de las sustancias tóxicas a través del peritoneo, se emplean concentraciones de glucosa superiores entre 10 y 50 veces a las concentraciones séricas fisiológicas. Por otra parte, otro factor que provoca toxicidad es la esterilización por calor del LD, que supone la transformación de la glucosa en productos de degradación de la glucosa (GDPs; del inglés, *Glucose Degradation Products*) que a su vez promueven la formación de productos de glucosilación avanzada (AGEs; del inglés, *Advanced Glycation End Products*). En consecuencia, estas características terminan por desencadenar varios eventos intracelulares como el estrés oxidativo y la inflamación, dando lugar en última instancia al fallo de ultrafiltración (23). Por ello, la prevención de estos eventos podría mejorar la integridad del peritoneo incrementando el tiempo que los pacientes pueden ser tratados con DP, lo cual supondría mantener la calidad de vida de los pacientes a la par que se disminuiría el gasto sanitario, que podría destinarse a otras enfermedades.

#### **1.4 El estrés oxidativo y la respuesta inflamatoria**

La mitocondria juega un papel importante en el estrés oxidativo y el proceso inflamatorio que se desencadena en las células mesoteliales de la membrana peritoneal como consecuencia de las características del LD (24, 25).

La principal función de dicho orgánulo es generar la energía que las células necesitan al transformar las moléculas ingeridas en adenosín trifosfato (ATP). Para ello realizan la respiración mitocondrial, en la cual tiene lugar un proceso conocido como fosforilación oxidativa. Durante esta etapa, la cadena de transporte electrónico envía electrones a través de una serie de proteínas, generando un gradiente electroquímico de protones que producen energía en forma de ATP (26).

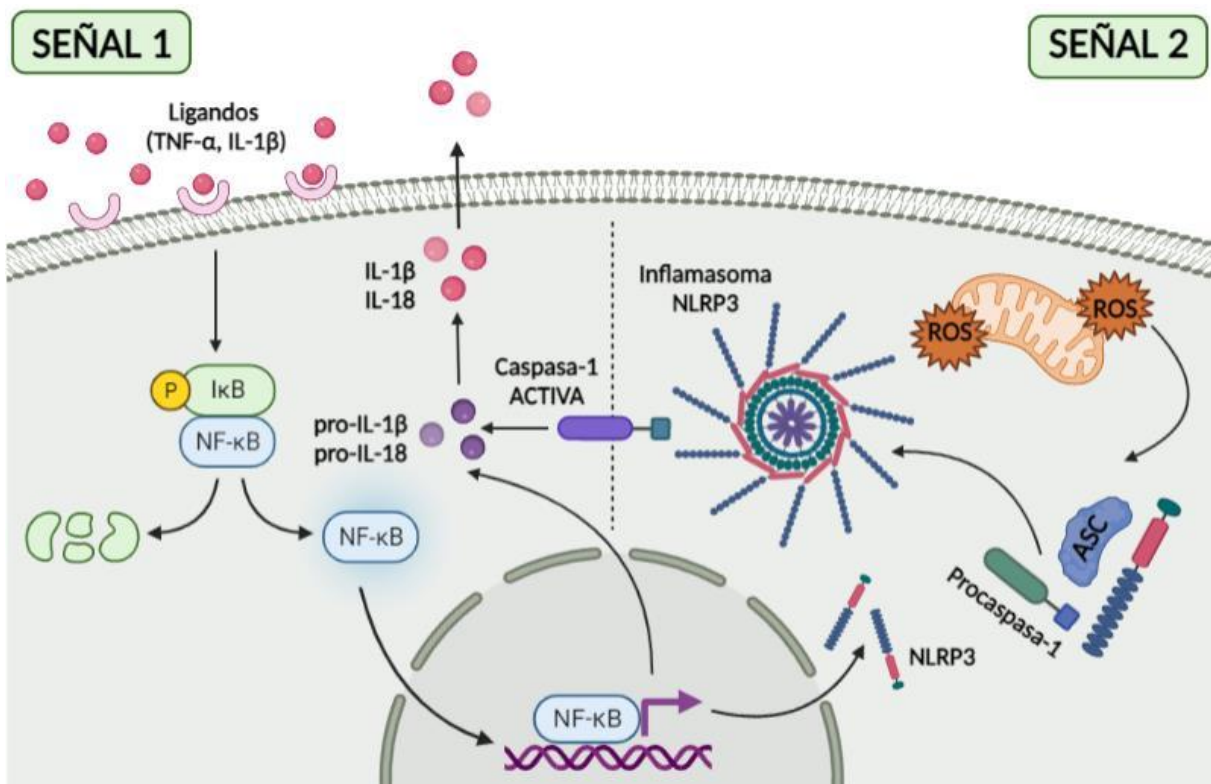
Asimismo, la mitocondria no sólo es el mayor orgánulo formador de ATP, sino también uno de los mayores productores de especies reactivas de oxígeno (ROS; del inglés, *Reactive*

*Oxygen Species*) (27). En este sentido, los altos niveles de glucosa del LD, acompañados de la producción de GDPs y AGEs, provocan alteraciones que reducen la transferencia de electrones en la cadena respiratoria, generando un estado de **disfunción mitocondrial** que se manifiesta por un aumento en la producción de ROS que excede la capacidad antioxidante local de la mitocondria (24, 28). Dado que dicho orgánulo también es un blanco de los ROS, se produce un bucle de retroalimentación que induce un **estrés oxidativo** celular cada vez mayor (29). Como respuesta, las células mesoteliales del peritoneo reclutan células inflamatorias como los monocitos y los macrófagos, que promueven la síntesis de citoquinas, factores de crecimiento y quimioquinas, dando lugar a un **estado crónico de inflamación** peritoneal (30). Concretamente, ciertas interleucinas (IL) como IL-1 $\beta$ , IL-18 e IL-6, junto con otras moléculas como el factor de necrosis tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ; del inglés, *Tumor Necrosis Factor*), el interferón- $\gamma$  (INF- $\gamma$ ), el factor de crecimiento transformante- $\beta$  (TGF- $\beta$ ; del inglés, *Transforming Growth Factor  $\beta$* ) y el factor de crecimiento vasoendotelial (VEGF; del inglés, *Vascular Endothelial Growth Factor*), suponen la base molecular de la inflamación (31). Adicionalmente, el aumento de ROS conduce al ensamblaje del **inflammasoma NLRP3** (32), un complejo multiproteico constituido por el receptor NLRP3 (del inglés, *Nucleotide-Binding Oligomerization Domain-Like Receptor Pyrin Domain-Containing-3*), la proteína adaptadora ASC (del inglés, *Apoptosis-Associated Speck-Like Protein Containing a Caspase-Recruitment Domain*) y la caspasa-1, que está implicado en la maduración de IL-1 $\beta$  e IL-18 (33). Para su activación se requieren dos señales como se puede observar en la **figura 2**.

Por una parte (**señal 1**), gracias al estrés oxidativo provocado por la disfunción mitocondrial, se producen alteraciones en las vías de señalización de numerosos factores de transcripción que participan en la respuesta inflamatoria (34). En este sentido, la unión de ciertas citoquinas inflamatorias a sus respectivos receptores en la membrana plasmática provoca la activación por vía canónica del factor nuclear KB (NF- $\kappa$ B), que es uno de los mayores reguladores del proceso inflamatorio (34,35). En condiciones basales, NF- $\kappa$ B se encuentra secuestrado en el citosol debido a su unión con su inhibidor I $\kappa$ B. Pero, si el complejo es desbloqueado por diferentes estímulos como el estrés oxidativo y la presencia de citoquinas, NF- $\kappa$ B puede translocarse al núcleo, donde se une a su secuencia específica de ADN provocando el aumento de la transcripción de ciertos genes que codifican proteínas relacionadas con el proceso inflamatorio, como el receptor NLRP3 y los precursores pro-IL-1 $\beta$  y pro-IL-18 (32, 36).

Por otra parte (**señal 2**), la presencia de ROS y otros estímulos de daño celular provocan la unión de NLRP3 con la proteína adaptadora ASC, lo cual induce la oligomerización del

complejo y el reclutamiento del zimógeno procaspasa-1, dando lugar al inflamasoma NLRP3 (33). Debido a que la procaspasa-1 presenta actividad autocatalítica, tan solo se necesita su proximidad al complejo para dar lugar a la forma activa de la proteína efectora, la caspasa-1. Esta última actúa sobre pro-IL-1 $\beta$  y pro-IL-18 induciendo su maduración en IL-1 $\beta$  e IL-18 activas, que son secretadas al espacio intercelular (37).



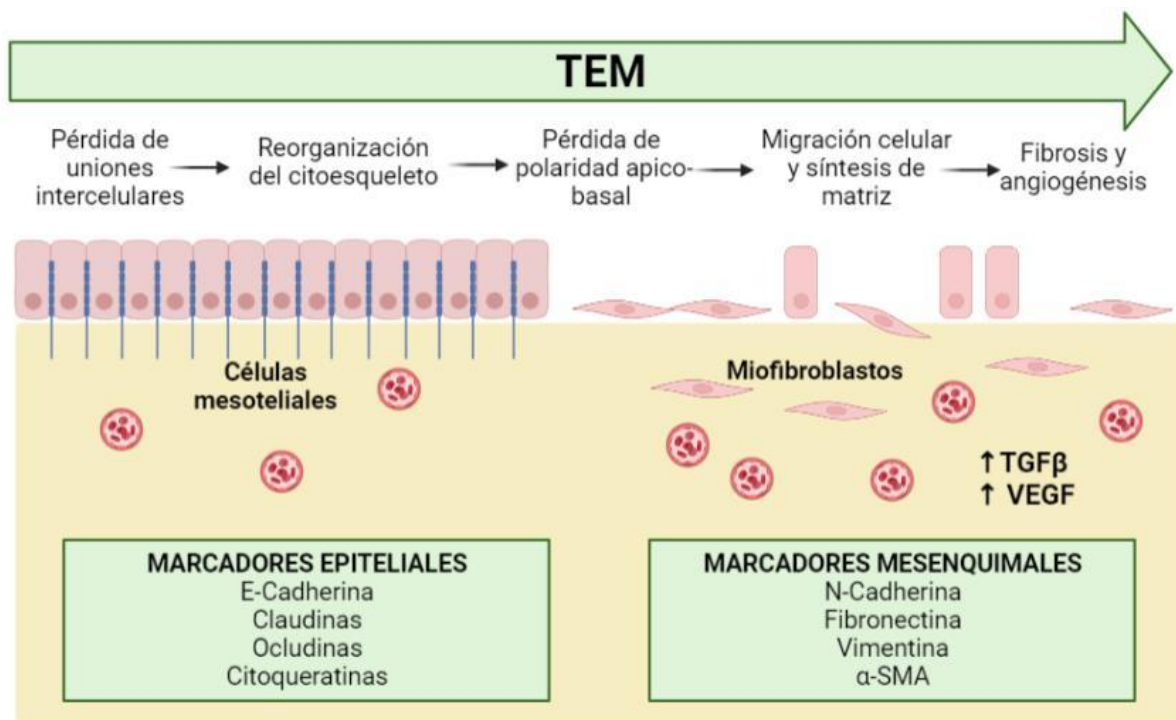
**Figura 2. Señales que conducen a la activación del inflamasoma NLRP3.** La señal 1 provoca la translocación al núcleo del factor de transcripción NF- $\kappa$ B, lo cual aumenta la expresión de pro-IL-1 $\beta$ , pro-IL-18 y el receptor NLRP3. La señal 2 provoca el ensamblaje del inflamasoma NLRP3 a través de la unión del receptor NLRP3 con la proteína adaptadora ASC y el reclutamiento de la procaspasa-1. Las dos vías de señalización se entrecruzan cuando la caspasa-1 activa induce la maduración de los precursores pro-IL-1 $\beta$  y pro-IL-18, causando su transformación en IL-1 $\beta$  e IL-18, que son secretadas al espacio intercelular.

Como ya se mencionó anteriormente, la sobreproducción de estas moléculas, en conjunto con otras citoquinas como TNF- $\alpha$ , provoca un estado crónico de inflamación en el peritoneo que, de perdurar en el tiempo, puede ocasionar cambios estructurales en la membrana peritoneal dando lugar a un proceso conocido como transición epitelio-mesenquimal (TEM) (38).

### 1.5 La transición epitelio-mesenquimal

La TEM es un proceso biológico de remodelación morfológica mediante el cual las células con fenotipo epitelial pierden sus características típicas adquiriendo un fenotipo fibroblástico, lo cual se debe a múltiples cambios entre los que se encuentran: pérdida de la polaridad celular,

adquisición de capacidad migratoria e invasora, mayor resistencia a la apoptosis y producción de matriz extracelular (39). En un peritoneo sano las células mesoteliales se disponen formando una monocapa pero, en pacientes sometidos a DP, se ha observado que la inflamación causada por la exposición prolongada al LD provoca que las células mesoteliales pierdan paulatinamente su característica forma cuboide, transformándose en células mesenquimales de aspecto fusiforme (31) (**figura 3**).



**Figura 3. Transición epitelio mesenquimal que sufren las células de la membrana peritoneal.** La exposición continua al LD provoca que las células mesoteliales peritoneales pierdan sus características y se transformen en células mesenquimales. Durante este proceso se incrementa la expresión de TGF- $\beta$  y VEGF, dando lugar a un aumento de la fibrosis y la angiogénesis respectivamente. En la parte superior de la imagen se describen los cambios estructurales que tienen lugar durante la TEM. En la parte inferior se observan los principales marcadores epiteliales y mesenquimales.

Molecularmente, la TEM se caracteriza por el aumento de la expresión de marcadores mesenquimales como N-cadherina, fibronectina, vimentina, y  $\alpha$ -actina de músculo liso ( $\alpha$ -SMA; del inglés,  *$\alpha$ -Smooth Muscle Actin*) y la reducción de marcadores epiteliales como E-cadherina, claudinas, ocludinas y citoqueratinas (40). La N-cadherina es una glucoproteína que desempeña un papel de adhesión entre las células mesoteliales del peritoneo. En el inicio de la TEM, se produce un incremento en la expresión del factor de transcripción *Snail*, que actúa reprimiendo la transcripción del marcador epitelial E-cadherina, lo que conduce a la pérdida de las uniones intercelulares y la reorganización del citoesqueleto, ocasionando un cambio en la polaridad celular (41). En este sentido, las células de la membrana peritoneal comienzan a separarse progresivamente para acumularse en el intersticio tisular, donde sintetizan una matriz



rica en colágeno, fibronectina y factores profibróticos como como TGF- $\beta$ , que contribuyen al desarrollo de fibrosis en la zona. Estructuralmente, la producción excesiva de matriz supone la destrucción de la conformación normal del tejido, lo cual provoca la pérdida de la integridad de la membrana peritoneal (42,43). Por otra parte, la unión de AGEs a sus receptores aumenta la expresión de VEGF, lo cual favorece el desarrollo de la angiogénesis. La contrapartida funcional de este proceso es un aumento de la capilaridad que conduce a un incremento de la tasa de transporte de pequeños solutos y, en consecuencia, a la pérdida de la capacidad de ultrafiltración del peritoneo (44). En este contexto, evitar el desarrollo de la respuesta inflamatoria y el estrés oxidativo podría prevenir la TEM, y con ello la pérdida de integridad de la membrana peritoneal, que provoca en última instancia el fallo de ultrafiltración haciendo inviable la técnica.

### **1.6 El resveratrol como terapia antioxidante**

El estrés oxidativo y la inflamación desempeñan un papel importante en la TEM que se produce en el peritoneo de pacientes tratados con DP, por lo que es de vital importancia la búsqueda de estrategias terapéuticas con propiedades antioxidantes y antiinflamatorias que mitiguen el efecto que el LD ejerce sobre la membrana peritoneal. En este sentido, una de las moléculas naturales más prometedoras es el resveratrol (RSV).

El RSV (3,5,4'-trihidroxiestilbeno) es una fitoalexina sintetizada por las plantas que actúa como mecanismo de defensa frente a infecciones o en respuesta a condiciones de estrés ambiental como la exposición a la luz UV (45). Estructuralmente, el RSV está conformado por dos anillos fenólicos unidos por un doble enlace estireno que permite la formación de dos isómeros, cis o trans, siendo el trans-resveratrol más abundante, estable y biológicamente activo que el cis-resveratrol (46); por lo que es la forma predominante en fuentes dietéticas y suplementos alimenticios (47).

La presencia de RSV se ha descrito en más de 70 especies de plantas y en múltiples productos de origen natural presentes en nuestra dieta; entre los que destacan los frutos secos como las nueces o los cacahuets, los frutos del bosque como las bayas y los arándanos y, especialmente, la piel de la uva y sus derivados como el vino tinto (48), que contiene una concentración promedio de RSV en su forma trans de 1,9 mg/L, pudiendo llegar a alcanzar los 14,3 mg/L (49).

En la actualidad existen numerosos estudios científicos sobre este compuesto debido a sus beneficios para la salud, entre los que destacan sus propiedades antioxidantes, anticancerígenas, antiangiogénicas, neuroprotectoras y antidiabéticas (50). Adicionalmente,

otra de las principales razones por las que el RSV ha logrado captar el interés de la comunidad científica se debe al efecto que ejerce sobre múltiples dianas moleculares, modulando la expresión de factores de transcripción, genes y proteínas (51). En el contexto de los mecanismos que conducen a la activación del inflamasoma, múltiples estudios han demostrado la capacidad del RSV para ejercer un papel antiinflamatorio a través de la modulación del factor NF- $\kappa$ B, reduciendo su translocación al núcleo lo cual disminuye la expresión de estímulos proinflamatorios como IL-1 $\beta$  (52). Por otra parte, también se ha observado que el RSV puede inhibir al inflamasoma NLRP3 debido a la eliminación de mitocondrias dañadas como consecuencia de un aumento del flujo autofágico (53). Asimismo, en relación con el resveratrol y la TEM, diversos trabajos describen como esta molécula tiene la capacidad de inhibir este proceso (54), pero ninguno de ellos se ha realizado en el contexto de la DP.

## 2. Objetivos

Las células de la membrana peritoneal de pacientes sometidos a DP terminan por perder sus características, adquiriendo un fenotipo fibroblástico como consecuencia de un estado crónico de inflamación. La contrapartida funcional de esta situación es una pérdida progresiva de la capacidad dialítica de la membrana peritoneal, lo que puede conducir al fallo de ultrafiltración poniendo en peligro la supervivencia de la técnica. En este proceso juegan un papel importante los LD, cuya bioincompatibilidad provoca un estado de disfunción mitocondrial que conduce a un estado de estrés oxidativo como consecuencia de un incremento en la producción de ROS. La síntesis de estas moléculas, en conjunto con otros estímulos proinflamatorios, inducen la activación del inflamasoma NLRP3, que participa en la maduración de las citoquinas IL-1 $\beta$  e IL-18, lo cual genera a la larga un estado crónico de inflamación.

Dada la importancia de conocer los mecanismos implicados en el desarrollo de la fisiopatología peritoneal, el primer objetivo de este trabajo es *evaluar in vitro el papel de la disfunción mitocondrial en la activación del inflamasoma, a través del análisis de la expresión de caspasa-1 e IL-1 $\beta$  en células procedentes del peritoneo de pacientes sometidos a diálisis peritoneal.*

Por otra parte, la búsqueda de estrategias terapéuticas que mitiguen el efecto que el LD ejerce sobre el peritoneo podría prevenir los eventos que conducen a la pérdida de la arquitectura de la membrana peritoneal, lo cual supondría mantener la calidad de vida de los

pacientes a la par que se disminuiría el gasto sanitario, que podría ser destinado a otras enfermedades.

Por lo tanto, el segundo objetivo de este trabajo es *evaluar in vitro el efecto del antioxidante natural resveratrol en el proceso de inflamación peritoneal, a través del análisis de la expresión de caspasa-1 e IL-1 $\beta$  en células procedentes del efluente peritoneal de pacientes tratados con diálisis peritoneal.*

### **3. Material y métodos**

#### **3.1 Obtención de células mesoteliales del efluente de pacientes en diálisis peritoneal**

Las células mesoteliales se aislaron a partir del fluido de drenaje de pacientes sometidos a DP de la Unidad de Diálisis del Complejo Hospitalario Universitario de A Coruña (CHUAC). Al proceder de la descamación del peritoneo, estas muestras son de especial interés para evaluar la respuesta celular a estímulos y realizar estudios *in vitro* que muestren el estado celular de la membrana peritoneal de los pacientes.

Todos los estudios realizados con muestras humanas se llevaron a cabo conforme a las recomendaciones de la Declaración de Helsinki de protección de Datos de Carácter Personal, y tras la aprobación por el Comité ético de Investigación de A Coruña y Ferrol (Código de registro: 2014/454), obteniéndose en cada caso el consentimiento informado de los pacientes.

#### **3.2 Aislamiento de células mesoteliales y cultivo celular**

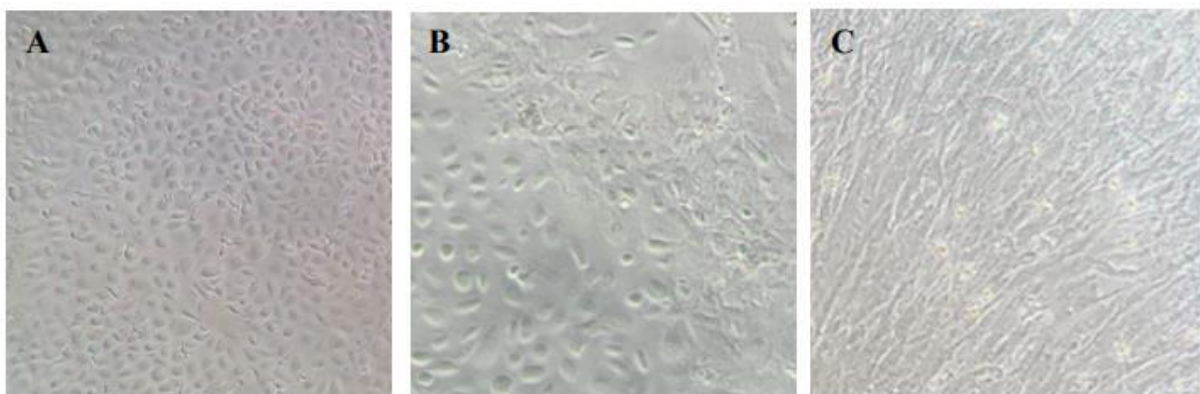
Los experimentos se realizaron a partir de las células mesoteliales que se desprenden del peritoneo humano, aisladas de los efluentes peritoneales de la bolsa de diálisis mediante sucesivas centrifugaciones, un proceso que tuvo lugar en condiciones de esterilidad en una campana de flujo laminar.

El primer paso consistió en trasvasar el volumen total de dializado de la bolsa de drenado a botes de 500 ml que se centrifugaron durante 10 minutos (min) a 1500 revoluciones por min (rpm). Con el objetivo de obtener una muestra más limpia, se lavó con medio de cultivo el fondo de los botes para recoger las células decantadas y se realizó una segunda centrifugación en un tubo Falcon (*Corning*, EEUU) durante 10 min a 1500 rpm. Tras desechar el sobrenadante, el pellet celular se suspendió en medio Roswell Park Memorial Institute (RPMI) (*Corning*) enriquecido con un 20% de suero bovino fetal (SBF) (*Corning*) inactivado previamente durante 40 min a 55°C, y suplementado con 1% de penicilina-estreptomicina (P/E) (*Gibco*, EEUU) y 0,3% de insulina humana (*Actrapid*, Dinamarca). Las células destinadas a las



inmunofluorescencias se sembraron en un sistema de cámaras de cultivo situada sobre un portaobjetos conocido como *chamber* (*Millicell*, Alemania), con un volumen de 500  $\mu$ l por pocillo. Para los ensayos ELISA, se sembraron 500  $\mu$ l en 5 pocillos de una placa de cultivo de 48 pocillos (*Costar*, EEUU). Finalmente, las células se mantuvieron en estufa humidificada al 5% de CO<sub>2</sub> y 37°C, reemplazándose el medio cada dos días hasta alcanzar una confluencia del 80%.

Dado que las células obtenidas proceden de la descamación de la membrana peritoneal, tras 24 horas (h) se llevó a cabo un lavado con tampón fosfato salino pH 7 1X (PBS; del inglés, *Phosphate Buffered Saline*) (*Gibco*) con el objetivo de eliminar la presencia de células sanguíneas. Adicionalmente, las células se visualizaron diariamente con un microscopio *Nikon Eclipse TS100* (*Nikon Instruments*, EEUU) y se clasificaron según su estado de TEM en epiteliales, mixtas o fibroblastos, como se puede observar en la **figura 5**. Los experimentos se llevaron a cabo seleccionando únicamente las células con fenotipo epitelial, con el objetivo de simular la respuesta celular natural de un peritoneo sano.



**Figura 5. Visualización al microscopio óptico de los distintos fenotipos de las células mesoteliales procedentes del efluente peritoneal de la bolsa de drenaje de pacientes en DP. (A) Epitelial, (B) Mixto y (C) Fibroblástico. Imágenes tomadas con el objetivo 10X.**

### 3.3 Estimulación celular

Tras alcanzar una confluencia del 80%, se realizó una depleción en la que se disminuyó al mínimo la cantidad de nutrientes que reciben las células con el objetivo de mantenerlas en un estado quiescente que favorezca posteriormente la respuesta a los tratamientos. Para todos los experimentos realizados, las células se deplecionaron *overnight* con 300  $\mu$ l medio de cultivo RPMI suplementado con 1% de SBF y P/E y, posteriormente, fueron estimuladas durante 18 h. Todos los estímulos empleados se reconstituyeron siguiendo las indicaciones de la casa comercial, utilizándose para cada experimento la concentración indicada en la **tabla 1**. Las combinaciones usadas se especifican posteriormente en cada caso.

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

ESTÍMULO	CONCENTRACIÓN	CASA COMERCIAL
Paraquat	1 mM	Sigma
TNF- $\alpha$	1 ng/ml	R&D
MCC950	10 $\mu$ M	Millipore
mitoTEMPO	10 $\mu$ M	Santa Cruz
BAY-117085	10 $\mu$ M	Sigma
Resveratrol	5 $\mu$ M	Sigma

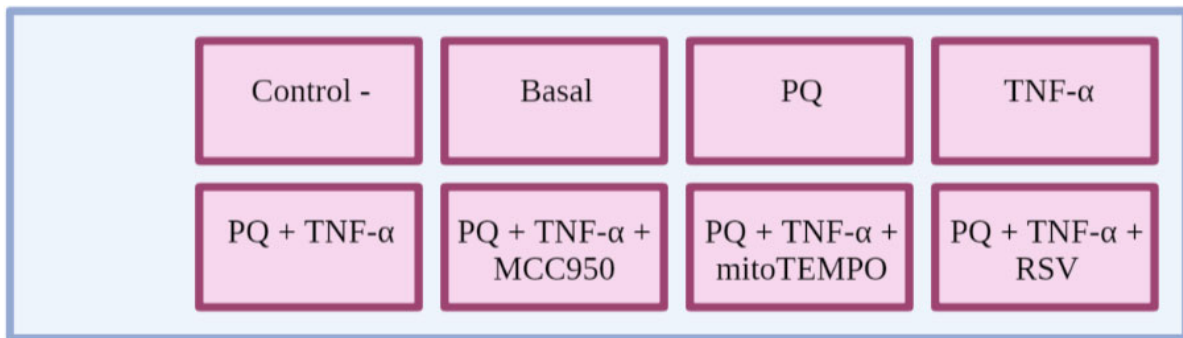
Para provocar la disfunción mitocondrial y la respuesta inflamatoria que se observa en las células mesoteliales de la membrana peritoneal tras la exposición prolongada al LD, se utilizaron el prooxidante paraquat (PQ) (*Sigma Aldrich*, EEUU) y la citoquina proinflamatoria TNF- $\alpha$  (*R&D Systems*, EEUU) respectivamente. Por otra parte se emplearon diversos inhibidores para evaluar la implicación de ciertas vías de señalización del proceso de inflamación: MCC950 (*Millipore*, EEUU) para inhibir el inflamasoma NLRP3, que se ensambla y activa ante señales de peligro como la liberación de ROS mitocondriales, MitoTEMPO (*Santa Cruz Biotechnology*, EEUU) como secuestrador selectivo de ROS mitocondriales y BAY-117085 (BAY) (*Sigma*) como inhibidor de la activación de NF-KB, un factor de transcripción que desempeña un papel clave en la regulación de la respuesta inmune al activar la transcripción de diversos mediadores inflamatorios, y finalmente, a modo de tratamiento, se evaluó el efecto del antioxidante natural RSV (*Sigma*).

Durante el proceso, la estimulación celular se llevó a cabo de forma escalonada. En primer lugar, se realizó una preincubación de 30 min con los diferentes inhibidores, o con RSV para evaluar su efecto con carácter preventivo. A continuación, para inducir la disfunción mitocondrial, las células se incubaron durante 30 min con PQ y, seguidamente, durante 18 h con TNF- $\alpha$  para provocar la inflamación.

### **3.4 Inmunofluorescencia de caspasa-1**

La expresión de caspasa-1 activa se evaluó en células mesoteliales de pacientes en DP mediante inmunofluorescencia. Esta técnica utiliza anticuerpos unidos químicamente a una sustancia fluorescente para detectar y localizar antígenos específicos en células y/o tejidos. El experimento se realizó con células de pacientes en DP, obtenidas a partir del efluente de la bolsa de drenado, que se repartieron entre los 8 pocillos de una chamber, donde se cultivaron hasta

alcanzar una confluencia del 80%, tras lo cual se deplecionaron y estimularon siguiendo el esquema indicado en la **figura 4**.



**Figura 4.** Esquema de las combinaciones de estímulos empleadas para evaluar la expresión de caspasa-1 mediante microscopía de fluorescencia.

Para el desarrollo de la técnica se fijaron las células con paraformaldehído al 4% durante 30 min a temperatura ambiente, tras lo cual se efectuaron dos lavados con PBS 1x (*Dako*, Dinamarca). A continuación, se llevó a cabo una primera incubación de 10 min con PBS 1X con 0,5% de Tritón (*Fisher Scientific*, EEUU) (PBST) para permeabilizar las membranas celulares, y una segunda incubación de 30 min con PBST con un 0,2% de seroalbúmina bovina (BSA; del inglés, *Bovine Serum Albumin*) (*Sigma*) con el objetivo de evitar uniones inespecíficas. Seguidamente, se incubaron todos los pocillos, a excepción del primero (control negativo), con 150  $\mu$ l de anticuerpo primario *rabbit anti-caspasa-1* (*Affinity Biosciences*, EEUU) diluido 1:250 en PBST durante 2h a temperatura ambiente. Posteriormente se realizaron tres lavados de 5 min con PBST, tras lo cual se hizo una segunda incubación durante 1h a temperatura ambiente con 150  $\mu$ l de anticuerpo secundario *donkey anti-rabbit* (dilución 1:400 en PBS 1X) marcado con el fluoróforo *Alexa Fluor 568*, cuya fluorescencia es roja (*Invitrogen*, EEUU). A partir de este momento, y hasta la finalización del protocolo, todos los pasos se efectuaron en ausencia de luz. Tras la segunda incubación se realizó una nueva serie de tres lavados durante 5 min con PBS 1X. A continuación, se efectuó una incubación a temperatura ambiente con 150  $\mu$ l de 4'6-diamidino-2-fenilindol (DAPI; del inglés, *41,6-Dinamidino-2-Phenylindole*) (*Sigma*) diluido 1:500 en PBS 1X con el objetivo de teñir los núcleos celulares de azul. Nuevamente se hicieron una serie de lavados durante 5 min: dos veces con PBS 1X y una vez con agua destilada; tras lo cual se desmontó la cámara de cultivo y se montó el portaobjetos con un cubreobjetos utilizando glicergel (*Dako*). Para la visualización de las muestras y la toma de fotografías se empleó un microscopio *Olympus BX61* (*Olympus*, Japón).

### 3.5 ELISA de IL-1 $\beta$

Se llevó a cabo un ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA; por su acrónimo en inglés, *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) para cuantificar la concentración de IL-1 $\beta$  en el sobrenadante del experimento, recogido tras la estimulación de las células procedentes del efluente peritoneal de pacientes en DP. La técnica consiste en un inmunoensayo a través del cual se detecta un antígeno inmovilizado mediante el uso de un anticuerpo unido a una enzima capaz de generar un producto detectable, habitualmente un cambio de color que hace posible la medición del antígeno en la muestra por espectrofotometría. Para realizar el ensayo, las células obtenidas a partir del efluente de la bolsa de drenado de pacientes en DP se repartieron en 5 pocillos de una placa de 48, donde se cultivaron hasta alcanzar una confluencia del 80%. Tras el tiempo de depleción y estimulación, siguiendo las combinaciones descritas en la **tabla 2**, el sobrenadante de cada pocillo se recogió y se centrifugó durante 10 min a 1500 rpm, desechando el pellet para evitar la presencia de cualquier tipo celular en la muestra. Los sobrenadantes fueron almacenados a -80°C hasta el momento de su uso.

**Tabla 2. Combinaciones de estímulos utilizadas para evaluar la concentración celular de IL-1 $\beta$  mediante ELISA.**

COMBINACIONES DE ESTÍMULOS EMPLEADAS	
Condición 1	Basal
Condición 2	PQ
Condición 3	TNF- $\alpha$
Condición 4	PQ + TNF- $\alpha$
Condición 5	MCC950 + PQ + TNF- $\alpha$
Condición 6	mitoTEMPO + PQ + TNF- $\alpha$
Condición 7	RSV + PQ + TNF- $\alpha$

La cuantificación de la expresión proteica de IL-1 $\beta$  se realizó usando el kit *Human IL-1 $\beta$ / IL-1F2 Quantikine HS ELISA (R&D Systems)*, siguiendo las instrucciones del fabricante. En primer lugar, se añadieron 50  $\mu$ l de *Assay Diluent RD1-36* a cada uno de los pocillos de la placa de 96, previamente recubierta con un anticuerpo monoclonal específico para IL-1 $\beta$ . A continuación, en la primera fila de la placa se añadieron diferentes diluciones de concentración conocida de IL-1 $\beta$  para realizar la curva patrón, y en el resto de la placa se incubaron las muestras (100  $\mu$ l/pocillo) durante 2h a temperatura ambiente en agitación. Tras realizar 4 lavados de 400  $\mu$ l/pocillo con tampón de lavado para eliminar las sustancias no unidas al

anticuerpo, se realizó una incubación de 1h a temperatura ambiente con 200  $\mu$ l de *Human IL-1 $\beta$  Conjugate*, un anticuerpo policlonal biotinilado específico para la IL-1 $\beta$  humana. Posteriormente se realizó una nueva tanda de lavados para eliminar cualquier reactivo de anticuerpo-biotina no unido, tras lo cual se añadieron 200  $\mu$ l de un conjugado enzimático de estreptavidina (que se utiliza para detectar moléculas biotiniladas) y peroxidasa de rábano picante (HRP; del inglés, *Horseradish-Peroxidase*) durante 30 min a temperatura ambiente. Seguidamente se efectuaron 4 nuevos lavados para eliminar cualquier reactivo de estreptavidina-enzima no unido, tras lo cual se incubaron los pocillos durante 30 min a temperatura ambiente y en oscuridad con una solución sustrato (200  $\mu$ l/pocillo) que contenía una proporción 1:1 de peróxido de hidrógeno y tetrametilbencidina. A continuación se añadieron 50  $\mu$ l de una solución *stop* de ácido sulfúrico para parar la reacción, que provoca un cambio de color de azul a amarillo. Finalmente, se determinó la densidad óptica mediante espectrofotometría a una absorbancia de 450 nm, utilizando el lector de placas *Infinite 200 NanoQuant* (Tecan, Suiza).

Para realizar la curva patrón se hicieron diluciones seriadas con una concentración conocida de IL-1 $\beta$ , lo cual permitió calcular posteriormente su concentración en las muestras mediante la extrapolación de los valores de absorbancia obtenidos (8,0-0,125 pg/ml).

### **3.6 Tratamiento de datos y análisis estadístico**

Los análisis estadísticos que permitieron evaluar los resultados obtenidos mediante ELISA se realizaron utilizando el software estadístico *GraphPad PRISM* versión 5.01 (*GraphPad Software*, EEUU). Los datos que presentaron una distribución normal fueron analizados mediante el test de Wilcoxon, mientras que los datos no paramétricos se analizaron mediante el test de Mann-Whitney. Las diferencias se consideraron significativas estadísticamente cuando  $P < 0,05$ .

Las inmunofluorescencias fueron analizadas y cuantificadas utilizando el programa de procesamiento de imágenes *ImageJ* versión 1.50e (*NIH*, EEUU). La positividad de la señal de caspasa-1 en las células se obtuvo como un promedio de la señal positiva obtenida en cada una de las imágenes. Los resultados se expresaron como píxeles positivos en el área total. Utilizando el programa *GraphPad PRISM*, se realizaron gráficas para visualizar la intensidad de fluorescencia de caspasa-1 en cada una de las condiciones experimentales. Dado que únicamente se procesaron los datos de dos inmunofluorescencias no se llevó a cabo un análisis estadístico puesto que el tamaño muestral no es suficiente para alcanzar diferencias significativas.

## 4. Resultados

### 4.1 Efecto de la disfunción mitocondrial sobre la activación del inflamasoma en células mesoteliales humanas

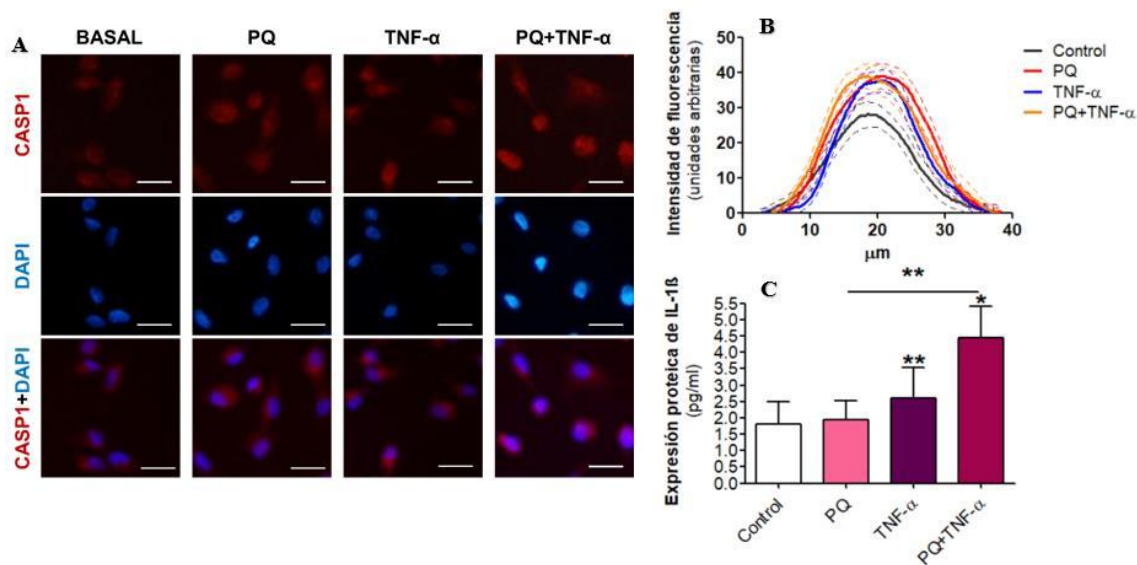
Para evaluar el papel de la disfunción mitocondrial en la activación del inflamasoma se midió la expresión de caspasa-1 mediante inmunofluorescencia y la síntesis de IL-1 $\beta$  mediante ELISA en células mesoteliales procedentes del efluente peritoneal de pacientes tratados con DP, que se cultivaron y se trataron durante 18 h con los estímulos correspondientes. El efecto de la disfunción mitocondrial sobre la activación de caspasa-1 y la expresión proteica de IL-1 $\beta$  se analizó mediante la estimulación de las células con el prooxidante PQ. Asimismo, también se testó el efecto de la citoquina proinflamatoria TNF- $\alpha$  y de la combinación de ambos estímulos.

La caspasa-1 es una proteína que participa en el ensamblaje del inflamasoma NLRP3, una plataforma multiproteica que se activa ante señales de peligro, como el aumento de ROS mitocondriales observado en pacientes tratados con DP, provocando la maduración de la IL-1 $\beta$ , una de las principales citoquinas que participan en la respuesta inflamatoria. Por esta razón, el análisis de la expresión de caspasa-1 e IL-1 $\beta$  es una aproximación que nos permite evaluar, no solo el papel de la disfunción mitocondrial en la activación del inflamasoma, sino también los mediadores implicados en este proceso y el efecto del resveratrol en el contexto de la patología peritoneal.

Como se puede observar en las **figuras 5A** y **5B**, el inductor de daño mitocondrial PQ, la citoquina proinflamatoria TNF- $\alpha$  y la combinación de ambos, produce una mayor intensidad de fluorescencia de caspasa-1 que la señal obtenida en la condición basal. Por lo tanto, este resultado sugiere que tanto la respuesta inflamatoria como la disfunción mitocondrial, procesos que tienen lugar en el peritoneo de los pacientes en DP, conducen a la activación del inflamasoma, obteniendo como resultado una mayor intensidad de fluorescencia de la caspasa-1.

Como se puede comprobar en la **figura 5C**, el PQ no parece inducir por sí mismo un aumento de la expresión proteica de IL-1 $\beta$ . Por el contrario, la estimulación con TNF- $\alpha$  provoca un aumento significativo ( $p \leq 0,01$ ) de la activación de caspasa-1. Lo más llamativo es que la combinación de ambos estímulos produce un aumento sinérgico y significativo ( $p \leq 0,05$ ) de la concentración de IL-1 $\beta$  liberada por las células mesoteliales de pacientes en DP.





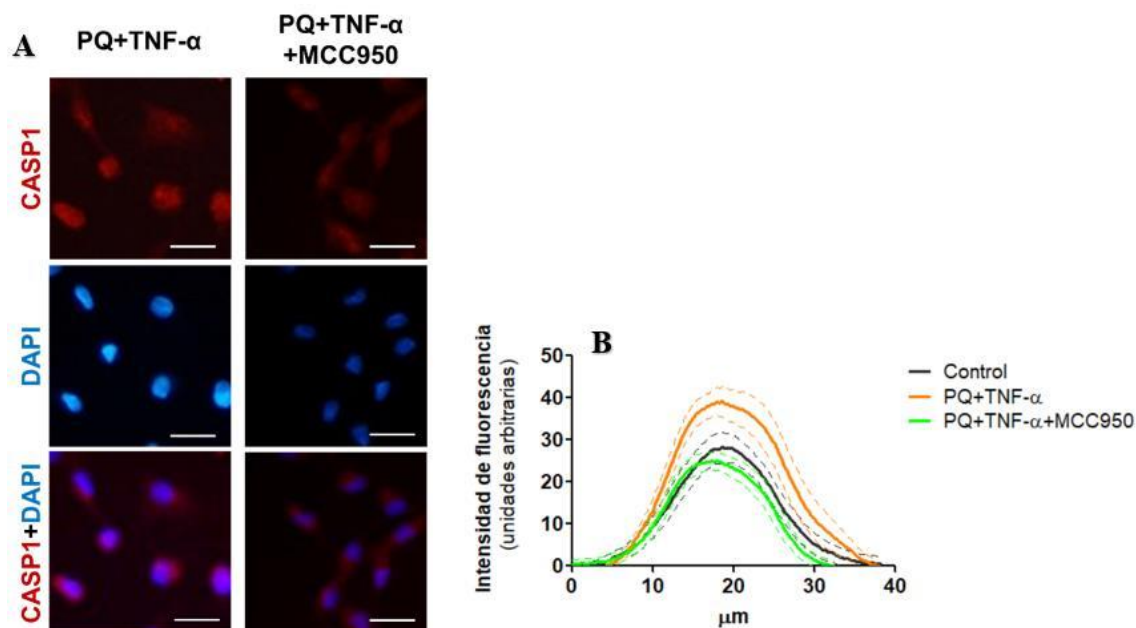
**Figura 5. Efecto de la disfunción mitocondrial y la respuesta inflamatoria sobre la expresión proteica de caspasa-1 e IL-1 $\beta$  en células mesoteliales humanas de pacientes en DP.** Las células procedentes del efluente peritoneal se sembraron hasta alcanzar un 80% de confluencia, se deplecionaron *overnight* y se preincubaron durante 30 min con el prooxidante PQ (1mM). A continuación se trataron 18 h con la citoquina proinflamatoria TNF- $\alpha$  (1ng/ml). Finalmente se midió la expresión de caspasa-1 mediante fluorescencia en las células (n=2) y la expresión de IL-1 $\beta$  mediante ELISA en el sobrenadante obtenido tras la estimulación de las células (n=11). **A)** Imágenes representativas de la inmunofluorescencia de caspasa-1 con el objetivo 20X. La señal de caspasa-1 se muestra en rojo y los núcleos en azul. Barra de escala equivalente a 25  $\mu$ m. **B)** Representación gráfica de la intensidad de fluorescencia de caspasa-1 en respuesta a los diferentes estímulos. Las líneas continuas representan la media de intensidad y las discontinuas el error estándar de la media (EEM). **C)** La gráfica representa la media  $\pm$  EEM de la expresión proteica de IL-1 $\beta$  determinada mediante ELISA (pg/ml) (\*P $\leq$ 0,05 y \*\*P $\leq$ 0,01).

Por lo tanto, este resultado sugiere que la disfunción mitocondrial aumenta de manera significativa la expresión proteica de IL-1 $\beta$  inducida por TNF- $\alpha$ . De este modo, las células mesoteliales se vuelven más sensibles ante la respuesta inflamatoria cuando presentan un daño mitocondrial como el que se observa en pacientes tratados con DP, lo que implica la activación previa del inflamasoma.

#### 4.2 Implicación del receptor NLRP3 en la expresión de caspasa-1 en células mesoteliales humanas

Los resultados descritos en el apartado anterior sugieren que la disfunción mitocondrial está involucrada en la activación del inflamasoma, por lo que adicionalmente se evaluó la implicación del receptor NLRP3 en la activación de caspasa-1, utilizando para ello el inhibidor del inflamasoma MCC950. Concretamente se realizó una inmunofluorescencia de caspasa-1 en células mesoteliales procedentes del efluente peritoneal de pacientes tratados con DP, que se cultivaron y se trataron durante 18h con los estímulos correspondientes.

Como resultado, se puede observar que el inhibidor del inflamasoma NLRP3 disminuye la intensidad de fluorescencia de caspasa-1 en comparación con la obtenida con PQ+TNF- $\alpha$ , alcanzando niveles similares a los obtenidos en la condición basal (**figuras 6A y 6B**).



**Figura 6. Efecto del inhibidor MCC950 sobre la expresión proteica de caspasa-1 inducida por PQ y TNF- $\alpha$  en células mesoteliales humanas de pacientes en DP.** Las células procedentes del efluente peritoneal se sembraron hasta alcanzar un 80% de confluencia, se deplecionaron *overnight* y se preincubaron con MCC950 (10  $\mu$ M) durante 30 min. Seguidamente se pretrataron con PQ (1 mM) 30 min y a continuación se indujo la respuesta inflamatoria con TNF- $\alpha$  durante 18 h. Finalmente se midió la expresión de caspasa-1 en las células (n=2). **A)** Imágenes representativas de la inmunofluorescencia de caspasa-1 tomadas con el objetivo 20X. La señal de caspasa-1 se observó en rojo y los núcleos en azul. Barra de escala equivalente a 25  $\mu$ m. **B)** Gráfica representativa de la intensidad de fluorescencia de caspasa-1 provocada por el tratamiento con MCC950 respecto a la combinación PQ+TNF- $\alpha$  y el control. Las líneas continuas representan la media de intensidad y las discontinuas el EEM.

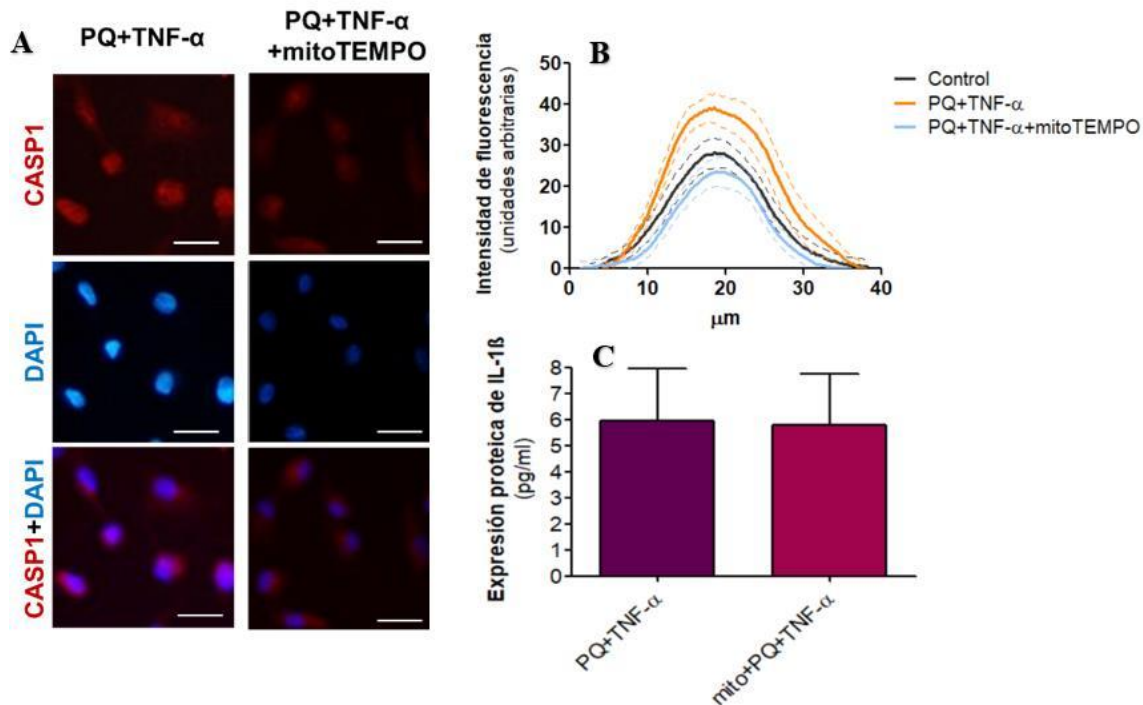
Tal y como era de esperar, estos resultados muestran que el receptor del inflamasoma NLRP3 está implicado en la activación del inflamasoma inducida por disfunción mitocondrial en un escenario inflamatorio. En consecuencia, podría constituir en el futuro una diana terapéutica para evitar que se desencadene el proceso inflamatorio.

#### 4.3 Implicación de los ROS mitocondriales en la activación del inflamasoma en células mesoteliales humanas

Habiendo visto que la disfunción mitocondrial provoca la expresión de caspasa-1, que a su vez se traduce en la maduración de IL-1 $\beta$ , y bajo la premisa de que las mitocondrias dañadas producen una mayor cantidad de ROS, se quiso evaluar si los ROS mitocondriales están implicados en la activación del inflamasoma, utilizándose para ello el secuestrador selectivo de ROS mitocondriales mitoTEMPO. Para ello, se llevó a cabo una inmunofluorescencia de caspasa-1 en las células mesoteliales procedentes del efluente peritoneal de pacientes tratados con DP, que se cultivaron y se trataron durante 18 h con los estímulos correspondientes. También se realizó un ELISA para cuantificar IL-1 $\beta$  en el sobrenadante celular.



En las **figuras 7A y 7B** se puede observar que las células tratadas con mitoTEMPO emiten una menor intensidad de fluorescencia de caspasa-1 que la obtenida al combinar PQ y TNF- $\alpha$ , alcanzando niveles de expresión parecidos a la condición basal. Este resultado sugiere que los ROS procedentes de la mitocondria están implicados en la activación del inflammasoma inducida por disfunción mitocondrial en un contexto inflamatorio.



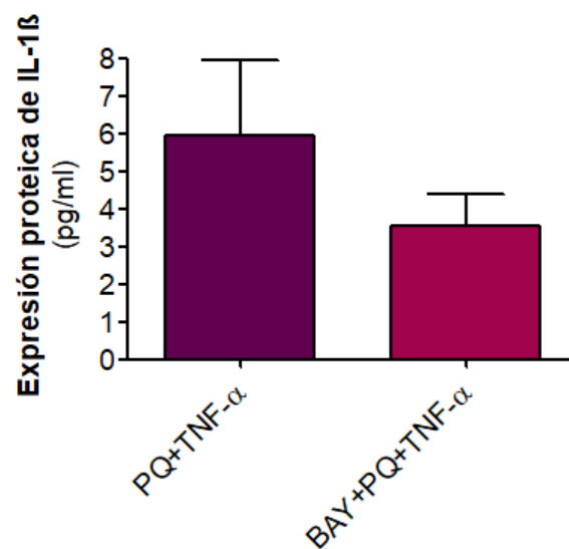
**Figura 7.** Efecto del inhibidor mitoTEMPO sobre la expresión proteica de caspasa-1 e IL-1 $\beta$  inducida por PQ y TNF- $\alpha$  en células mesoteliales humanas de pacientes en DP. Las células procedentes del efuente peritoneal se sembraron hasta alcanzar un 80% de confluencia, se deplecionaron *overnight* y se preincubaron con mitoTEMPO (10  $\mu\text{M}$ ) durante 30 min. Seguidamente se pretrataron con PQ (1 mM) 30 min y a continuación se indujo la respuesta inflamatoria con TNF- $\alpha$  (1ng/ml) durante 18 h. Finalmente se midió la expresión de caspasa-1 mediante fluorescencia en las células (n=2) y la expresión de IL-1 $\beta$  mediante ELISA en el sobrenadante obtenido tras la estimulación de las células (n=15). **A)** Imágenes representativas de la inmunofluorescencia de caspasa-1 con el objetivo 20X. La señal de caspasa-1 se muestra en rojo y los núcleos en azul. Barra de escala equivalente a 25  $\mu\text{m}$ . **B)** Representación gráfica de la intensidad de fluorescencia de caspasa-1 en respuesta a los diferentes estímulos. Las líneas continuas representan la media de intensidad y las discontinuas el EEM. **C)** La gráfica representa la media  $\pm$  EEM de la expresión proteica de IL-1 $\beta$  determinada mediante ELISA (pg/ml).

De este modo, a pesar de que el mitoTEMPO no actúa directamente sobre el inflammasoma NLRP3, la expresión de este complejo se reduce debido a una menor señal de ROS que induce la activación de NLRP3, lo cual se verifica por la disminución de la intensidad de la fluorescencia de caspasa-1, proteína clave en este proceso.

Por otra parte, en discrepancia con el resultado de la expresión de caspasa-1, el tratamiento con mitoTEMPO no disminuyó los niveles de expresión de IL-1 $\beta$  (**figura 7C**), alcanzando valores similares a los obtenidos con la combinación PQ+TNF- $\alpha$ .

#### 4.4 Implicación del factor nuclear NF- $\kappa$ B en la expresión de IL-1 $\beta$ en células mesoteliales humanas

El complejo NF- $\kappa$ B es un factor de transcripción sensible al estado redox celular que cuando se activa se transloca desde el citosol hasta el núcleo, donde modula la transcripción de una gran variedad de genes involucrados en la respuesta inflamatoria, entre los que se encuentra el gen que codifica para el receptor NLRP3 y la pro-IL-1 $\beta$ . Por ello, se quiso testar la implicación de NF- $\kappa$ B en la respuesta inflamatoria descrita, utilizando el inhibidor BAY-117085, que evita la translocación de NF- $\kappa$ B al núcleo. Para ello, se realizó un ELISA de IL-1 $\beta$  en los sobrenadantes de células mesoteliales procedentes del efluente peritoneal de pacientes tratados con DP, que se cultivaron y se trataron durante 18 h con los estímulos correspondientes.

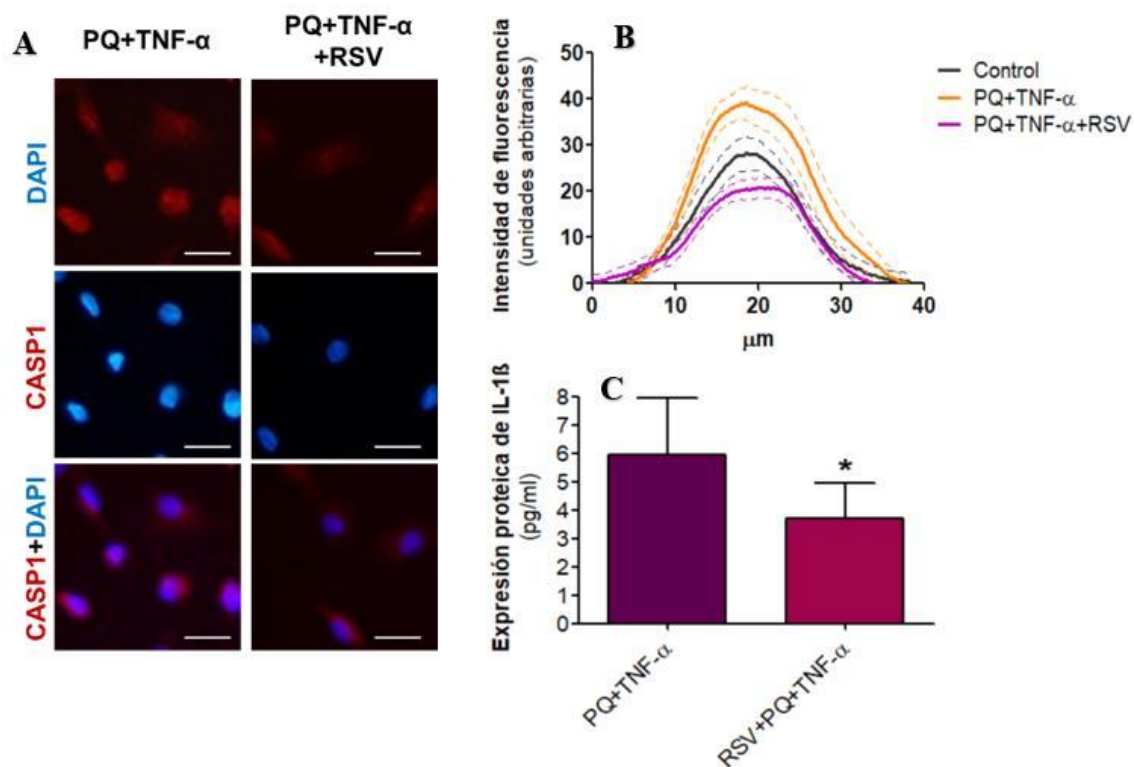


**Figura 8.** Efecto del inhibidor BAY sobre la expresión proteica de IL-1 $\beta$  inducida por PQ y TNF- $\alpha$  en células mesoteliales humanas de pacientes en DP. Las células procedentes del efluente peritoneal se sembraron hasta alcanzar un 80% de confluencia, se deplecionaron *overnight* y se preincubaron con BAY (10  $\mu$ M) durante 30 min. Seguidamente se pretrataron con PQ (1 mM) 30 min y a continuación se indujo la respuesta inflamatoria con TNF- $\alpha$  (1ng/ml) durante 18 h. Finalmente se midió la expresión de IL-1 $\beta$  mediante ELISA en el sobrenadante obtenido tras la estimulación de las células (n=7). La gráfica representa la media  $\pm$  EEM de la expresión proteica de IL-1 $\beta$  determinada mediante ELISA (pg/ml).

Pese a no ofrecer un resultado significativo, en la **figura 8** se puede observar que el tratamiento con BAY disminuyó considerablemente la concentración de IL-1 $\beta$  inducida por PQ y TNF- $\alpha$ . Este resultado indica que el factor nuclear NF- $\kappa$ B podría estar implicado en el aumento sinérgico de la expresión de IL-1 $\beta$  que tiene lugar al inducir la respuesta inflamatoria en presencia de una disfunción mitocondrial.

#### 4.5 Efecto del resveratrol sobre la expresión de caspasa-1 e IL-1 $\beta$ en células mesoteliales humanas.

Teniendo en cuenta que los ROS mitocondriales y la respuesta inflamatoria parecen inducir la expresión de caspasa-1, que como se ha visto juega un papel importante en la maduración de citoquinas claves para el desarrollo de la inflamación que se observa en el peritoneo de pacientes tratados con DP, cobra sentido la búsqueda de una estrategia terapéutica con propiedades antioxidantes y antiinflamatorias como, por ejemplo, el tratamiento con resveratrol. Para evaluar la capacidad de este compuesto sobre la activación del inflammasoma, se llevó a cabo una inmunofluorescencia de caspasa-1 en células mesoteliales procedentes del efluente peritoneal de pacientes tratados con DP, que se cultivaron y se trataron durante 18h con los estímulos correspondientes. Asimismo, se realizó un ELISA para cuantificar IL-1 $\beta$  en el sobrenadante celular.



**Figura 9.** Efecto del RSV sobre la expresión proteica de caspasa-1 e IL-1 $\beta$  inducida por PQ y TNF- $\alpha$  en células mesoteliales humanas de pacientes en DP. Las células procedentes del efluente peritoneal se sembraron hasta alcanzar un 80% de confluencia, se deplecionaron *overnight* y se preincubaron con RSV (5  $\mu\text{M}$ ) durante 30 min. Seguidamente se pretrataron con PQ (1 mM) 30 min y a continuación se indujo la respuesta inflamatoria con TNF- $\alpha$  (1ng/ml) durante 18 h. Finalmente se midió la expresión de caspasa-1 mediante fluorescencia en las células (n=2) y la expresión de IL-1 $\beta$  mediante ELISA en el sobrenadante obtenido tras la estimulación de las células (n=7). **A)** Imágenes representativas de la inmunofluorescencia de caspasa-1 con el objetivo 20X. La señal de caspasa-1 se muestra en rojo y los núcleos en azul. Barra de escala equivalente a 25  $\mu\text{m}$ . **B)** Representación gráfica de la intensidad de fluorescencia de caspasa-1 en respuesta a los diferentes estímulos. Las líneas continuas representan la media de intensidad y las discontinuas el EEM. **C)** La gráfica representa la media  $\pm$  EEM de la expresión proteica de IL-1 $\beta$  determinada mediante ELISA (pg/ml) (\*P $\leq$ 0,05).

En las **figuras 9A y 9B** se puede observar que la señal de fluorescencia emitida por la caspasa-1 en el caso de las células pretratadas con RSV es menor a la obtenida en condiciones que simular un escenario de disfunción mitocondrial acompañado de inflamación (PQ+TNF- $\alpha$ ). Asimismo, podemos constatar que la concentración de IL-1 $\beta$  también es significativamente menor ( $p \leq 0,05$ ) tras el pretratamiento con RSV en comparación con el aumento sinérgico obtenido tras la estimulación conjunta con PQ+TNF- $\alpha$  (**figura 9C**).

Ambos resultados sugieren que el RSV podría modular con carácter preventivo la activación del inflammasoma inducida por la disfunción mitocondrial y la respuesta inflamatoria, al mostrar una menor señal de caspasa-1 y un descenso de la concentración de IL-1 $\beta$  liberada al medio.

## 5. Discusión

La ERC engloba a un conjunto de enfermedades cuyo denominador común es la presencia de una alteración estructural o funcional en los riñones que persiste durante más de tres meses, incrementándose su prevalencia con el envejecimiento y la presencia de factores de riesgo como la diabetes o la arteriosclerosis (8). Cuando la enfermedad alcanza estadios avanzados surge la necesidad de reemplazar la función de los riñones nativos, por lo que más de 64000 personas en España se encuentran en tratamiento renal sustitutivo, que puede realizarse mediante trasplante, HD o DP (11). Aunque ambas modalidades de diálisis son equivalentes en términos de eficacia dialítica y morbimortalidad, la DP es menos costosa y ofrece una mejor calidad de vida que la HD (14, 15). Por otra parte, la DP también presenta una serie de desventajas que pueden derivar del uso de la técnica, como los sangrados locales, las complicaciones infecciosas y los cambios estructurales y funcionales que se producen en el peritoneo, y que pueden derivar en lo que se conoce como fallo de ultrafiltración (14, 17).

En este proceso juegan un papel importante los LD, que se caracterizan por presentar concentraciones glucotóxicas que permiten la filtración de los productos de deshecho a través del peritoneo (21). La exposición prolongada a estas soluciones no fisiológicas desencadena varios eventos intracelulares como el estrés oxidativo y la inflamación (23), provocando la transformación de las células mesoteliales del peritoneo en fibroblastos como consecuencia de un proceso de TEM (31), que culmina en cambios tisulares y estructurales como la fibrosis y la angiogénesis (42, 43). La contrapartida funcional de esta situación es una pérdida progresiva de la capacidad dialítica de la membrana peritoneal, de manera que si prevenimos la

inflamación podremos evitar la fibrosis y preservar la arquitectura del tejido, prolongando el tiempo que los pacientes pueden ser tratados con DP.

En respuesta a las características bioincompatibles del LD se ha observado un incremento en la producción de ROS por parte de las mitocondrias (24). Este orgánulo constituye a su vez uno de los blancos de dichas moléculas, por lo que se produce un bucle de retroalimentación que induce un estrés oxidativo celular cada vez mayor (29). Por otra parte, se sabe que la producción incontrolada de estas especies altera multitud de procesos celulares como la regulación de numerosas vías de señalización proinflamatorias. En este sentido, también se ha observado que el aumento de ROS conduce al ensamblaje y activación del inflammasoma NLRP3 (32), un complejo multiproteico que está implicado en la maduración de IL-1 $\beta$  e IL-18, cuya sobreproducción conduce al estado crónico de inflamación que se produce en la patología peritoneal (33).

En este contexto, en la actualidad son muy pocos los datos que existen sobre la implicación de la mitocondria en los procesos mencionados. Por ello, este trabajo se ha centrado en evaluar el papel de la disfunción mitocondrial en la activación del inflammasoma NLRP3, y en testar el posible efecto protector del antioxidante natural resveratrol sobre este proceso.

### **5.1 Efecto de la disfunción mitocondrial sobre la activación del inflammasoma en células mesoteliales humanas**

En las últimas décadas se ha demostrado la implicación de la disfunción mitocondrial y del estrés oxidativo en varias patologías relacionadas con el envejecimiento, como las enfermedades neurodegenerativas, articulares y cardíacas, o la diabetes y la hipertensión (55). De igual modo, la implicación de la mitocondria en las enfermedades renales es cada vez más clara. En este sentido, se sabe que la disfunción mitocondrial contribuye a la progresión de la ERC independientemente de la causa que la produce (56). Por otra parte, en el contexto de la DP se ha demostrado que el nivel de ROS se encuentra estrechamente ligado con la inflamación crónica y la fibrosis peritoneal (57). Como principales productoras de ROS, también se ha estudiado el papel de las mitocondrias en los cambios estructurales que sufre el peritoneo durante la DP, habiéndose observado que los ROS mitocondriales están implicados en el proceso de la TEM que precede al fallo de ultrafiltración (58).

En base a estos precedentes, en primer lugar, se evaluó el papel de la disfunción mitocondrial en la activación del inflammasoma mediante el análisis de la expresión de caspasa-1 e IL-1 $\beta$  en células mesoteliales humanas. La caspasa-1 es una proteína que forma parte del inflammasoma NLRP3, y es la principal responsable de la maduración de la citoquina

proinflamatoria IL-1 $\beta$  (33). Por lo tanto, el estudio de la expresión de caspasa-1 e IL-1 $\beta$  activas es una buena forma de evaluar la activación del inflamasoma. Para la realización de estos estudios, se seleccionaron las células procedentes del efluente peritoneal de pacientes en DP que presentaban un fenotipo epitelial, con el objetivo de recrear *in vitro*, en la medida de lo posible, la respuesta de un peritoneo sano. A continuación, las células fueron tratadas con PQ y TNF- $\alpha$  para inducir disfunción mitocondrial e inflamación respectivamente. Como respuesta, se ha observado que la disfunción mitocondrial *per se* provoca un aumento de la expresión proteica de caspasa-1. En este sentido, parece que este incremento no es suficiente para llevar a cabo la maduración de IL-1 $\beta$  puesto que la estimulación con PQ no se traduce en un aumento de la expresión de esta citoquina inflamatoria. Tal y como se esperaba, los niveles de expresión de caspasa-1 e IL-1 $\beta$  aumentaron cuando las células mesoteliales fueron tratadas con TNF- $\alpha$ , una de las moléculas claves en el desarrollo de la respuesta inflamatoria. En cuanto al efecto conjunto de la disfunción mitocondrial (preincubación con PQ) y la presencia de TNF- $\alpha$ , este provoca un aumento en la expresión de caspasa-1 respecto a la condición basal, de intensidad similar al obtenido con la estimulación de ambos compuestos por separado. Lo más interesante es que la combinación de estos estímulos tiene como consecuencia un aumento sinérgico en la activación de IL-1 $\beta$ , lo que sugiere que la activación del inflamasoma inducida por TNF- $\alpha$  es mucho mayor en las células mesoteliales cuando sus mitocondrias están dañadas.

Los resultados obtenidos concuerdan con los precedentes mencionados anteriormente y son apoyados por estudios realizados en otras enfermedades como la artritis reumatoide o la artrosis, donde se ha visto que la disfunción mitocondrial induce inflamación en sinoviocitos y condrocitos humanos, causando una amplificación de la respuesta inflamatoria inducida por IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$  (59, 60). En el contexto de la DP, también se ha observado que la disfunción mitocondrial agrava la respuesta inflamatoria inducida por citoquinas en células mesoteliales humanas, lo que concuerda con los resultados obtenidos en este trabajo (61). Por otra parte, se sabe que la acumulación de ADN mitocondrial (ADNmt) en el citosol, provocada por el daño mitocondrial agudo, es uno de los estímulos que pueden activar al inflamasoma (62). Así pues, en un estudio reciente se observó que existía una correlación positiva entre la cantidad de ADNmt presente en el dializado de pacientes y su estado de inflamación intraperitoneal (63). Otros estudios han mostrado que el ADNmt libre en el dializado está significativamente correlacionado con la función peritoneal en pacientes prevalentes en tratamiento con DP (64).

Habiendo comprobado en este primer bloque que la disfunción mitocondrial provoca un aumento de la expresión de caspasa-1, y dado que esta enzima requiere la activación previa del



inflammasoma, a continuación, se quiso evaluar la implicación de NLRP3 en la expresión de caspasa-1 en células mesoteliales humanas.

## **5.2 Implicación del receptor NLRP3 en la expresión de caspasa-1 en células mesoteliales humanas**

Los inflammasomas son un grupo de plataformas proteicas que controlan la activación de la caspasa-1, y por tanto son responsables de la maduración de citoquinas inflamatorias como IL-1 $\beta$  o IL-18 (33). Cada uno de ellos se define por su proteína receptora, siendo NLRP3 la más conocida debido a su relevancia en muchas enfermedades inflamatorias y autoinmunes. Se sabe que la activación de este receptor tiene lugar tras su exposición a un amplio abanico de estímulos entre los que se incluyen los ROS mitocondriales (37). En este sentido, dado que los resultados previamente descritos en este trabajo sugieren que la disfunción mitocondrial está involucrada en la activación del inflammasoma, a continuación, se quiso evaluar la implicación del receptor NLRP3 en la activación de caspasa-1. Para ello, se utilizó el reactivo MCC950, un potente inhibidor de la activación del inflammasoma. Como era de esperar, los resultados obtenidos mostraron que el inhibidor MCC950 reduce la expresión de caspasa-1 inducida por la activación conjunta de PQ y TNF- $\alpha$ , obteniéndose niveles similares a los de la condición basal. Esto sugiere que el receptor NLRP3 está implicado en la activación del inflammasoma inducida por daño mitocondrial y citoquinas inflamatorias.

Estos hallazgos concuerdan con los obtenidos por Guo C. y colaboradores en el contexto de la artritis reumatoide, una enfermedad caracterizada por un alto grado de inflamación al igual que el observado en la fisiopatología peritoneal durante la DP. Los autores demostraron que la expresión de NLRP3, caspasa-1 e IL-1 $\beta$  inducida por artritis se redujo en el tejido sinovial tras el tratamiento con el inhibidor MCC950 (65). Siguiendo esta línea, en un estudio reciente se probó que el uso de MCC950 ejerce un efecto protector frente al daño cardíaco en ratones con una dieta alta en azúcar, que se relacionó con una mejora del flujo autofágico (66). Adicionalmente, se ha demostrado que el silenciamiento de NLRP3 frena la arteriosclerosis y estabiliza la progresión de la placa en ratones con deficiencia de apolipoproteína E, cuyo defecto causa un trastorno lipídico que eleva considerablemente la concentración de colesterol y triglicéridos en sangre (67). En el contexto de la DP, se ha visto que durante la peritonitis aguda inducida por una infección bacteriana, el inflammasoma NLRP3 se activa provocando la liberación de IL-1 $\beta$  al dializado, jugando un papel crucial en el remodelado del peritoneo que provoca el fallo de ultrafiltración (68). Por tanto, el bloqueo del eje NLRP3/IL-1 $\beta$  podría prevenir las alteraciones peritoneales y los defectos en el transporte peritoneal inducidos por

peritonitis. En general, todos estos resultados permiten considerar al receptor NLRP3 como una buena diana terapéutica para evitar que se desencadene el proceso inflamatorio observado no solo en pacientes en DP, sino también en muchas otras patologías relacionadas con el proceso de envejecimiento.

Ya se ha demostrado que el receptor NLRP3 está implicado en la activación del inflamasoma, que conduce a un aumento de la expresión de caspasa-1 en un escenario de disfunción mitocondrial. Dado que este proceso se manifiesta por un aumento en la producción de ROS, se quiso testar la posible implicación de la mitocondria en la activación del inflamasoma mediante el estudio de la repercusión de ROS mitocondriales en la expresión de caspasa-1 e IL-1 $\beta$ .

### **5.3 Implicación de los ROS mitocondriales en la activación del inflamasoma en células mesoteliales humanas.**

Los ROS son moléculas que contienen un electrón desapareado en el orbital externo, motivo por el cual reaccionan fácilmente con otras moléculas pudiendo llegar a producir un daño oxidativo (69). Se ha demostrado que la bioincompatibilidad de los LD provoca un incremento en la producción de ROS por parte de las mitocondrias, generando un estrés oxidativo en las células de la membrana peritoneal y afectando a multitud de procesos celulares, entre ellos factores de transcripción que participan en la respuesta inflamatoria (24, 29, 34). Además, diversos estudios *in vitro* y *ex vivo* han demostrado que el contacto con el LD aumenta la expresión de IL-1 $\beta$ , una de las principales citoquinas que participan en el proceso inflamatorio y cuya maduración tiene lugar gracias a la activación del inflamasoma NLRP3 (70).

Por otra parte, como se mencionó anteriormente, los ROS mitocondriales pueden inducir la activación de señales que conducen al ensamblaje del inflamasoma NLRP3, y por ello, se quiso evaluar el papel de los ROS mitocondriales en la activación del inflamasoma en las células procedentes del dializado de pacientes en DP. Con este objetivo, se utilizó el mitoTEMPO, un compuesto que actúa como un secuestrador selectivo de ROS mitocondriales, y se evaluó la expresión de caspasa-1 e IL-1 $\beta$ . Los resultados obtenidos muestran que el mitoTEMPO disminuye la expresión de caspasa-1 inducida por PQ y TNF- $\alpha$  a niveles similares a los basales, sugiriendo que los ROS mitocondriales están implicados en la activación del inflamasoma en células mesoteliales humanas. Hay que tener en cuenta que pese a haber observado esta tendencia, el resultado no alcanza la significancia estadística debido al tamaño muestral, y que por tanto sería interesante aumentar el número de experimentos. Estos



resultados concuerdan con otros estudios realizados en células procedentes del efluente peritoneal de pacientes en DP, que muestran que los ROS mitocondriales están implicados en agravamiento provocado por el daño mitocondrial de la respuesta inflamatoria inducida por citoquinas (61).

Sin embargo, al estudiar la expresión de IL-1 $\beta$ , no se observaron diferencias en la concentración de esta citoquina inducida por disfunción mitocondrial y TNF- $\alpha$  al tratarse las células con el inhibidor de ROS mitocondriales. Esto podría ser debido a que la activación de caspasa-1 no fuese la suficiente para llevar a cabo la maduración de IL-1 $\beta$  a las 18 h de estimulación, por lo que sería interesante evaluar la activación de IL-1 $\beta$  en un tiempo superior. En este sentido, en otros estudios realizados en el ámbito de la disfunción renal, sí se ha visto que la reducción de ROS mitocondriales obtenida al utilizar el mitoTEMPO disminuyó la producción de IL-1 $\beta$  en células epiteliales renales en un modelo animal de sepsis (71).

Habiendo demostrado que el nivel de expresión de caspasa-1 disminuye al emplear el secuestrador de ROS mitocondriales mitoTEMPO, los cuales parecen estar implicados en la activación del inflamasoma, se quiso analizar adicionalmente la participación del factor nuclear NF-KB en la expresión de IL-1 $\beta$  dado que su ruta de activación tiene lugar mediante diferentes factores entre los que se encuentra el estrés oxidativo.

#### **5.4 Implicación del factor nuclear NF-KB en la expresión de IL-1 $\beta$ en células mesoteliales humanas**

El complejo NF-KB es un factor de transcripción que controla una gran variedad de genes involucrados en la respuesta inflamatoria. En condiciones basales se encuentra secuestrado en el citoplasma debido a la unión con su inhibidor, IKB. Pero, si el complejo es desbloqueado en respuesta a un aumento de ROS, se puede translocar al núcleo iniciando la transcripción de sus genes diana, entre los que se encuentra el que codifica para el receptor NLRP3, que como se mencionó anteriormente forma parte del complejo inflamasoma, o citoquinas como la IL-1 $\beta$  (32, 34, 36).

Para testar la implicación de este factor en la activación del inflamasoma NLRP3 se utilizó el inhibidor BAY-117085, que evita la translocación de NF-KB al núcleo, lo cual impide la transcripción del gen NLRP3 y, en consecuencia, el ensamblaje del inflamasoma; así como la expresión de IL-1 $\beta$ . Pese a que los resultados obtenidos no fueron significativos, se observó que el tratamiento con el inhibidor disminuyó considerablemente la concentración de IL-1 $\beta$  inducida por TNF- $\alpha$  en presencia de un daño mitocondrial, en las células mesoteliales procedente del efluente peritoneal de pacientes en DP. Ya que la tendencia es clara, sería

interesante incrementar el tamaño muestral con el objetivo de alcanzar significancia estadística. Así, estos resultados sugieren que el factor nuclear NF- $\kappa$ B está implicado en la activación del inflamasoma en la fisiopatología de la membrana peritoneal durante el tratamiento con DP. Estudios similares han demostrado que el tratamiento con BAY disminuye significativamente la expresión de otros mediadores durante la DP, cuya síntesis también depende de la activación transcripcional de NF- $\kappa$ B (72). Además, estos resultados también se confirman en otros tipos celulares como es el caso de los condrocitos, en los que la inhibición de este factor provocó una reducción de los niveles de proteínas implicadas en el proceso inflamatorio inducido por la disfunción mitocondrial (73).

El factor de transcripción NF- $\kappa$ B también está implicado en procesos de adhesión celular, diferenciación, proliferación, autofagia, senescencia y apoptosis (32). En el contexto de la DP se ha observado que los GDPs generados como consecuencia de la esterilización del LD pueden inducir la apoptosis en las células mesoteliales peritoneales, facilitando que se produzca la TEM (74).

### **5.5 Efecto del resveratrol sobre la activación del inflamasoma en células mesoteliales humanas**

A lo largo de este trabajo se ha reiterado la existencia de una relación entre la disfunción mitocondrial y la respuesta inflamatoria con la activación del inflamasoma. En el contexto de la DP, la disfunción mitocondrial provocada por el aumento de ROS en respuesta a la glucotoxicidad del LD se encuentra estrechamente relacionada con la inflamación que se observa en el peritoneo de pacientes tratados con DP (23). Como ya se ha mencionado, la cronificación de esta situación conduce a cambios estructurales y funcionales en la membrana peritoneal que provocan la pérdida de la arquitectura del tejido dando lugar al fallo de ultrafiltración (42, 43). Por ello, es de vital importancia la búsqueda de estrategias terapéuticas con propiedades antioxidantes y antiinflamatorias que mitiguen el efecto que el LD ejerce sobre el peritoneo.

En base a estas premisas, quisimos testar si el resveratrol, un polifenol con propiedades antioxidantes y antiinflamatorias, tenía la capacidad para contrarrestar el efecto de la inflamación en presencia de disfunción mitocondrial sobre la expresión de caspasa-1 e IL-1 $\beta$  en células mesoteliales humanas. Los resultados obtenidos mostraron un descenso de la expresión de caspasa-1 y de la concentración de IL-1 $\beta$  en las muestras pretratadas con RSV, lo que sugiere que podría modular con carácter preventivo la activación del inflamasoma y por tanto, la respuesta inflamatoria provocada por la activación de caspasa-1. Esta reducción podría

ser debida a las propiedades antioxidantes y antiinflamatorias que se le atribuyen al resveratrol. Por ejemplo, en el contexto de la patología renal se ha demostrado que el tratamiento con RSV restaura la actividad de Nrf2, uno de los factores de transcripción más importante en la expresión de genes antioxidantes (75). Por otra parte, los resultados observados concuerdan con los obtenidos en otros tipos celulares relacionados con patologías articulares como los condrocitos o los sinoviocitos en los que se ha demostrado la capacidad del RSV para disminuir la respuesta inflamatoria inducida por citoquinas (59, 60). Asimismo, en concordancia con los resultados obtenidos en este bloque, se ha observado que este compuesto previene el agravamiento de la respuesta inflamatoria por disfunción mitocondrial en las células mesoteliales procedentes del efluente peritoneal de pacientes en DP (61). En este sentido, el uso de otros compuestos naturales con propiedades antioxidantes podrían tener un efecto similar, como las vitaminas E y C o los carotenoides, que ya han demostrado un efecto beneficioso en pacientes tratados con DP (76). Entre otras moléculas prometedoras por su capacidad antioxidante se incluye a otro tipo de polifenoles como la curcumina, que ha presentado un efecto protector frente a la exposición al LD, evidenciado por el aumento de la expresión de marcadores epiteliales y el descenso de la expresión de marcadores mesenquimales en células mesoteliales (77).

Como conclusión, el RSV ha mostrado tener un efecto protector al prevenir la expresión de caspasa-1 e IL-1 $\beta$  inducida por la respuesta inflamatoria y disfunción mitocondrial en las células mesoteliales del efluente peritoneal, mostrando una vez más su poder antioxidante y antiinflamatorio. Por tanto, podría ser un potencial tratamiento para evitar el fallo de ultrafiltración durante el tratamiento con DP, puesto que tiene la capacidad de prevenir los eventos que lo preceden.

En resumen, en este trabajo se ha mostrado que existe una relación entre el daño mitocondrial y la activación del inflamasoma, evidenciado porque la disfunción mitocondrial induce por sí misma la expresión de caspasa-1 e incrementa sinérgicamente el nivel de IL-1 $\beta$  inducida por la citoquina proinflamatoria TNF- $\alpha$  en células mesoteliales procedentes del efluente peritoneal de pacientes en DP. Además, se ha visto que el receptor NLRP3, los ROS procedentes de la mitocondria y el factor nuclear NF- $\kappa$ B están implicados en este proceso. Por último, los resultados sugieren que el RSV podría prevenir la activación del inflamasoma puesto que disminuye la expresión proteica de caspasa-1 e IL-1 $\beta$  inducida por PQ y TNF- $\alpha$  en estas células.

## 6. Conclusiones

**1-La disfunción mitocondrial está implicada en la activación del inflamasoma.** El daño mitocondrial induce un incremento en la expresión de caspasa-1 y un aumento sinérgico de los niveles de IL-1 $\beta$  durante la respuesta inflamatoria en las células procedentes del efluente peritoneal de pacientes en DP. El receptor NLRP3, el factor nuclear NF- $\kappa$ B y los ROS mitocondriales están involucrados en este proceso

**2-El resveratrol ejerce un efecto protector sobre la activación del inflamasoma.** El resveratrol previene los efectos de la disfunción mitocondrial durante la respuesta inflamatoria, disminuyendo la expresión de caspasa-1 e IL-1 $\beta$  en las células mesoteliales humanas.

## Conclusiões

**1-A disfunción mitocondrial está implicada na activación do inflamasoma.** O dano mitocondrial induce un incremento na expresión de caspasa-1 e un aumento sinérxico dos nivéis de IL-1 $\beta$  durante a resposta inflamatoria nas células procedentes do efluente peritoneal de pacientes en DP. O receptor NLRP3, o factor nuclear NF- $\kappa$ B y os ROS mitocondriáis están involucrados neste proceso.

**2-O resveratrol exerce un efecto protector sobre a activación del inflamasoma.** O resveratrol prevén os efectos da disfunción mitocondrial durante a resposta inflamatoria, disminuindo a expresión de caspasa-1 e IL-1 $\beta$  nas células mesoteliais humanas.

## Conclusions

**1-Mitochondrial dysfunction is involved in inflammasome activation.** Mitochondrial damage induces an increase in caspase-1 expression and a synergistic increase in IL-1 $\beta$  levels during the inflammatory response in cells from the peritoneal effluent of PD patients. NLRP3 receptor, nuclear factor NF- $\kappa$ B and mitochondrial ROS are involved in this process.

**2-Resveratrol exerts a protective effect on inflammasome activation.** Resveratrol prevents the effects of mitochondrial dysfunction during the inflammatory response by decreasing the expression of caspase-1 and IL-1 $\beta$  in human mesothelial cells.

## Bibliografía

1. World Health Organization (WHO). Informe Mundial sobre el envejecimiento y la salud. World Health Organization. 2016;3-267.
2. United Nations, Department of Economic and Social Affairs. World Population Prospects 2019: Highlights. United Nations. 2019;1-39.
3. Pérez J, Abellán A, Aceituno A, Ramiro D. Un perfil de las personas mayores en España 2020. Indicadores estadísticos básicos. Envejecimiento en red. 2020;25:1-39.
4. Ramos P, Pinto J A. Las personas mayores y su salud: situación actual. Avances en odontoestomatología. 2015;31(3):107-116.
5. Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad. Estrategia para el Abordaje de la Cronicidad en el Sistema Nacional de Salud. 2012
6. Levey AS, Atkins R, Coresh J, *et al.* Chronic kidney disease as a global public health problem: approaches and initiatives - a position statement from Kidney Disease Improving Global Outcomes. *Kidney Int.* 2007;72(3):247-259.
7. Gorostidi M, Sánchez-Martínez M, Ruilope LM, *et al.* Chronic kidney disease in Spain: Prevalence and impact of accumulation of cardiovascular risk factors. *Nefrología.* 2018;38(6):606-15.
8. Webster AC, Nagler EV, Morton RL, Masson P. Chronic Kidney Disease. *Lancet.* 2017;389(10075):1238-52.
9. Sellarés VL. Principios físicos: definiciones y conceptos. *Nefrología.* 2012;6(1):355-67.
10. Otero A, de Francisco A, Gayoso P, García F. Prevalence of chronic renal disease in Spain: Results of the EPIRCE study. *Nefrología* 2010;30:78-86.
11. Sociedad Española de Nefrología. La enfermedad renal crónica en España. 2022.
12. Delmonico FL, McBride MA. Analysis of the wait list and deaths among candidates waiting for a kidney transplant. *Transplantation.* 2008;86(12):1678-83.
13. Arenas MD, Collado S, Fernández M. Pautas de derivación a la Unidad de Enfermedad Renal Crónica Avanzada (ERCA). *Nefrología al día.* 2021.
14. Chan CT, Blankestijn PJ, Dember LM *et al.* Iniciación a la diálisis. Elección de modalidad, acceso y prescripción. *Nefrología al día.* 2019.
15. Arrieta J. Evaluación económica del tratamiento sustitutivo renal (hemodiálisis, diálisis peritoneal y trasplante) en España. *Nefrología.* 2010;1:37-47.

16. Arrieta J, Rodríguez-Carmona A, Remón C, *et al.* La diálisis peritoneal es la mejor alternativa coste-efectiva para la sostenibilidad del tratamiento con diálisis. *Nefrología*. 2011;1(5):505-513.
17. Mehrotra R, Devuyst O, Davies SJ, Johnson DW. The Current State of Peritoneal Dialysis. *J Am Soc Nephrol*. 2016;27(11):3238-52.
18. Pérez M, Rodríguez-Carmona A. Resultados generales de la diálisis peritoneal. *Nefrología al día*. 2019.
19. Fernández-Reyes MJ, Del Peso G, Bajo MA. La membrana peritoneal: fisiología, métodos de evaluación, cambios funcionales y estructurales relacionados con la diálisis peritoneal. *Nefrología al día*. 2019.
20. Macía M, Coronel F. Diálisis peritoneal: definición, membrana, transporte peritoneal, catéteres, conexiones y soluciones de diálisis. *Nefrología al día*. 2019;32:571-9.
21. Vadakedath S, Kandi V. Dialysis: a review of the mechanisms underlying complications in the management of chronic renal failure. *Cureus*. 2017;9(8):1-8.
22. Castillo E, Martín C, Ortiz A. Soluciones de Diálisis Peritoneal. *Nefrología al día*. 2018.
23. Bartosova M, Schmitt CP. Biocompatible peritoneal dialysis: The target is still way off. *Front Physiol*. 2019;9(1853):1-13.
24. Hung KY, Liu SY, Yang TC, *et al.* High-dialysate-glucose-induced oxidative stress and mitochondrial-mediated apoptosis in human peritoneal mesothelial cells. *Oxid Med Cell Longev*. 2014;2014:642793.
25. Ishibashi Y, Sugimoto T, Ichikawa Y, *et al.* Glucose dialysate induces mitochondrial DNA damage in peritoneal mesothelial cells. *Perit Dial Int*. 2002;22(1):11-21.
26. Handy DE, Loscalzo J. Redox regulation of mitochondrial function. *Antioxid Redox Signal*. 2012;16(11):1323-67.
27. Wei YH, Wu SB, Ma YS, Lee HC. Respiratory function decline and DNA mutation in mitochondria, oxidative stress and altered gene expression during aging. *Chang Gung Med J*. 2009;32(2):113-32.
28. Welten AG, Schalkwijk CG, ter Wee PM, *et al.* Single exposure of mesothelial cells to glucose degradation products (GDPs) yields early advanced glycation end-products (AGEs) and a proinflammatory response. *Perit Dial Int*. 2003;23(3):213-21.
29. Kuo HT, Chen HW, Hsiao HH, Chen HC. Heat shock response protects human peritoneal mesothelial cells from dialysate-induced oxidative stress and mitochondrial injury. *Nephrol Dial Transplant*. 2019;24(6):1799-1809.

30. López-Armada MJ, Riveiro-Naveira RR, Vaamonde-García C, Valcárcel-Ares MN. Mitochondrial dysfunction and the inflammatory response. *Mitochondrion*. 2013;13(2):106-18.
31. Aroeira LS, Aguilera A, Sánchez-Tomero 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):2004-13.
32. Liu Q, Zhang D, Hu D, *et al.* The role of mitochondria in NLRP3 inflammasome activation. *Mol Immunol*. 2018;103:115-24.
33. Montaña LF, Fortoul TI, Rendón EP. ¿Qué son los inflamosomas? El NLRP3 como por ejemplo. *Fac Med UNAM*. 2017;60(1):42-49.
34. Park J, Min JS, Kim B, *et al.* Mitochondrial ROS govern the LPS-induced pro-inflammatory response in microglia cells by regulating MAPK and NF- $\kappa$ B pathways. *Neurosci Lett*. 2015;584:191-6.
35. Calzado MA, Bacher S, Schmitz ML. NF-kappaB inhibitors for the treatment of inflammatory diseases and cancer. *Curr Med Chem*. 2007;14(3):367-76.
36. Jana A, Krett NL, Guzman G, *et al.* NFkB is essential for activin-induced colorectal cancer migration via upregulation of PI3K-MDM2 pathway. *Oncotarget*. 2017;8(23):37377-93.
37. 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.
38. Yáñez M, Lara-Pezzi E, Selgas R, *et al.* Peritoneal Dialysis and Epithelial-to-Mesenchymal Transition of Mesothelial Cells. *N Engl J Med*. 2003;348:403-13.
39. Hay ED. An overview of epithelio-mesenchymal transformation. *Acta Anat (Basel)*. 1995;154(1):8-20.
40. Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest*. 2009;119(6):1420-8.
41. Gheldof A, Berx G. Cadherins and epithelial-to-mesenchymal transition. *Prog Mol Biol Transl Sci*. 2013;116:317-36.
42. Liu Y, Dong Z, Liu H, *et al.* Transition of mesothelial cell to fibroblast in peritoneal dialysis: EMT, stem cell or bystander? *Perit Dial Int*. 2015;35(1), 14-25.
43. Kim YC, Kim KH, Lee S, *et al.* ST2 blockade mitigates peritoneal fibrosis induced by TGF- $\beta$  and high glucose. *J Cell Mol Med*. 2019; 23(10):6872-6884

44. Boulanger E, Daroux M. Peritoneal aging during PD: implication of RAGE, the receptor for AGEs. *Nefrologia*. 2008;28 Suppl 6:5-10.
45. Hasan M, Bae H. An Overview of Stress-Induced Resveratrol Synthesis in Grapes: Perspectives for Resveratrol-Enriched Grape Products. *Molecules*. 2017;14;22(2):294.
46. de Vries K, Strydom M, Steenkamp V. Bioavailability of resveratrol: Possibilities for enhancement. *J Herb Med*. 2018;11:71-77.
47. Novelle MG, Wahl D, Diéguez C, *et al*. Resveratrol supplementation: Where are we now and where should we go? *Ageing Res Rev*. 2015;21:1-15.
48. Kuršvietienė L, Stanevičienė I, Mongirdienė A, Bernatoniene J. Multiplicity of effects and health benefits of resveratrol. *Medicina (Kaunas)*. 2016;52(3):148-55.
49. Stervbo U, Vang O, Bonnesen C. A review of the content of the putative chemopreventive phytoalexin resveratrol in red wine. *Food Chem*. 2007;101(2):449-57.
50. Han Y, Chu X, Cui L, *et al*. Neuronal mitochondria-targeted therapy for Alzheimer's disease by systemic delivery of resveratrol using dual-modified novel biomimetic nanosystems. *Drug Delivery*. 2020;27(1):502-518.
51. Pannu N, Bhatnagar A. Resveratrol: from enhanced biosynthesis and bioavailability to multitargeting chronic diseases. *Biomed Pharmacother*. 2019;109:2237-51.
52. Kulkarni SS, Cantó C. The molecular targets of resveratrol. *Biochim Biophys Acta*. 2015;1852(6):1114-23.
53. Chang YP, Ka SM, Hsu WH, *et al*. Resveratrol inhibits NLRP3 inflammasome activation by preserving mitochondrial integrity and augmenting autophagy. *J Cell Physiol*. 2015;230(7):1567-79.
54. Zhang YQ, Liu YJ, Mao YF, *et al*. Resveratrol ameliorates lipopolysaccharide-induced epithelial mesenchymal transition and pulmonary fibrosis through suppression of oxidative stress and transforming growth factor- $\beta$ 1 signaling. *Clin Nutr*. 2015;34(4):752-60.
55. Bhatti JS, Bhatti GK, Reddy PH. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in metabolic disorders-A step towards mitochondria based therapeutic strategies. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*. 2017;1863(5):1066-77.
56. Wei PZ, Szeto CC. Mitochondrial dysfunction in diabetic kidney disease. *Clin Chim Acta*. 2019;496:108-16.
57. Liakopoulos V, Roumeliotis S, Gorny X, *et al*. Oxidative Stress in Patients Undergoing Peritoneal Dialysis: A Current Review of the Literature. *Oxid Med Cell Longev*. 2017;2017:3494867.



58. Ramil-Gómez O, Rodríguez-Carmona A, Fernández-Rodríguez JA, *et al.* Mitochondrial Dysfunction Plays a Relevant Role in Pathophysiology of Peritoneal Membrane Damage Induced by Peritoneal Dialysis. *Antioxidants*. 2021;10(3):447.
59. Vaamonde-García C, Riveiro-Naveira RR, Valcárcel-Ares MN, *et al.* Mitochondrial dysfunction increases inflammatory responsiveness to cytokines in normal human chondrocytes. *Arthritis Rheum*. 2012;64(9):2927-36.
60. Valcárcel-Ares MN, Riveiro-Naveira RR, Vaamonde-García C, *et al.* Mitochondrial dysfunction promotes and aggravates the inflammatory response in normal human synoviocytes. *Rheumatology (Oxford)*. 2014;53(7):1332-43.
61. Ramil-Gómez O, Lopez-Pardo M, Rodríguez-Carmona A, *et al.* Involvement of Mitochondrial Dysfunction in the Inflammatory Response in Human Mesothelial Cells from Peritoneal Dialysis Effluent. *Nephrol Dial Transplant*. 2022;37(3).
62. Skulachev VP. Mitochondrial physiology and pathology; concepts of programmed death of organelles, cells and organisms. *Mol Aspects Med*. 1999;20(3):139-84.
63. Xie X, Wang J, Xiang S, *et al.* Dialysate cell-free mitochondrial DNA fragments as a marker of intraperitoneal inflammation and peritoneal solute transport rate in peritoneal dialysis. *BMC Nephrol*. 2019;20(1):128.
64. Szeto CC, Lai KB, Chow KM, *et al.* Plasma Mitochondrial DNA Level is a Prognostic Marker in Peritoneal Dialysis Patients. *Kidney Blood Press Res*. 2016;41(4):402-12.
65. Guo C, Fu R, Wang S, *et al.* NLRP3 inflammasome activation contributes to the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Clin Exp Immunol*. 2018;194:231-43.
66. Zheng F, Xing S, Gong Z, *et al.* Silence of NLRP3 suppresses atherosclerosis and stabilizes plaques in apolipoprotein E-deficient mice. *Mediators Inflamm*. 2014;(1):07208-8.
67. Wang L, Chen Y, Li X, *et al.* Enhancement of endothelial permeability by free fatty acid through lysosomal cathepsin B-mediated Nlrp3 inflammasome activation. *Oncotarget*. 2016;7(45):73229-73241.
68. Hautem N, Morelle J, Sow A, *et al.* The NLRP3 Inflammasome Has a Critical Role in Peritoneal Dialysis-Related Peritonitis. *J Am Soc Nephrol*. 2017;28(7):2038-2052.
69. Pisoschi AM, Pop A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *Eur J Med Chem*. 2015;97:55-74.
70. Li XY, Wu J, Luo D, *et al.* [Effect of high glucose-based peritoneal dialysis fluids on NLRP3-IL-1 $\beta$  in human peritoneal mesothelial cells]. *Beijing Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*. 2017;49(6):954-60.

71. Arulkumaran N, Pollen SJ, Tidswell R, *et al.* Selective mitochondrial antioxidant MitoTEMPO reduces renal dysfunction and systemic inflammation in experimental sepsis in rats. *Br J Anaesth.*2021;127(4):577-586.
72. Zhou Y, Li X, Yuan X, Hao L. Role of allograft inflammatory factor-1 in the regulation of inflammation and oxidative stress in primary peritoneal mesothelial cells. *Cell Biol Int.* 2019;43(5):495-505.
73. Cillero-Pastor B, Caramés B, Lires-Deán M, *et al.* Mitochondrial dysfunction activates cyclooxygenase 2 expression in cultured normal human chondrocytes. *Arthritis Rheum.* 2008;58(8):2409-19.
74. Kim YL, Cho JH, Choi JY, *et al.* Systemic and local impact of glucose and glucose degradation products in peritoneal dialysis solution. *J Ren Nutr.* 2013;23(3):218-22.
75. Javkhedkar AA, Quiroz Y, Rodriguez-Iturbe B, *et al.* Resveratrol restored Nrf2 function, reduced renal inflammation, and mitigated hypertension in spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2015;308(10):R840-6.
76. Boudouris G, Verginadis II, Simos YV, *et al.* Oxidative stress in patients treated with continuous ambulatory peritoneal dialysis (CAPD) and the significant role of vitamin C and E supplementation. *Int Urol Nephrol.* 2013;45(4):1137-44.
77. Zhao JL, Guo MZ, Zhu JJ, *et al.* Curcumin suppresses epithelial-to-mesenchymal transition of peritoneal mesothelial cells (HMrSV5) through regulation of transforming growth factor-activated kinase 1 (TAK1). *Cell Mol Biol Lett.* 2019;24:32.