



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

# MÁSTER UNIVERSITARIO EN BIOLOXÍA MOLECULAR, CELULAR E XENÉTICA

## Memoria do Traballo de Fin de Máster

**ESTUDIO IN VITRO DA RELACIÓN ENTRE DISFUNCIÓN MITOCONDRIAL E  
RESPOSTA INFLAMATORIA EN CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGRE  
PERIFÉRICA**

**ESTUDIO IN VITRO DE LA RELACIÓN ENTRE DISFUNCIÓN MITOCONDRIAL Y  
RESPUESTA INFLAMATORIA EN CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGRE  
PERIFÉRICA**

**IN VITRO STUDY OF THE RELATIONSHIP BETWEEN MITOCHONDRIAL  
DYSFUNCTION AND INFLAMMATORY RESPONSE IN PERIPHERAL BLOOD  
MONONUCLEAR CELLS**

**Gonzalo Rodríguez Varela**

Xullo de 2022

*Director(es) Académico(s): María José López Armada*

*Codirector: Jennifer Adriana Fernández Rodríguez*

# TRABALLO DE FIN DE MÁSTER EN BIOLOXÍA MOLECULAR, CELULAR E XENÉTICA

## ESTUDIO IN VITRO DA RELACIÓN ENTRE DISFUNCIÓN MITOCONDRIAL E RESPOSTA INFLAMATORIA EN CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGUE PERIFÉRICA

**LOPEZ  
ARMADA  
MARIA JOSE**  
- 08029604M

Firmado digitalmente por  
LOPEZ ARMADA  
MARIA JOSE -  
08029604M  
Fecha: 2022.07.15  
17:44:25 +02'00'

### Directora 1

Dra. María José López Armada

**FERNANDEZ  
RODRIGUEZ  
JENNIFER  
ADRIANA -  
47371373K**

Firmado digitalmente por  
FERNANDEZ  
RODRIGUEZ  
JENNIFER ADRIANA  
- 47371373K  
Fecha: 2022.07.15  
17:54:04 +02'00'

### Directora 2

Dra. Jennifer Adriana Fernández Rodríguez

Firmado por RODRIGUEZ  
VARELA, GONZALO (FIRMA)  
el día 15/07/2022 con un  
certificado emitido por  
AC DNIE 006

### Autor

Gonzalo Rodríguez Varela

## **RESUMO**

A artrite reumatoide (AR) é unha doenza inflamatoria e crónica de carácter autoinmune que afecta aproximadamente ao 1% da poboación mundial e que ten como principal órgano diana as articulacións sinoviais. Entre as súas consecuencias máis directas, a AR pode dar lugar á perda de función articular, discapacidade, redución da calidade de vida e aumento da mortalidade, sumado a unha importante carga social. Nos últimos anos, numerosas investigacións evidenciaron o papel fundamental da mitocondria nas enfermidades autoinmunes, aínda que segue sen coñecerse con claridade a relación entre a disfunción mitocondrial e a resposta inmune/inflamatoria no seo da artrite reumatoide (AR). En relación, estudos previos realizados polo grupo de Envellecemento e Inflamación en sinoviocitos humanos, mostraron que a disfunción mitocondrial participa na activación da resposta inflamatoria característica da patoloxía artrítica; así mesmo, tamén se observou como o resveratrol, un composto natural con propiedades antiinflamatorias e antioxidantes, foi capaz de reducir a severidade da AR nun modelo animal experimental de artrite inducida por antígeno (AIA). Seguindo esta liña, a finalidade deste Traballo de Fin de Máster é investigar a relación entre a disfunción mitocondrial e a activación da resposta inflamatoria en dous tipos celulares implicados na AR, prestando especial atención ao posible efecto antiinflamatorio dunha dieta antioxidante con resveratrol.

## **RESUMEN**

La artritis reumatoide (AR) es una dolencia inflamatoria y crónica de carácter autoinmune que afecta aproximadamente al 1% de la población mundial y que tiene como principal órgano diana las articulaciones sinoviales. Entre las consecuencias más directas, la AR puede dar lugar a la pérdida de función articular, discapacidad, reducción de la calidad de vida y aumento de la mortalidad, sumado a una importante carga social. En los últimos años, numerosas investigaciones evidenciaron el papel fundamental de la mitocondria en la enfermedades autoinmunes, pero aún no se conoce con claridad cual es la relación entre la disfunción mitocondrial y la respuesta inmune/inflamatoria en el seno de la AR. En relación, estudios previos realizados por el grupo de Envejecimiento e Inflamación en sinoviocitos humanos, mostraron que la disfunción mitocondrial participa en la activación de la respuesta inflamatoria característica de la patología artrítica; así mismo, también se observó como la función del resveratrol, un compuesto natural con propiedades antiinflamatorias y antioxidantes, fue capaz de reducir la severidad de la AR en un modelo animal experimental de artritis inducida por

antígeno (AIA). Siguiendo esta línea, la finalidad de este Trabajo de Fin de Máster es investigar la relación entre la disfunción mitocondrial y la activación de la respuesta inflamatoria en dos tipos celulares implicados en AR, presentando especial atención al posible efecto anti-inflamatorio de una dieta antioxidante con resveratrol.

## **ABSTRACT**

Rheumatoid arthritis (AR) is a chronic inflammatory autoimmune disease that affects approximately 1% of the world's population, with the synovial joints as the main target organ. Among the most direct consequences, RA can lead to loss of joint function, disability, reduced quality of life and increased mortality, as well as a significant social burden. In recent years, much research has highlighted the central role of mitochondria in autoimmune diseases, but the relationship between mitochondrial dysfunction and the immune/inflammatory response in RA remains unclear. In this regard, previous studies carried out by the Ageing and Inflammation group in human synoviocytes showed that mitochondrial dysfunction is involved in the activation of the inflammatory response characteristic of arthritic pathology; likewise, it was also observed that the function of resveratrol, a natural compound with antiinflammatory and antioxidant properties, was able to reduce the severity of RA in an experimental animal model of antigen-induced arthritis (AIA). Following this line, the aim of this Master's thesis is to investigate the relationship between mitochondrial dysfunction and the activation of the inflammatory response in two cell types involved in RA, paying special attention to the possible anti-inflammatory effect of an antioxidant diet with resveratrol.

# ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS.....	I
ÍNDICE DE TÁBOAS.....	II
ÍNDICE DE ABREVIATURAS.....	III
<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Artrite reumatoide. ....</b>	<b>1</b>
<b>1.1.1. Células mononucleares de sangue periférica e AR.....</b>	<b>2</b>
<b>1.1.2. Sinoviocitos e AR. ....</b>	<b>4</b>
<b>1.1.3. Inflamasoma NLRP3 e mediadores inflamatorios. ....</b>	<b>5</b>
<b>1.1.4. Mitocondria e estrés oxidativo. ....</b>	<b>5</b>
<b>1.1.5. Novas estratexias de tratamento fronte a AR. ....</b>	<b>6</b>
<b>2. OBXECTIVOS. ....</b>	<b>8</b>
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>8</b>
<b>3.1. Liña celular THP-1: cultivo e mantemento.....</b>	<b>8</b>
<b>3.1.1. Diferenciación de monocitos a macrófagos.....</b>	<b>9</b>
<b>3.1.2. Estimulación celular. ....</b>	<b>9</b>
<b>3.1.3. Análise da concentración da IL-1<math>\beta</math>.....</b>	<b>10</b>
<b>3.2. Illamento e cultivo de sinoviocitos humanos. ....</b>	<b>10</b>
<b>3.2.1. Estimulación celular. ....</b>	<b>11</b>
<b>3.2.2. Análise da expresión xénica.....</b>	<b>11</b>
<b>3.2.2.1. Extracción e cuantificación de ARNm. ....</b>	<b>12</b>
<b>3.2.2.2. Retrotranscripción do ARN.....</b>	<b>12</b>
<b>3.2.2.3. PCR a tempo real.....</b>	<b>13</b>
<b>3.3. Análises de datos.....</b>	<b>15</b>
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>15</b>
<b>4.1. Avaliación da produción de IL-1<math>\beta</math> na liña celular THP-1.....</b>	<b>15</b>
<b>4.1.1. A inhibición do complexo inflamasoma limitou a resposta inflamatoria .....</b>	<b>15</b>
<b>4.1.2. Efecto do antioxidante mitocondrial MitoTEMPO sobre a produción de IL-1<math>\beta</math>..</b>	<b>16</b>
<b>4.1.3. Efecto do resveratrol sobre os niveis da citoquina pro-inflamatoria IL-1<math>\beta</math>.....</b>	<b>16</b>
<b>4.2. Estudio da activación do inflamasoma mediada pola disfunción mitocondrial nun contexto inflamatorio en sinoviocitos e o efecto do resveratrol.....</b>	<b>17</b>
<b>4.2.1. Efecto da disfunción mitocondrial sobre a expresión xénica de pro-IL-1<math>\beta</math> en sinoviocitos humanos.....</b>	<b>18</b>
<b>4.2.2. Efecto da disfunción mitocondrial sobre a expresión xénica de pro-caspasa-1 en sinoviocitos humanos.....</b>	<b>18</b>
<b>4.2.3. Efecto da disfunción mitocondrial sobre a expresión xénica de NLRP3 en sinoviocitos humanos.....</b>	<b>19</b>

4.2.4. O resveratrol actúa modulando a expresión xénica de pro-IL-1 $\beta$ , pro-caspasa-1 e NLRP3 nun contexto de dano mitocondrial.....	20
5. DISCUSIÓN.....	21
6. CONCLUSIÓNS.....	25
7. BIBLIOGRAFÍA.....	26

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>FIGURA 1.</b> Inicio e desenvolvemento da patoloxía artrítica. ....	5
<b>FIGURA 2.</b> Efecto da disfunción mitocondrial sobre a expresión de IL-1 $\beta$ . ....	17
<b>FIGURA 3.</b> Efecto da disfunción mitocondrial e a resposta inflamatoria sobre a expresión xénica de pro-IL-1 $\beta$ en sinoviocitos. ....	19
<b>FIGURA 4.</b> Efecto da disfunción mitocondrial e a resposta inflamatoria sobre a expresión xénica de pro-caspasa-1 en sinoviocitos ....	20
<b>FIGURA 5.</b> Efecto da disfunción mitocondrial e a resposta inflamatoria sobre a expresión xénica de NLRP3 en sinoviocitos. ....	21

## **ÍNDICE DE TÁBOAS**

<b>TÁBOA 1.</b> Estímulos e concentracións empregadas nos experimentos in vitro. ....	10
<b>TÁBOA 2.</b> Estímulos e Concentración empregados nos experimentos in vitro con sinoviocitos.....	12
<b>TÁBOA 3.</b> Mestura da reacción de PCR a tempo real. ....	13
<b>TÁBOA 4.</b> Protocolo de amplificación empregado na PCR a tempo real.....	14
<b>TÁBOA 5.</b> Listaxe de sonda e cebadores empregados na obtención dos produtos de interese.....	15

## ÍNDICE DE ABREVIATURAS

**ADNmt:** ADN mitocondrial

**AIA:** Artrite inducida por antígeno

**AP-1:** Proteína activadora 1

**AR:** Artrite reumatoide

**ASC:** do inglés, *Apoptosis-associated Speck-like Protein Containing a Caspase Activation Recruitment Domain*

**ATP:** adenosin trifosfato

**DAMP:** do inglés, *Damaged Associated Molecular Pattern*

**EEM:** Erro estándar da media

**FLS:** do inglés, *Fibroblast Like Synovocyte*

**IL:** Interleucina

**LPS:** Lipopolisacárido

**NF- $\kappa$ B:** do inglés, *Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*

**NK:** do inglés, *Natural Killers*

**NLRP3:** do inglés, *NLR Family Pyrin Domain Containing 3*

**OA:** Osteoartrites

**PBMC:** do inglés, *Peripheral Blood Mononuclear Cells*

**PCR:** reacción en cadea da polimerasa (do inglés, *Polymerase Chain Reaction*)

**PMA:** Phorbol 12-myristate-13-acetate

**PQ:** Paraquat

**ROS:** Especies Reactivas de Osíxeno ( do inglés, *Reactive Oxygen Species*)

**RPMI:** do inglés: *Roswell Park Memorial Institute*

**RSV:** Resveratrol

**SBF:** Soro Bovino Fetal

**TLR2:** do inglés, *Toll Like Receptor 2*

**TNF- $\alpha$ :** Factor de necroses tumoral  $\alpha$  (do inglés, *Tumor Necrosis Factor  $\alpha$* )

**UPL:** do inglés, *Universal Probe Library*

**$\mu$ g:** Microgramos

**$\mu$ l:** Microlitros

**$\mu$ M:** Micromolar

**$^{\circ}$ C:** Graos centígrados

## **1. INTRODUCCIÓN.**

Un dos maiores problemas aos que se enfronta a sociedade moderna, é o envellecemento da poboación. Como consecuencia dun réxime de baixa natalidade e mortalidade. Isto supón un incremento dos sectores de poboación en idades máis avanzadas, considerándose maiores aquelas persoas que teñen 65 anos ou máis. Este aumento da esperanza de vida ven acompañado dun aumento da incidencia das enfermidades crónicas e reumáticas, entre elas a AR (1).

### **1.1. Artrite reumatoide.**

A AR é unha enfermidade inflamatoria, crónica e autoinmune de gran importancia que afecta ao 1% da poboación mundial. En esencia, a AR caracterízase pola incapacidade do sistema inmune do paciente para distinguir as moléculas do organismo fronte as moléculas estrañas. Deste xeito o sistema inmune convértese no agresor, desencadeando a reacción inflamatoria e producindo autoanticorpos que atacan a articulación do propio organismo. En consecuencia, desencadéase á inflamación crónica das articulacións móbiles (coñecidas como articulacións sinoviais ou diartrodiales), sendo a membrana sinovial a primeira estrutura afectada. Así, histoloxicamente, a membrana sinovial pasa dunha estrutura principalmente acelular e inactiva a un tecido invasivo nos que se reúnen procesos de neovascularización, hiperplasia celular. indución da síntese e segregación dunha ampla variedade de moléculas inflamatorias, cambios na expresión de moléculas de adhesión e atracción de células inflamatorias. Este conxunto de procesos induce a inflamación do tecido sinovial característico do proceso artrítico. Desta forma, a estrutura articular normal vese progresivamente comprometida pola inflamación, o cal, unido a fallos nos sistemas de regulación homeostáticos da inflamación, levan á destrución da cartilaxe, a erosión do óso e á perda da función articular (2).

Así mesmo, eventualmente, e dado a súa natureza sistémica, esta doenza pode ocasionar complicacións noutros órganos (desordes cardiovasculares, pulmonares e esqueléticos) predispoñendo ao individuo a unha morte prematura (3,4).

Actualmente, as causas que subxacen á aparición da patoloxía artrítica seguen sendo descoñecidas. Sen embargo, a natureza autoinmune da doenza apunta a unha interacción entre factores xenéticos e ambientais. Así, podemos observar exemplos destes factores serían as mutacións relacionadas co complexo maior de histocompatibilidade, as hormonas ou o tipo de dieta e nivel de actividade física do paciente; desta forma, a combinación destes factores condicionaría a aparición e desenvolvemento da reacción inmunolóxica e inflamatoria dentro da articulación (3,5,6).

### 1.1.1. Células mononucleares de sangue periférica e AR.

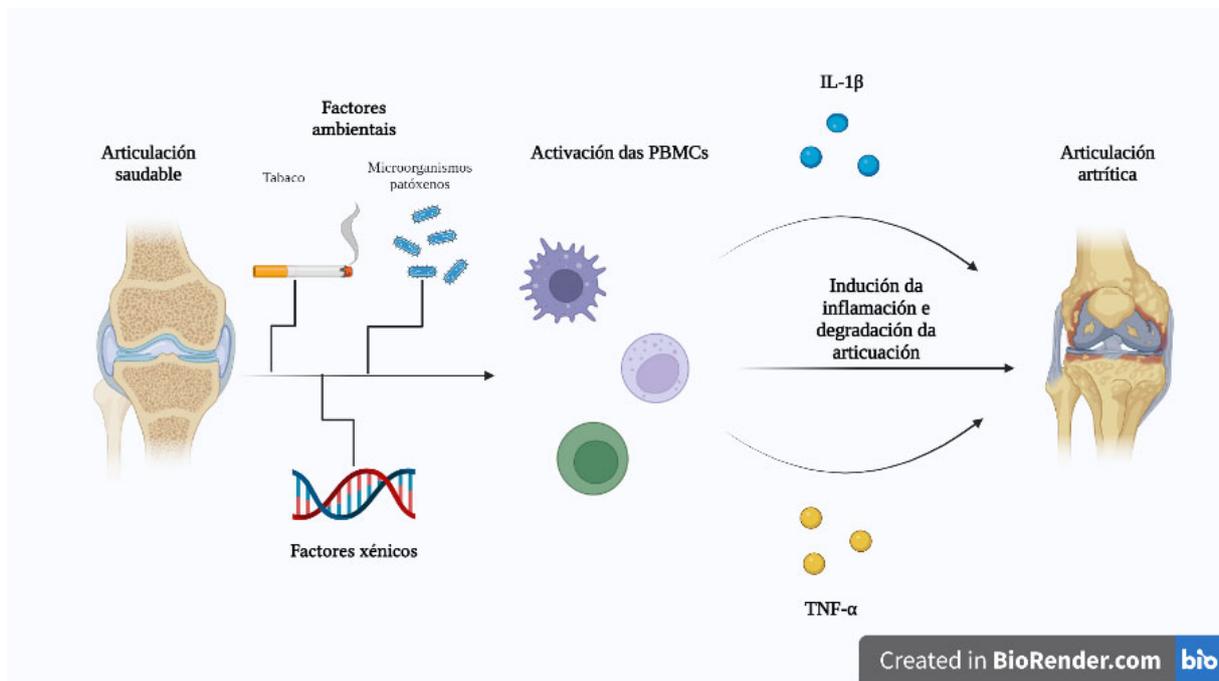
As PBMCs (do inglés, *Peripheral Blood Mononuclear Cells*) abarcan a toda célula sanguínea que posúa un núcleo redondo entre as que encontramos monocitos, macrófagos e linfocitos como as células NK (do inglés, *Natural Killers*) ou as células T e B, sendo compoñentes centrais da resposta inmune no corpo humano. Este conxunto de células está relacionado coa resposta inflamatoria e os procesos de infiltración, debido a súa capacidade para regular a produción de citoquinas, o que as converte nunha peza central da indución da inflamación no tecido sinovial durante a patoloxía da AR. Adicionalmente, as PBMCs presentan unha gran relevancia no deseño de novos fármacos, xa que a maior exposición aos compostos químicos ten lugar na sangue periférica, sendo a diana perfecta para avaliar os efectos citotóxicos de diferentes fármacos (7,8). En este traballo centrámonos no estudo dos monocitos, células do sistema inmune, con gran importancia na resposta inmune innata e adquirida. A súa activación pode ser tanto pro-inflamatoria como antiinflamatoria, contribuíndo a destrución do tecido pero tamén a súa rexeneración. Esta dualidade na súa función ben determinada polo estado bioenerxético do monocito, o cal varía de acordo á situación da mitocondria na célula con respecto ao estrés oxidativo e a utilización da fosforilación oxidativa ou o ciclo do ácido tricarbóxico polos macrófagos (9,10). Así, dependendo das sinais recibidas, os macrófagos poden activar, dirixir ou finalizar a resposta inmune (11).

No contexto da AR, observouse a correlación dos macrófagos CD68 + sinoviais coa actividade metabólica, a disfunción mitocondrial e o estrés oxidativo *in vivo* (12); así como co grado de actividade clínica da enfermidade (13). Así mesmo, recentemente describiuse que os monocitos CD14+ da AR mostran unha disfunción metabólica e inflamatoria cunha firma indicativa dun fenotipo pro-inflamatorio tipo M1, que preceda as manifestacións clínicas da enfermidade (14); do mesmo xeito, a manipulación das vías metabólicas na AR, mediante o bloqueo glicolítico, reverteu a resposta pro-inflamatoria inducida polo TLR2 (do inglés, *Toll Like Receptor 2*) (15). Por último, un estudo recente mostra que o inflamasoma NLRP3 (do inglés, *NLR Family Pyrin Domain Containing 3*), un dos complexos necesarios para levar a cabo a resposta inflamatoria, está altamente activado na sinovia tanto de pacientes con AR como do modelo animal experimental, e que esta activación producíase principalmente nos monocitos/macrófagos infiltrantes, pero non nos sinoviocitos tipo fibroblasto (16). Desta forma, os monocitos/macrófagos presentan funcións claves para o desenvolvemento da resposta inflamatoria na AR e no desenvolvemento da erosión da articulación debido a súa diferenciación excesiva en osteoclastos. Ao activarse durante a AR, os monocitos conseguen

infiltrarse nos sitios inflamatorios, onde se diferencian a macrófagos. Así, a progresión na destrución da articulación, así como o dano sufrido polo paciente, dependen do grado de activación e da gravidade da infiltración. Ademais, os macrófagos poden ser activados pola interacción coas células T, tras a presentación dunha sinal específica de antígeno, o que conduce a un incremento das funcións inflamatorias, accesorias, efectoras e inhibitoras dos macrófagos (11,17–19). Outra ruta de activación consiste no contacto con fibroblastos, os cales poden causar a activación por contacto. Simultaneamente, estímulos solubles como as citocinas pro-inflamatorias, patóxenos ou hormonas poden dar lugar ao incremento na produción de factores pro-inflamatorios como IL-1 $\beta$  ou o Factor de Necrose Tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ; do inglés, *Tumor Necrosis Factor  $\alpha$* ) (17).

Os macrófagos activados incrementan a produción de citocinas pro-inflamatorias, o que os relaciona co progreso da resposta inflamatoria na AR como é o caso de TNF- $\alpha$ . Esta citocina aumenta a expresión de diversas citocinas e moléculas de adhesión, sendo maioritariamente producida na AR polos macrófagos da membrana sinovial (17). A perda de control da regulación do TNF- $\alpha$  é un potente indutor da sinovitis, sendo unha causa do desenvolvemento da AR. O efecto do TNF- $\alpha$  combínase coa acción de citocinas pro-inflamatorias adicionais producidas polos macrófagos, como IL-1 $\beta$ , a cal media a reabsorción do óso, induce a produción de metaloproteasas e colaxenasas e desencadea o dano articular mediante a degradación de proteoglicanos e a inhibición da súa sínteses (17).

A importancia dos macrófagos durante o desenvolvemento da AR e a súa relación co incremento do deterioro do óso e a articulación, defíneos como unha diana clave no estudo e tratamento da AR (17,19,20).



**Figura 1. Inicio e desenvolvemento da patoloxía artrítica.** A figura amosa, de forma esquemática, os distintos pasos implicados no desenvolvemento da degradación articular mediante a acción das diferentes vías inflamatorias mediadas por PBMCs, dende a activación da autoinmidade por factores xénicos/ambientais, ata a degradación da articulación debido ao incremento na produción das diversas citocinas pro-inflamatorias envoltas na mesma. Imaxe creada mediante BioRender.com

### 1.1.2. Sinoviocitos e AR.

Como xa se mencionou anteriormente, a membrana sinovial é o órgano diana da AR. Este tecido está composto por capas interdixitadas de sinoviocitos similares a fibroblastos (FLS, do inglés: *Fibroblast Like Synoviocytes*) e sinoviocitos similares a macrófagos (ou sinoviocitos clase A). A súa función está relacionada coa regulación da composición do líquido sinovial e a matriz extracelular da articulación para manter a integridade estrutural e dinámica da articulación. Na AR, as funcións dos FLS altéranse, adquirindo un fenotipo agresivo e aumentando a súa proliferación. Ademais, estas células adquiren a capacidade de unirse intimamente á cartilaxe da articulación e de invadir a matriz extracelular (21). A obtención deste fenotipo invasivo dos FLS, é estimulada polos factores pro-inflamatorios, como as interleucinas (IL)-1 ou as ROS (do inglés, *Reactive Oxygen Species*), o que reforza a relación entre o estrés oxidativo e a AR (21–24).

Desta forma, os FLS pasan a ser o compoñente principal do *pannus*, nome que recibe o tecido resultante da proliferación invasiva da sinovial. Este caracterízase por unha abundancia excesiva de FLS, resultado do desequilibrio entre o aumento da proliferación e a adquisición de mecanismos de resistencia á apoptosis dos FLS. O *pannus* mostra un carácter patolóxico, promovendo a inflamación e intervindo na destrución da cartilaxe e do oso, sendo unha

manifestación característica da patoloxía da AR. Os FLS do *pannus* secretan un maior número de citocinas (como IL-1 ou IL-6, a cal se reconece como unha diana para a terapia da AR) (23), quimioquinas e factores pro-anxióxénicos; así, compostos producidos polos FLS na AR, como IL-18 ou o factor estimulante de colonias de granulocitos e macrófagos, activan as células e mecanismos tanto da inmunidade innata como da adquirida (23,24).

A combinación de todos estes factores promove a inflamación da articulación ao activar os FLS e recrutar novas células ao *pannus* mediante os factores quimiotáticos (23).

### **1.1.3. Inflamasoma NLRP3 e mediadores inflamatorios.**

A IL-1 $\beta$  é unha das principais citocinas implicadas na resposta inflamatoria en enfermidades como a AR. O complexo proteico encargado de regular a activación e secreción desta citocina denomínase inflamasoma. Dentro das enfermidades relacionadas coa inflamación, e en concreto no contexto da AR, o inflamasoma máis coñecido é o inflamasoma NLRP3. Este está constituído por NLRP3, ASC (do inglés, *Apoptosis-associated Speck-like Protein Containing a Caspase Activation Recruitment Domain*) e caspasa-1 (16,25). O ensamblaxe do inflamasoma está regulado por dúas sinais. En primeiro lugar, o NF- $\kappa$ B (do inglés, *Nuclear Factor Kappa-Light-Chain-Enhancer of Activated B cells*) é activado pola estimulación causada polas ROS durante o incremento do estrés oxidativo (4,26,27) e translocado ao núcleo, este promove a transcripción de NLRP3, xunto coa caspasa-1 e as formas inactivas de IL-1 $\beta$  e IL-18. Un segundo estímulo, producido pola presenza de DAMPs (do inglés, *Damaged Associated Molecular Patterns*), activa a ensamblaxe do inflamasoma (27). Desta forma, unha vez que o inflamasoma NLRP3 se ensambla, este activa a caspasa-1 que cataliza o corte proteolítico de varios precursores proteicos, o que induce a segregación e maduración tanto da IL-1 $\beta$  como da IL-18 (25).

### **1.1.4. Mitocondria e estrés oxidativo.**

A mitocondria é un orgánulo multifuncional de dobre membrana presente na gran maioría de células animais e que conta cun xenoma propio, o ADN mitocondrial (ADNmt). Unha das súas principais funcións é a beta oxidación dos ácidos graxos, os cales son utilizados durante a fosforilación oxidativa. Así, a mitocondria xera un gradiente de protóns mediante o movemento de electróns a través da cadea transportadora de electróns. Isto permite que o complexo adenosin trifosfato (ATP) sintasa catalice a síntese de ATP para as demandas enerxéticas da célula (28), pero durante este proceso tamén se crean ROS debido a interacción entre o osíxeno e os electróns empregados na xeración do gradiente de protóns. As ROS, pese aos seus efectos

adversos sobre as células, demostraron estar involucradas nos procesos de regulación celular controlados pola mitocondria. Dentro destes destacan a regulación metabólica, o uso das ROS como resposta ao estrés e como ferramenta de adaptabilidade celular ao ambiente e a implicación destas moléculas nas rutas de sinalización celular que involucran á mitocondria (29,30). Así mesmo, a xeración de ROS atópase asociada a un escenario de estrés oxidativo, o cal se describe como o desequilibrio entre a produción oxidativa e a capacidade antioxidante da célula para manter o equilibrio. O aumento de ROS desencadea o deterioro da mitocondria, levando á desregulación das vías de sinalización. No contexto da AR, describiuse como esta perda de control se atopa relacionada con unha maior actividade da enfermidade, asociándose con numerosos parámetros clínicos (28,30).

Ademais, as ROS tamén poden danar o ADNmt, aumentando o número de mutacións no mesmo, o que o desestabiliza. O efecto das ROS tamén se estende ao dano producido pola oxidación de compoñentes mitocondriais como os lípidos de membrana e as proteínas, o que acarrea un aumento adicional do estrés oxidativo, o cal, nun bucle de retroalimentación positiva, aumenta o dano sufrido pola célula (28–30). No contexto da resposta inmune e a inflamación, as mitocondrias disfuncionais poden liberar DAMPs como ROS ou ADNmt que actúan como mensaxeiros activando rutas de sinalización celular relacionadas coa activación de inflamomas ou coa inmunidade innata. NLRP3 é un exemplo de inflamoma, o cal activa a proteína caspasa-1, que cataliza a maduración de citoquinas pro-inflamatorias como as interleucinas IL-1 $\beta$  e IL-18. Esta función de NLRP3 iníciase ante a presenza de estímulos tales como os DAMPs, lipopolisacáridos (LPS) de orixe bacteriano ou as ROS. Ao mesmo tempo, a produción de NLRP3 está ligada a activación da vía de sinalización de NF- $\kappa$ B, un factor de transcrición involucrado na regulación da expresión de varios xenes relacionados coas respostas inflamatoria e inmune. Este factor encontrase regulado a súa vez pola presenza de ROS e o estrés oxidativo. A disfunción mitocondrial tamén sensibiliza ás células ante o efecto das citoquinas, causando unha maior xeración de ROS e aumentando o efecto das rutas de sinalización redox (28,31).

#### **1.1.5. Novas estratexias de tratamento fronte a AR.**

Os tratamentos dispoñibles na actualidade para facer fronte a AR traen consigo inevitables efectos secundarios e aspectos negativos, como a súa reducida eficacia ou o seu elevado coste económico. Neste sentido dado o carácter crónico da AR, entre un 30-40% dos pacientes non responden aos tratamentos con axentes biolóxicos, ponse de manifesto a importancia das

propiedades antiinflamatorias e antioxidantes dos compostos naturais que podemos incorporar a través da dieta e que cada vez suscitan máis interese por parte da comunidade científica. Estes compostos presentan un gran potencial para o desenvolvemento de novos fármacos e tratamentos, a vez que poden complementar os xa existentes. Descoñécese os mecanismos exactos polos que se produce esta influencia da dieta, aínda que se barallan varias posibilidades, como a redución do estrés oxidativo, redución dos niveis de citoquinas pro-inflamatorias ou alteracións na microbiota intestinal. Así os antioxidantes presentes na dietas evitan o aumento de radicais libres e reducen o estrés oxidativo, o que a súa vez axuda a reducir o número de marcadores pro-inflamatorios.

Un exemplo destes compostos naturais, con especial relevancia na actualidade, é o resveratrol, o cal amosa propiedades anti-cancerixenas, antiinflamatorias, antioxidantes e anti-envelhecimento. Este composto polifenólico, descuberto por primeira vez por Takota en 1939 nas raíces do eléboro branco (*Veratrum grandiflorum*), pode atoparse en diversas plantas e múltiples produtos de orixe natural, como uvas e os seus derivados como o viño tinto, cacahuetes, e froita silvestre (4).

No contexto da inflamación, o tratamento con resveratrol sobre sinoviocitos humanos foi capaz de reducir os efectos da inflamación inducida pola disfunción mitocondrial ao reducir os niveis de ROS e o consecuente aumento de NF- $\kappa$ B (32). Os estudos indican que as propiedades protectoras do resveratrol están relacionadas coa inhibición da sínteses e secreción dos mediadores pro-inflamatorios e das enzimas encargadas da súa produción, como COX-1 e COX-2. Deste xeito, o resveratrol consegue reducir a resposta inflamatoria ao actuar sobre factores de transcrición como NF-  $\kappa$ B ou a proteína activadora-1 (AP-1). A regulación de NF-  $\kappa$ B polo resveratrol lévase a cabo mediante o bloqueo da activación de NF-  $\kappa$ B polo TNF- $\alpha$ , pola inhibición da fosforilación e translocación da subunidade p65 de NF-  $\kappa$ B ou ben pola supresión da transcrición dependente de NF-  $\kappa$ B de xenes reporteiros (4).

Dados estes antecedentes, en este traballo búscase avaliar a relación da disfunción mitocondrial sobre a resposta inflamatoria en dous tipos celulares implicados na patoloxía artrítica, así como estudar a activación do complexo inflamasoma e valorar o posible efecto antiinflamatorio derivado do tratamento co composto natural, resveratrol.

## 2. OBXECTIVOS.

En base aos antecedentes e hipóteses expostos, propúxose o seguinte obxectivo xeral para este traballo:

Avaliar a implicación da disfunción mitocondrial na activación da resposta inflamatoria en dous tipos celulares implicados na patoloxía artrítica e a súa posible modulación polo uso de resveratrol.

Para a consecución do obxectivo anteriormente mencionado, levaranse a cabo os seguintes obxectivos específicos:

- I. Avaliar *in vitro* na liña celular monocítica, THP-1, o efecto da disfunción mitocondrial sobre os niveis de citocina pro-inflamatoria IL-1 $\beta$  e a súa modulación ante varios estímulos antioxidantes e inhibidores da vía do inflammasoma.
  
- II. Avaliar *in vitro* a expresión xénica de marcadores implicados na activación do complexo inflammasoma NLRP3, tras a súa estimulación con mediadores inflamatorios/pro-oxidantes e a súa modulación mediante o tratamento preventivo con resveratrol.

## 3. MATERIAIS E MÉTODOS.

Para a consecución dos obxectivos neste traballo leváronse a cabo unha serie de procedementos, detallados a continuación

### 3.1. Liña celular THP-1: cultivo e mantemento.

Empregouse a liña celular humana monocítica THP-1. Esta foi cultivada en matraces Falcon<sup>®</sup>™ (Corning, EE.UU.™) con medio RPMI 1640 (do inglés, *Roswell Park Memorial Institute*; HyClone™, GE Healthcare, EE.UU.) suplementado con 10% de soro bovino fetal (SBF; Thermo Fisher Scientific, EE.UU.) inactivado, 100UI/ml de penicilina e 100  $\mu$ g/ml de estreptomina (Thermo Fisher Scientific). Para o seu mantemento engadiuse novo medio cada dous días, coa realización dun pase a un novo frasco de cultivo e substitución do medio completo cada sete días. Durante o proceso de cultivo, mantivéronse as células en incubadores baixo condicións estándar a 5% CO<sub>2</sub> e 37 °C. Para evitar a activación celular e a consecuente

proliferación excesiva, as células mantivéronse nun ratio de  $2 \times 10^5$ - $1 \times 10^6$  células por cada ml de medio empregado.

### **3.1.1. Diferenciación de monocitos a macrófagos.**

Dada que na patoloxía artrítica un aspecto crucial dos monocitos consiste en diferenciarse en macrófagos inflamatorios tras ser recrutados ao lugar onde se produciu a inflamación, nos propuxemos diferenciar os monocitos da nosa liña celular. Con este obxectivo, empregouse Phorbol 12-myristate-13-acetate (PMA; Sigma-Aldrich, EE.UU.), a unha concentración de  $0,5 \mu\text{M}$  e un período de incubación de 3h. Para evitar a adhesión das células á superficie do frasco, incubáronse ás células sobre a superficie non tratada. Unha vez transcorrido o tempo de diferenciación, os macrófagos foron centrifugados a 300g durante 5 min e resuspendidos en medio RPMI suplementado con 2% SBF inactivado, 100 UI/ml de penicilina e  $100 \mu\text{g/ml}$  de estreptomicina.

### **3.1.2. Estimulación celular.**

Para levar a cabo os experimento, tras a súa contaxe, procedeuse a sembrar as células previamente diferenciadas a razón de  $1 \times 10^6$  células por condición nunha placa de 6 pocillos (Corning), no medio de depleción RPMI suplementado con 2% inactivado, 100 UI/ml de penicilina e  $100 \mu\text{g/ml}$  de estreptomicina durante 24 horas para inducir a súa entrada nun estado quiescente, antes de ser estimuladas, de forma que cesa a súa división celular. Transcorrido o tempo de incubación, os macrófagos incubáronse en condicións basais (as células non recibiron estímulo) ou en presenza de distintos estímulos (Táboa 1) en medio RPMI con 2% de SBF inactivado. Os tempos de estímulo foron 6, 18 e 36h, tras os cales se recolleron os sobrenadantes celulares para a valoración da expresión da IL-1 $\beta$  segregada ao medio. Para valorar o efecto preventivo dos nosos inhibidores e do RSV, estes pre-incubáronse 30 min antes de introducir o estímulos positivo, LPS.

**Táboa 1. Estímulos e concentracións empregadas nos experimentos in vitro.**

<b>ESTÍMULO</b>	<b>CONCENTRACIÓN</b>	<b>CASA COMERCIAL</b>
Lipopolisacárido (LPS)	$1 \mu\text{g/ml}$	Sigma-Aldrich
Inhibidor de caspasa-1 (AC-YVAD-CMK)	$100 \mu\text{M}$	Cayman (EE.UU.)
Inhibidor do complexo inflamasma MCC950	$10 \mu\text{M}$	Sigma-Aldrich
MitoTempo	$10 \mu\text{M}$	Santa Cruz Biotechnology, EE.UU

Resveratrol(RSV)	50 $\mu$ M	Sigma-Aldrich
------------------	------------	---------------

### 3.1.3. *Análise da concentración da IL-1 $\beta$ .*

Para a determinación dos niveis da citocina pro-inflamatoria IL-1 $\beta$  nos sobrenadantes celulares utilizouse o *kit* Quantikine® HS ELISA cunha sensibilidade de 0,033 pg/ml. Para realizar o inmunoensaio, comezouse engadindo un diluínte a cada un dos pocillos empregados e, seguidamente, engadíronse 100  $\mu$ l das mostras previamente diluídas no mesmo diluínte proporcionado polo *kit*, 1/500 no caso da condición basal ou 1/5000 no caso do estímulo positivo e as súas combinacións, aos pocillos os cales teñen fixados anticorpos anti-IL-1 $\beta$  específicos para humano. As mostras incubáronse durante 2 horas a temperatura ambiente en axitación e procedeuse a realizar catro lavados con tampón de lavado. Seguidamente, engadiuse o conxugado de IL-1 $\beta$  humana. Incubouse durante 1 hora a temperatura ambiente e en axitación, repetíronse os lavados e incorporouse o polímero de estreptavidina (1X). Volveuse a incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente e en axitación, para posteriormente retirar o líquido e repetir os lavados. Finalmente engadiuse a solución de substrato e, tras 30 minutos, parouse a reacción engadindo unha solución 2N de ácido sulfúrico. Nos 30 minutos seguintes, usouse o espectrofotómetro NanoQuant Infinite® M200 PRO (Tecan, Suíza) para determinar a densidade óptica de cada pocillo a 450nm. Realizouse unha corrección a 540nm para corregir as imperfeccións ópticas da placa. A concentración de IL-1 $\beta$  presente nos sobrenadantes celulares extrapolouse a partir dunha curva patrón con un rango de detección de 0,125 a 8 pg/ml. Os resultados obtidos expresáronse en pg/ml.

### 3.2. **Illamento e cultivo de sinoviocitos humanos.**

Obtívose o tecido sinovial humano a partir de cadeiras e xeonllos procedentes de doantes adultos do Complexo Hospitalario Universitario de A Coruña (CHUAC), os cales foron sometidos a cirurxía de reposición ou amputación dos membros inferiores, pasando a formar parte da “Colección de mostras para o desenvolvemento da investigación en enfermidades reumáticas” as cales están autorizadas polo CEI de Galicia co Código de Rexistro 2013/107 e inscritas na colección de mostras do Rexistro Nacional de Biobancos con código C.0000424. O procesamento para a obtención das mostras conta coa aprobación do Comité Ético de Investigación de Galicia, Os donantes son informados e firman o consentimento para participar nesta colección. Finalmente, as mostras foron recollidas e tratadas de maneira anónima.

Tras a obtención do tecido sinovial, limpáronse os restos de tecido conxuntivo. A continuación, fragmentouse e depositouse nunha placa de petri de cultivo de 100mm de diámetro (Corning). Engadiuse o medio de cultivo RPMI 1640 suplementado con 20% de SBF, 100 UI/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina e UI/ml de insulina humana (Actrapid®, Novo Nordisk, Dinamarca). Os cambios de medio realizáronse cada dous días. Tras acadar a confluencia na placa de cultivo, realizouse a disociación enzimática con tripsina 0.05% suplementada con EDTA 1X (Thermo Fisher Scientific). Tras o segundo pase de subcultivo, obtívose unha poboación homoxénea de células adherentes, con fenotipo fibroblástico e morfoloxía fusiforme. Durante o proceso de cultivo, as células mantivéronse en incubadores baixo condicións estándar a 5% CO<sub>2</sub> e 37 °C.

Dada a dificultade para dispoñer de mostras de pacientes artríticos e a maior dispoñibilidade de de mostras de pacientes con patoloxía artrósica, valorouse empregar este último tipo celular no desenvolvemento dos estudos *in vitro*. Para iso testouse a resposta de ambos tipos celulares a distintos estímulos, descartándose a existencia de diferencias no patrón e magnitude da mesma. Ademais, a osteoartrósia (OA), que actúa sobre a cartilaxe articular, presenta un grao inflamatorio moito menor que unha enfermidade como a AR, tipicamente inflamatoria. Por todo isto, empregáronse células OA no desenvolvemento dos experimentos descritos a continuación, con coñecemento das limitacións que isto pode supoñer.

### 3.2.1. Estimulación celular.

As células foron sembradas en placas de 6 pocillos, cunha condición por pocillo. Unha vez alcanzada a confluencia, deplecionáronse as células mediante o lavado con salino e a adición de medio RPMI suplementado con 0,5% de SBF durante 24 horas. Pasado este tempo, incubáronse ben en condicións basais ou en presenza dos distintos estímulos (Táboa 2) en medio RPMI con 0,5% de SBF. Os tempos de exposición aos estímulos foron de 6, 12 e 24 h.

**Táboa 2. Estímulos e Concentración empregados nos experimentos *in vitro* con sinoviocitos.**

ESTÍMULO	CONCENTRACIÓN	CASA COMERCIAL
Paraquat (PQ)	1mM	Sigma-Aldrich
TNF- $\alpha$	10 ng/ml	Sigma-Aldrich
Resveratrol (RSV)	50µM	Sigma-Aldrich

### 3.2.2. Análise da expresión xénica.

Empregouse a técnica da reacción en cadea da polimerasa (PCR: do inglés, *Polymerase Chain Reaction*) a tempo real, a cal combina a amplificación e a detección nun mesmo paso. Isto conséguese ao correlacionar o produto obtido en cada ciclo coa sinal de intensidade.

### **3.2.2.1. Extracción e cuantificación de ARNm.**

A extracción de ARN realizouse mediante o emprego do reactivo TRI Reagent® (MRC, EE.UU.) de acordo as instrucións do fabricante. TRI Reagent® é unha solución monofásica de fenol e tiocinato de guanidina, a cal permite o lisado celular e a extracción de ARN, mentres que inhibe a actividade da ARNasa. Seguidamente, realizouse un lavado con salino, engadíronse 300µl de TRI Reagent® e incubouse durante 5 minutos en axitación. Recuperouse o homoxenizado e engadiuse cloroformo, o que permitiu separar e recuperar a fase acuosa (onde se encontra o ARN) de cada condición. A continuación, engadíronse 150 µL de isopropanol, para provocar a precipitación do ARN. Finalmente, realizáronse dous lavados con etanol ao 75% e ao 100%, deixando secar brevemente antes de disolver o precipitado en auga libre de ARNasas a 55°C.

A cuantificación realizouse mediante un espectrofotómetro de microvolumen *Nanodrop ND-1000* (Thermo Fisher Scientific), cunha medición da absorbancia a 260nm. A pureza foi determinada mediante a avaliación do ratio entre a absorbancia a 260nm e a absorbancia a 280 nm.

### **3.2.2.2. Retrotranscrición do ARN.**

Empregouse o kit *NZY First Strand cDNA Synthesis* (NZYTech, Portugal) para a retrotranscrición do ARNm a ADNc. Sintetizouse o ADNc a partir de 500 ng de RNA, para preparar a reacción engadíronse 10µl de tampón 2X (cebadores oligodT<sub>18</sub>, hexámeros ao azar, MgCL<sub>2</sub> e desoxinucleótidos disulfato) e 2µl dunha mestura enzimática de transcrición inversa (ARNasaH) e un inhibidor de ribonucleasa para evitar a degradación de ARN ante a contaminación por ARNasas. O volume da preparación completouse con auga libre de ARNasas ata os 20 µl. Tras a preparación, introdúcense as mostras no termociclador, cun programa inicial de 30 min de incubación a 50° C, desencadeando a reacción de retrotranscrición. Seguidamente quentouse a mostra a 85°C durante 5 min, inactivando a enzima. Por último, engádese 1 µl de ARNasa H (*E.coli*) e incúbase durante 20 min a 37°C, para degradar as impurezas de ARN tras a sínteses de ADNc, as cales poden interferir no proceso da PCR a tempo real. As mostras almacénanse a -20°C ata a súa utilización.

### 3.2.2.3. PCR a tempo real.

Utilizouse o *kit* LightCycler 480 Probes Master da casa comercial Roche. Realizouse unha mestura coa Mastermix, os cebadores sentido e antisentido, a sonda do xene a identificar e auga libre de RNAsas. Os volumes utilizados sinálanse a continuación (Táboa 3)

**Táboa 3. Mestura da reacción de PCR a tempo real.** A concentración utilizada dos cebadores foi de 0.7 $\mu$ M, partindo dunha solución nai de 20mM.

Mezcla de reacción para sondas UPL 2X ( <i>LightCycler</i> <sup>®</sup> 480Probes Master)	5 $\mu$ l
Cebador sentido	0,35 $\mu$ l
Cebador antisentido	0,35 $\mu$ l
Sonda UPL	0,1 $\mu$ l
Auga libre de RNAsas	2,2 $\mu$ l
ADNc	2 $\mu$ l
<b>Volume total</b>	<b>10 <math>\mu</math>l</b>

Engadíronse 10  $\mu$ l da mestura, sinalada na táboa 3 a unha placa opaca de 96 pocillos específica para a plataforma de PCR *LightCycler*<sup>®</sup> 480 Instrument II (Roche, Suiza). O protocolo da PCR atópase detallado a continuación (Táboa 4).

**Táboa 4. Protocolo de amplificación empregado na PCR a tempo real.**

Nº CICLOS	TEMPERATURA	DURACIÓN	ETAPA
1	95°C	10 minutos	<b>PRE-INCUBACIÓN</b> Activación da <i>FastStart</i> Taq ADN Polimerasa
50	95°C	10 segundos	<b>AMPLIFICACIÓN</b> Desnaturalización da dobre hélice de ADN
	60°C	30 segundos	Hibridación dos cebadores coas súas secuencias diana no ADN de cadea sinxela
	72°C	1 segundo	Sínteses e elongación da nova cadea de ADN

1	40°C	20 segundos	<b>ENFRIAMENTO</b>
---	------	-------------	--------------------

A realización da PCR levouse a cabo con sondas UPL (do inglés, *Universal Probe Library*) as cales son sondas fluorescentes tipo TaqMan de 8-9 nucleótidos de lonxitude. O seu funcionamento baséase na posesión de 2 fluoróforos, un reporteiro, unido ao extremo 5' e un apagador (*quencher*) unido ao extremo 3', o cal suprime a emisión de fluorescencia por parte do reporteiro. Se a sonda se encontra intacta, o *quencher* impide a emisión de fluorescencia. Pola contra, cando a sonda hibrida coa súa secuencia de ADN diana do xene de interese, a actividade exonucleasa 5'-3' da Taq polimerasa escinde a sonda, separando ao *quencher* do reporteiro e permitindo a emisión de fluorescencia. A acumulación do fluoróforo aumenta tras cada ciclo de PCR, aumentando a sinal fluorescente.

Os cebadores, específicos para os xenes estudados por este método, e a sonda correspondente a cada cebador foron deseñados utilizando a ferramenta informática "*Universal Probe Library Assay Design Center*" ([https://lifescience.roche.com/en\\_es.html](https://lifescience.roche.com/en_es.html); Roche). O deseño optimizouse para lonxitudes comprendidas entre os 20 e 26 nucleótidos, para temperaturas de anelamento de 59-60 °C, cun ratio guanina/citosina do 50% e unha lonxitude de amplicón menor a 120 nucleótidos.

A relación dos xenes analizados expónse a continuación, así como os cebadores e as sondas UPL utilizadas (Táboa 5). Empregouse un xene de referencia para normalizar a expresión xénica de cada un deles, en concreto, a proteína de unión a TATA, xa que non se vía alterada polas condicións estudadas. As mostras amplificáronse por duplicado e os resultados finais foron expresados como o ratio do incremento respecto a condición basal (normalizado a 1).

**Táboa 5. Listaxe de sonda e cebadores empregados na obtención dos produtos de interese.**

Gen	Proteína	Cebadores (sentido e antisentido) 5'-3'		Sonda UPL
		S	A	
IL-1 $\beta$	Interleuquina 1 beta	S	tacctgtcctgcgtgttgaa	#78
		A	tctttgggtaattttgggatct	
CASP1	Caspasa 1, Cisteína peptidasa	S	ccaggacattaaataaggaaactgt	#4

		A	ccaaaaacctttacagaaggatctc	
<b>NLRP3</b>	Criopirina	S	cacgtgttcgaatcccact	#72
		A	aacctccactcctcttca	
<b>TBP1</b>	Proteína de unión a TATA	S	gccatagtgatcttgcagt	#67
		A	cgctggaactcgtctcacta	

### 3.3. Análises de datos.

Os datos expresáronse como a media  $\pm$  o erro estándar da media (EEM). Todas as análises estatísticas realizáronse utilizando o software estatístico GraphPad PRISM® versión 5.01 (GraphPad Software, EE.UU.). Os datos non paramétricos analizáronse mediante a proba de Mann-Whitney e as diferenzas consideráronse significativas cando o P-valor  $\leq 0,05$

## 4. RESULTADOS.

### 4.1. Avaliación da produción de IL-1 $\beta$ na liña celular THP-1.

A liña celular THP-1 foi tratada con PMA de acordo ao protocolo detallado no apartado 3.1.1. de materiais e métodos para a súa diferenciación a macrófagos. Unha vez diferenciados, empregouse como estímulo positivo LPS co fin de provocar a disfunción mitocondrial e por tanto, un escenario de estrés oxidativo e ademais, combinouse ao mesmo tempo con estímulos antiinflamatorios e antioxidantes (resveratrol, o inhibidor da caspasa-1 AC-YVAD-CMK, o inhibidor do inflammasoma MCC950 e o sequestrador de ROS, MitoTEMPO), buscando avaliar o seu posible efecto modulador na resposta inflamatoria e por conseguinte, dos niveis de IL-1 $\beta$  nos sobrenadantes celulares, aos tempos de 6, 18 e 36 horas. Para iso realizouse un inmunoensaio ELISA

#### 4.1.1. A inhibición do complexo inflammasoma limitou a resposta inflamatoria

A ensamblaxe do complexo inflammasoma NLRP3 e a consecuente activación da caspasa-1 son esenciais para que a maduración e segregación de IL-1 $\beta$  poida ter lugar. Así, quixemos avaliar o efecto da inhibición do complexo inflammasoma, mediante o emprego do inhibidor selectivo MCC950 a unha concentración de 10 $\mu$ M, así como o efecto resultante da inhibición de caspasa-

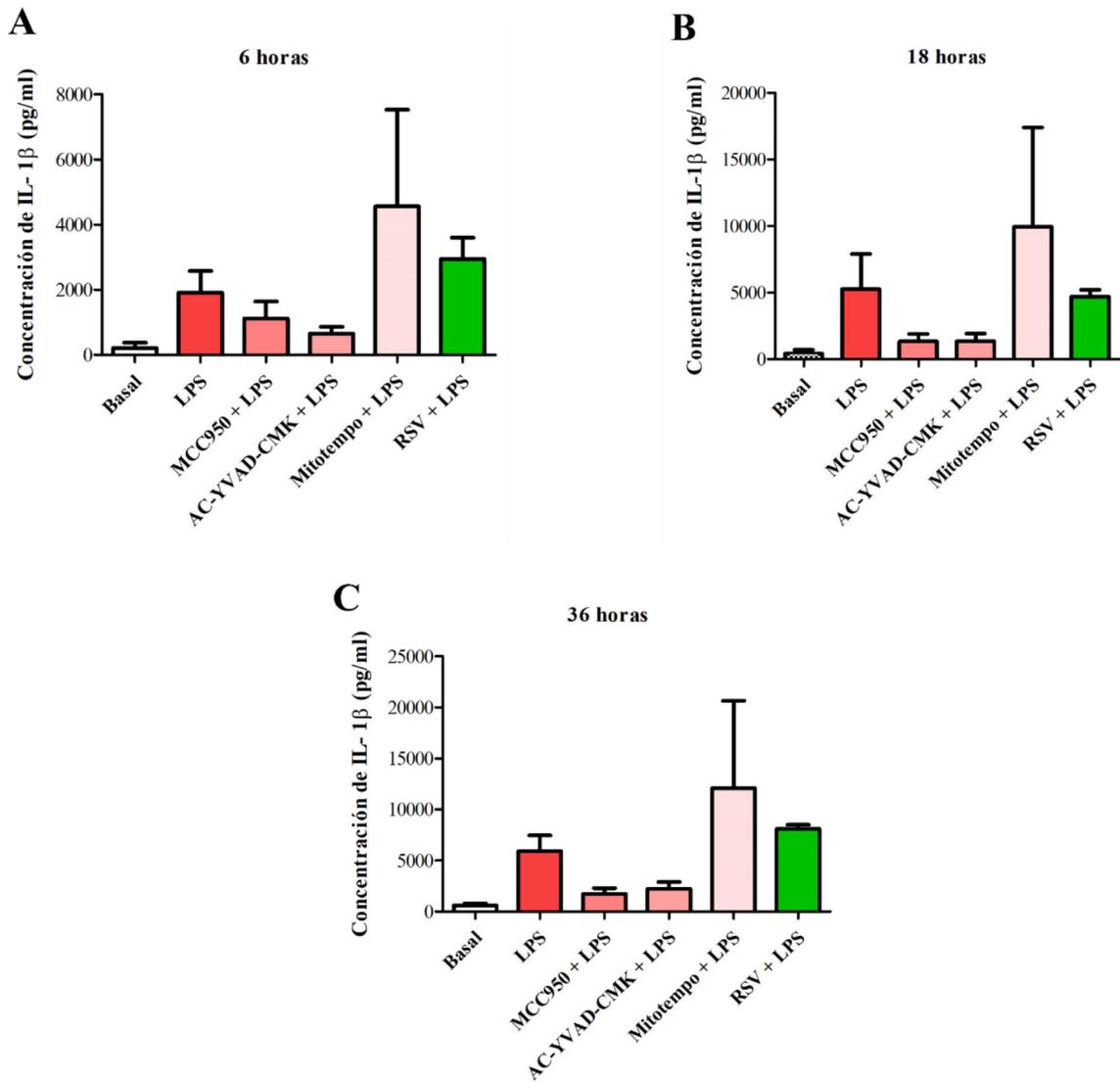
1 empregando AC-YVAD-CMK 100 $\mu$ M, sobre a concentración de citoquina IL-1 $\beta$  nos sobrenadantes da liña celular THP-1 aos tempos de 6, 18 e 36 horas. Deste xeito, tal e como se amosa nas Figuras 1A, 1B e 1C, ambos inhibidores foron capaces de reducir de xeito considerable os niveis de IL-1 $\beta$  en comparación con aqueles atopados no sobrenadante das células tratadas unicamente con LPS en todos os tempos de estudio, aínda que, de forma máis notoria nos tempos máis longos de 18 e 36 horas. Estes resultados parecen indicar que, efectivamente, o complexo inflammasoma intervén de forma directa na xeración da resposta inflamatoria nun contexto de dano oxidativo.

#### **4.1.2. Efecto do antioxidante mitocondrial MitoTEMPO sobre a produción de IL-1 $\beta$**

A produción de ROS e as situacións de estrés oxidativo están fortemente ligadas coa disfunción mitocondrial e a consecuente activación da resposta inflamatoria mediada pola vía de sinalización de NF- $\kappa$ B. Sen embargo, os datos recollidos nas Figuras 1A, 1B e 1C amosan un curioso incremento da expresión de IL-1 $\beta$  en presenza de secuestradores de ROS mitocondriais, MitoTempo, tanto se esta se compara coa expresión obtida en condicións basais como coa expresión inducida polo LPS en todos os tempos avaliados neste estudo, 6, 18 e 36h.

#### **4.1.3. Efecto do resveratrol sobre os niveis da citoquina pro-inflamatoria IL-1 $\beta$**

Como se indica nas Figuras 1A e 1C, o tratamento dos macrófagos con RSV durante 6, 18 e 36 horas, induciu unha produción de IL-1 $\beta$  similar á do tratamento con LPS tanto a 6 como a 18 horas. Sen embargo, tal e como se pode observar na Figura 1, ás 18h, as células tratadas con RSV mostraron unha lixeira redución na concentración desta citoquina, máis similar á atopada naquela condición co estímulo positivo. Estes datos nos suxiren que o RSV non estaría exercendo un papel antioxidante, e polo tanto, non estaría limitando a activación do complexo inflammasoma, nin a consecuente liberación de IL-1 $\beta$  ao medio na liña celular monocítica THP-1.



**Figura 2. Efecto da disfunción mitocondrial sobre a expresión de IL-1 $\beta$ .** Representación gráfica da media  $\pm$  EEM dos niveis de IL-1 $\beta$  nos sobrenadantes celulares determinada mediante ELISA, avaliando a disfunción mitocondrial provocada pola produción de ROS dependente de LPS e a súa combinación co inhibidor do inflammasoma MCC950, o inhibidor de caspasa-1 AC-YVAD-CMK, e o secuestrador de ROS MitoTEMPO e o resveratrol aos tempos de A) 6 horas, B) 18 horas e C) 36 horas.

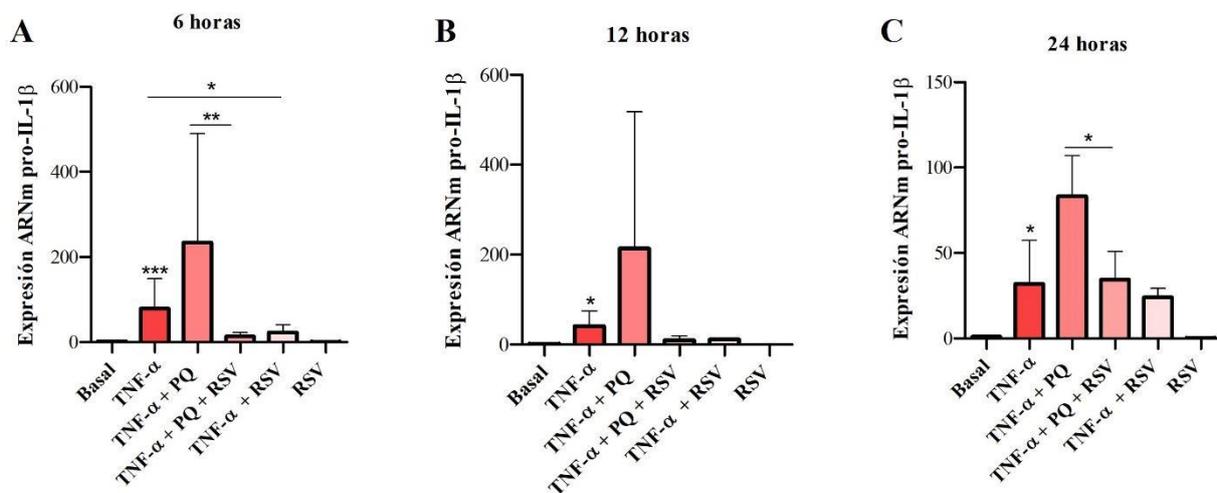
#### 4.2. Estudio da activación do inflammasoma mediada pola disfunción mitocondrial nun contexto inflamatorio en sinoviocitos e o efecto do resveratrol.

Dado que as células sinovias son outro dos tipos celulares que se encontran implicadas de forma directa na perpetuación do proceso inflamatorio da artrite, neste traballo quixemos avaliar o efecto da inflamación sobre este tipo celular; para o que empregamos como estímulo a citoquina pro-inflamatoria TNF- $\alpha$  a unha concentración de 10 ng/ml, e, ademais, buscamos coñecer se a súa posible sinerxía coa disfunción mitocondrial, para o que se empregou o disruptor

mitocondrial Paraquat(PQ) a unha concentración de 1 mM. En particular, centrámonos na modulación de marcadores clave na activación do complexo inflamsoma: a pro-IL-1 $\beta$ , a pro-caspasa-1 e NLRP3 aos tempos de 6, 12 e 24 horas. Sumado a isto, analizouse o posible efecto preventivo e antiinflamatorio do resveratrol. Para iso levouse a cabo a técnica de PCR a tempo real, obtendo os resultados que detallamos a continuación.

#### 4.2.1. Efecto da disfunción mitocondrial sobre a expresión xénica de pro-IL-1 $\beta$ en sinoviocitos humanos.

Avaliouse a expresión xénica da pro-IL-1 $\beta$  tras 6, 12 e 24 horas de incubación. Como se observa na Figura 3A, 3B e 3C, e como cabería esperar, apreciouse un incremento significativo da pro-IL-1 $\beta$  tras a súa estimulación con TNF- $\alpha$  en comparación cos niveis de expresión obtidos na condición basal en cada un dos tempos de estudio; sen embargo, resultou chamativo que, a combinación de TNF- $\alpha$  máis o PQ non acadou un efecto sinérxico sobre os niveis de expresión do mediador, xa que aínda que induciu unha maior expresión na condición con TNF- $\alpha$ , esta non alcanzou diferencias significativas fronte TNF- $\alpha$ .

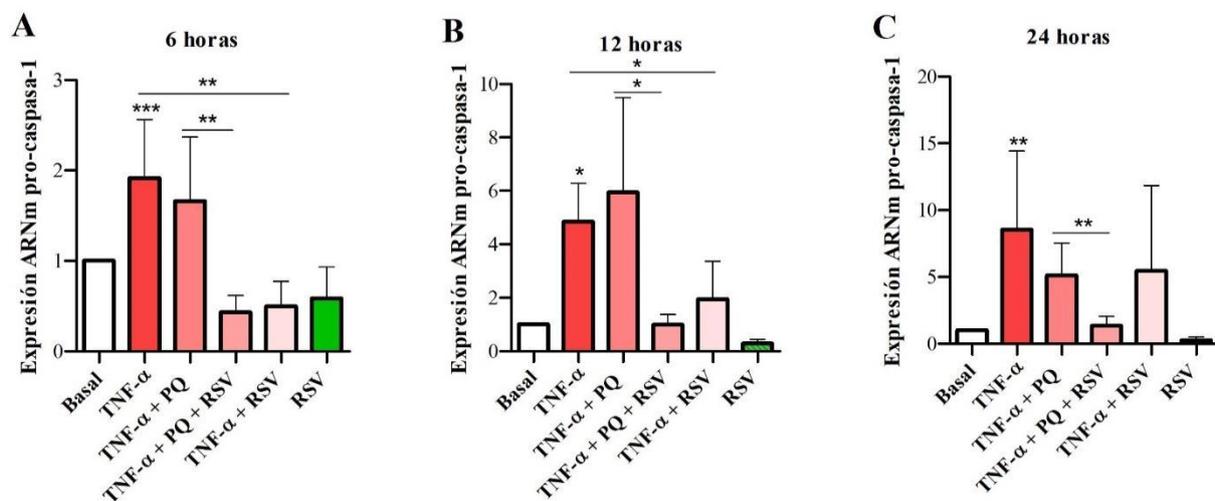


**Figura 3. Efecto da disfunción mitocondrial e a resposta inflamatoria sobre a expresión xénica de pro-IL-1 $\beta$  en sinoviocitos.** A gráfica representa a media  $\pm$  EEM (n=6-8) da expresión xénica de pro IL-1 $\beta$  determinada mediante PCR a tempo real a A) 6 horas, B) 12 horas e C) 24 horas. \*  $P \leq 0,05$ , \*\*  $P \leq 0,01$  e \*\*\* $P \leq 0,005$ .

#### 4.2.2. Efecto da disfunción mitocondrial sobre a expresión xénica de pro-caspasa-1 en sinoviocitos humanos.

Simultaneamente á pro IL-1 $\beta$ , avaliouse a expresión xénica da pro-caspasa-1, a cal da lugar á forma inactiva da enzima necesaria para que se produza a activación e liberación da IL-1 $\beta$ . Tal e como se pode observar na Figura 4A, tras 6 horas de estimulación a expresión da pro-caspasa-1 sufriu un incremento significativo baixo os efectos do TNF- $\alpha$  ( $P \leq 0,001$ ), mentres que,

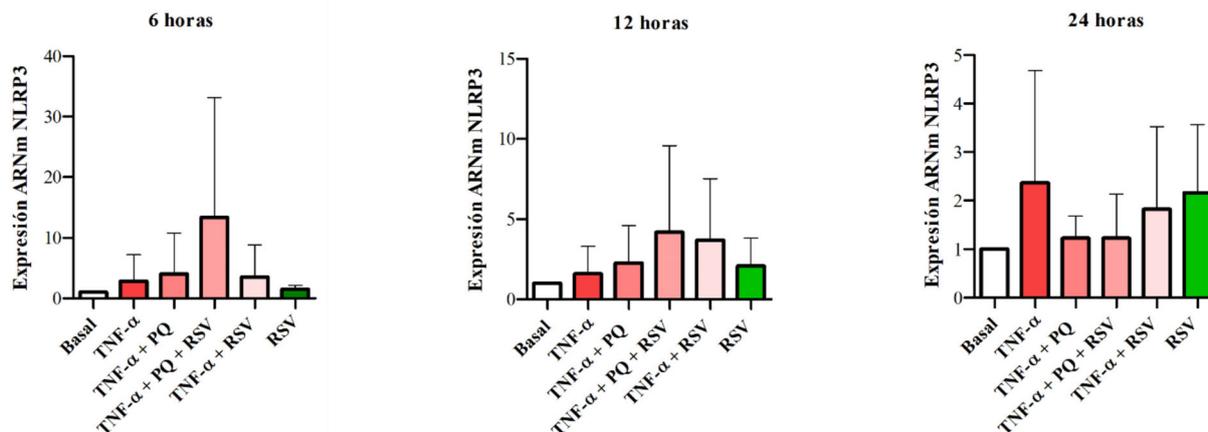
curiosamente, a combinación con PQ, se ben amosa un aumento fronte aos niveis basais, sufriu unha leve redución fronte a expresión de pro-caspasa-1 na condición estimulada por TNF- $\alpha$ . Novamente, ás 12 horas de incubación apréciase resultados similares, aínda que a estimulación con TNF- $\alpha$  non obtivo un incremento tan notorio ( $P \leq 0,05$ ). Unha vez máis, tal e como se observou no tempo de 6 horas, o incremento no tratamento de TNF- $\alpha$ +PQ non alcanzou unha diferenza estatisticamente relevante con respecto á indución con TNF- $\alpha$ . Por último, tras 24 horas de incubación cos estímulos, observouse como a expresión da pro-caspasa-1 mostrou un incremento notablemente significativo ( $P < 0,01$ ) naquela condición na que se tratou co estímulo inflamatorio TNF- $\alpha$ , con respecto aos niveis basais



**Figura 4. Efecto da disfunción mitocondrial e a resposta inflamatoria sobre a expresión xénica de pro-caspasa-1 en sinoviocitos.** A gráfica representa a media  $\pm$  EEM ( $n=6-8$ ) da expresión xénica de pro-caspasa-1 determinada mediante PCR a tempo real a A) 6 horas, B) 12 horas e C) 24 horas. \* $P \leq 0,05$ , \*\* $P \leq 0,01$  e \*\*\* $P \leq 0,005$ .

#### 4.2.3. Efecto da disfunción mitocondrial sobre a expresión xénica de NLRP3 en sinoviocitos humanos.

A análise da expresión xénica de NLRP3 realizouse aos tempos de 6, 12 e 24 horas. Como se amosa na Figura 5, os valores obtidos alcanza unha ampla variación. No tempo de 6 horas, a indución da resposta inflamatoria con TNF- $\alpha$  e a combinación do TNF- $\alpha$  + PQ dan lugar a un incremento de NLRP3, este non é estatisticamente significativo con respecto aos valores basais.



**Figura 5. Efecto da disfunción mitocondrial e a resposta inflamatoria sobre a expresión xénica de NLRP3 en sinoviocitos.** A gráfica representa a media  $\pm$  EEM (n=6-8) da expresión xénica NLRP3 determinada mediante PCR a tempo real a A) 6 horas, B) 12 horas e C) 24 horas.

#### 4.2.4. O resveratrol actúa modulando a expresión xénica de pro-IL-1 $\beta$ , pro-caspasa-1 e NLRP3 nun contexto de dano mitocondrial.

No referente a pro-IL-1 $\beta$ , tal e como se amosa na figura 3A e 3C, o pre-tratamento con RSV foi capaz de reducir significativamente a resposta inflamatoria nun contexto de estrés oxidativo ao comparar ás condicións de TNF- $\alpha$ +PQ+RSV con TNF- $\alpha$ +PQ, a uns tempos de 6 e 24 horas ( $P \leq 0,01$  e  $P \leq 0,05$ ); pero, unicamente ás 6 horas, o RSV foi capaz de diminuír de maneira significativa a expresión xénica da pro-IL-1 $\beta$  cando se induce a resposta inflamatoria con TNF- $\alpha$  aínda que os tempos de 12 e 24 horas mostran unha tendencia á diminución.

De xeito similar, observouse que tanto na condición TNF- $\alpha$  como na condición TNF- $\alpha$ +PQ como o RSV foi capaz de reducir de maneira significativa a expresión da pro-caspasa-1 ( $P \leq 0,01$  en ambos casos). Así mesmo, ás 12 horas de incubación o tratamento con RSV presenta uns cambios non tan notorios ( $P$  valor  $< 0,05$ ) coma na incubación de 6 horas. senón que sufriu unha leve diminución a cal foi máis exacerbada cando se tratou as células con RSV, alcanzando un P-valor de 0,01 fronte a condición TNF- $\alpha$  + PQ. Por último, as 24 horas, o RSV presentou unha redución dos niveis de pro-caspasa-1, a cal obtivo un maior efecto na condición TNF- $\alpha$ +PQ alcanzando un P-valor de 0,01.

De xeito inesperado, o tratamento con RSV non consegue reducir os niveis de NLRP3, se non que estes vense aumentados en ambas condicións, aínda que sen un respaldo estatístico desta diferenza. Sumado a isto, os resultados das mostras incubadas durante 12 horas mostran o mesmo patrón que a 6 horas, pero cunha redución na cantidade relativa de NLRP3, debida a

redución da expresión total na condición de TNF- $\alpha$  +RSV+PQ. Pola súa parte, as 24 horas, obsérvase unha continuación da tendencia cara unha redución da cantidade relativa de NLRP3. Adicionalmente, se ben as diferencias non son significativas, os valores das condicións tratadas con PQ deixan de ser relativamente máis abundantes que as condicións nas que a inflamación se induciu só con TNF.

## 5. DISCUSIÓN.

A AR é unha enfermidade crónica de natureza autoinmune que afecta fundamentalmente ao aparato locomotor. Esta inclúese dentro do grupo das enfermidades reumáticas, onde se posiciona como a artrites articular máis común. Posúe unha gran importancia socioeconómica, debido á gran cantidade de recursos que se destinan ao seu tratamento, así como o gran impacto que ten sobre a calidade de vida do paciente.

Na actualidade, non existe unha cura para a AR, polo que os tratamentos habituais céntranse en deter o progreso da enfermidade, reducir ou reverter a dor e a disfunción articular e manter estes efectos. Sen embargo, parte dos pacientes non acadan unha remisión da actividade ou deixan de responder ao tratamento (28,33). Isto, combinado cos efectos secundarios que ocasionan os tratamentos, conduce a que nos últimos anos se producise un aumento do estudo de compostos naturais con propiedades antioxidantes e antiinflamatorias co obxectivo de descubrir novas dianas e fármacos para esta enfermidade.

Na AR, o sistema inmune do individuo ataca ás propias células do organismo, o que conduce a indución da resposta inflamatoria, a cal é a responsable da degradación e destrución da cartilaxe e do óso articular (3,34). A indución da resposta inflamatoria está relacionada coa disfunción mitocondrial polo aumento da concentración de ROS e o consecuente incremento do estrés oxidativo (28,34). Isto conduce a estimulación de citocinas pro-inflamatorias como o TNF- $\alpha$ , que incrementa os niveis de produción de ROS a vez que aumenta o desenvolvemento da inflamación. Este incremento da inflamación lévase a cabo ao inducir a expresión de xenes relacionados coa produción de citocinas como IL-1 $\beta$  mediante a activación da ruta de sinalización de NF- $\kappa$ B (34–36).

Neste traballo realizáronse varios experimentos nos cales se someteu tanto á liña celular THP-1 como a sinoviocitos humanos á estimulación mediante LPS e TNF- $\alpha$ +PQ respectivamente, co obxectivo de inducir a inflamación e o estrés oxidativo mediante a disfunción mitocondrial;

así mesmo, pre-incubouse a ambos tipos celulares con distintos estímulos antioxidantes e antiinflamatorios, coa fin de previr ou atenuar o dano mitocondrial e, por tanto, impedir a activación da resposta inflamatoria mediada polo complexo inflammasoma. Con isto búscase estudar a relación entre a disfunción mitocondrial e o desenvolvemento da inflamación na AR, así como o efecto que poidan ter a supresión do estrés oxidativo sobre a resposta inflamatoria. Con este fin, neste estudio empregouse un inmunoensaio ELISA para a análise da concentración da IL-1 $\beta$  na liña celular THP-1 e a tecnoloxía da PCR a tempo real para a avaliación da expresión xénica nos sinoviocitos de pacientes.

Os monocitos levan a cabo unha función clave na patoloxía artrítica ao diferenciarse a macrófagos nas zonas afectadas pola inflamación, nas cales promoven o incremento da expresión de mediadores pro-inflamatorios ao inducir, entre outros mediadores, a produción de TNF- $\alpha$ . Simultaneamente, os macrófagos tamén son unha peza clave no proceso de erosión do óso na AR debido a súa diferenciación excesiva en osteoclastos (17,37). O conxunto destes factores convirte aos macrófagos en importantes dianas para a investigación da AR, motivo polo que se decidiu empregar PMA para inducir a diferenciación a macrófagos da liña celular monocítica THP-1 en este traballo, co obxectivo de estudar o efecto de diversos estímulos antioxidantes e antiinflamatorios nun contexto de estrés oxidativo mediado polo emprego de LPS sobre os niveis de IL-1 $\beta$ .

Os datos obtidos neste traballo amosaron, que a inhibición tanto da caspasa-1 como do propio inflammasoma NLRP3 resultou nunha redución considerable na concentración de IL-1 $\beta$  nos sobrenadantes celulares o que demostra a función clave da vía inflammasoma na modulación da resposta inflamatoria ante situacións de estrés oxidativo. Así, disfunción mitocondrial e o consecuente aumento da produción de ROS inducen a liberación de citoquinas pro-inflamatorias(28), responsables da activación de NLRP3 pola vía de sinalización de NF- $\kappa$ B. Isto da lugar a ensamblaxe do inflammasoma NLRP3, o que activa a súa vez á caspasa-1, encargada da indución da maduración e segregación de IL-1 $\beta$ , que actúa como mediador pro-inflamatorio dirixindo o desenvolvemento da inflamación. Deste modo, a inhibición da ensamblaxe e do modo de acción do inflammasoma NLRP3 ofrecen unha importante diana no tratamento de enfermidades inflamatorias como a AR (16,27,38). Sen embargo, os resultados obtidos para o RSV, non concordan coa maioría de estudos que poñen de manifesto a relevancia deste composto polas súas propiedades antioxidantes e antiinflamatorias

Debido a que en lugar de mostrar unha redución na expresión da IL-1 $\beta$ , o RSV induciu, un notable aumento da expresión da IL-1 $\beta$ ; o que é similar ao que ocorre en determinados tipos celulares, como as células leucémicas humanas, nas que o RSV pode inducir a produción de ROS, mostrando unha función oxidativa dependendo da doses administrada(4,39), o que concorda coa indución da resposta inflamatoria nos resultados obtidos, xa que a liña celular THP-1, empregada para a obtención de macrófagos, é una liña leucémica humana(40,41).

Respecto ao segundo obxectivo centrado nas células sinoviais, anteriores traballos do noso grupo xa demostraron o efecto inflamatorio do estrés oxidativo sobre as células sinoviais pero neste traballo quixemos obter máis información acerca da implicación da disfunción mitocondrial na activación da resposta inflamatoria, mediada pola vía do inflamasona.

Os resultados acadados mostraron unha indución da resposta inflamatoria polo estímulo TNF- $\alpha$ , a cal aumentou significativamente a expresión da pro-IL-1 $\beta$  con respecto á basal en todos tempos de incubación. A combinación do TNF- $\alpha$  con PQ tamén induciu un aumento da expresión relativa de ARNm, se ben non mostrou unha diferenza significativa na expresión de pro-IL-1 $\beta$  con respecto á indución por TNF- $\alpha$ . Este aumento concorda con estudos que demostraron con anterioridade a relación entre o estrés oxidativo e o aumento da resposta inflamatoria (28,42).

Seguindo cos mediadores involucrados na vía inflamasona, de forma similar ao que sucede coa IL-1 $\beta$ , os resultados obtidos mostran o aumento da cuantificación relativa de pro-caspasa-1 tras a estimulación por TNF- $\alpha$ . Debido a función da caspasa-1 na secreción de IL-1 $\beta$ , o aumento da súa expresión ante o incremento do estrés oxidativo pode relacionarse ca indución da secreción de IL-1 $\beta$  como parte da resposta inflamatoria. Neste contexto, a caspasa-1 non so promove esta secreción, se non que está relacionada coa catalización do corte enzimático que da lugar as formas maduras de IL-1 $\beta$ . Sen embargo, a presenza de PQ non desencadea un aumento da cantidade deste marcador da inflamación. Isto parece descartar a presenza dunha sinerxía entre ambos estímulos, aínda que ambos son capaces de aumentar o estrés oxidativo. Tanto o TNF- $\alpha$  como o PQ foron usados por separado para inducir a resposta inflamatoria noutros traballos (44–46). En contraposición ao resto de marcadores inflamatorios, a expresión de NLRP3 non mostrou cambios significativos ante a presenza de TNF- $\alpha$  e PQ con respecto a expresión basal.

No referente ao efecto do RSV, este demostrou unha notable redución sobre a produción do mediador inflamatorio obxecto de estudo, especialmente en presenza de TNF- $\alpha$  + PQ, o que parece reforzar a evidencia da súa capacidade antioxidante e antiinflamatoria. En este sentido,

estudios anteriores xa remarcaron a capacidade do RSV para inhibir a produción de IL-1 $\beta$  nun modelo animal de AIA (43). Isto ocorre principalmente a través do bloqueo da actividade NF- $\kappa$ B, o cal regula a expresión da maior parte de xenes pro-inflamatorios. Así, o RSV impide a translocación ao núcleo de NF- $\kappa$ B e inhibe a ruta de activación mediada por TNF- $\alpha$  (4). Isto respalda a redución da expresión da IL-1 $\beta$  naquelas condicións en presenza de RSV, dado que unha das citoquinas pro-inflamatorias resultado da ruta de activación mediada por TNF- $\alpha$  é a IL-1 $\beta$ . Cabe destacar que na incubación a 12 horas, pese a redución da cuantificación relativa de pro-IL-1 $\beta$ , o efecto do RSV non foi estatisticamente significativo. Isto parece estar ligado á menor cantidade de pro-IL-1 $\beta$  acadada na indución da disfunción mitocondrial, tras unha incubación de 12 horas, aínda que é necesario realizar máis estudos que axuden a atopar unha explicación. Así mesmo, tamén se detectou unha redución significativa na cuantificación relativa de pro-caspasa-1 ante a presenza de RSV. Da mesma forma que no caso de IL-1 $\beta$ , a inhibición da acción de TNF- $\alpha$  sobre NF- $\kappa$ B conduce a unha menor expresión de mediadores pro-inflamatorios, como a caspasa-1 (4) e, consecuentemente, esta menor cantidade de caspasa-1 podería estar evitando a promoción da secreción e activación de IL-1 $\beta$ . Pola contra, a expresión na condición TNF- $\alpha$  +RSV non mostrou unha redución a 24 horas, ao contrario do que se esperaría. Tendo en conta os resultados do resto de incubacións, podería deberse a unha variación experimental, en especial ao ter en conta que en relación á condición con TNF- $\alpha$ +PQ+RSV pódese observar unha redución significativa da expresión de pro-caspasa-1.

Respecto a NLRP3, non se obtivo unha redución significativa da expresión relativa baixo os efectos do RSV, se non que esta presentou niveles similares ou incluso superiores á condición con TNF- $\alpha$ . Isto contrasta cos estudos sobre o efecto do RSV sobre NLRP3 en outros tipos celulares, onde si que se detectou unha diminución da expresión de NLRP3 e a activación do inflamasoma (25). Isto podería deberse a que a ruta que controla a activación de NLRP3 en sinoviocitos non se viu afectada pola presenza de RSV. Este composto actúa sobre a vía de sinalización de NF- $\kappa$ B mediada por TNF- $\alpha$ , inhibindo a indución da produción dos compoñentes do inflamasoma NLRP3 (4). Sen embargo, existe a posibilidade de que a expresión de NLRP3 este sendo activada pola presenza de DAMPs, actuando sobre a vía de sinalización de NF- $\kappa$ B ao degradar ao seu inhibidor, a kinasa I $\kappa$ B. Se ben diversos artigos trataron o uso do RSV como inhibidor da activación do inflamasoma NLRP3, existe unha falta de estudos sobre esta inhibición en sinoviocitos.

## 6. CONCLUSIONES.

Como conclusión xeral para este traballo:

A disfunción mitocondrial é clave na indución dos principais marcadores involucrados na resposta inflamatoria mediada pola vía inflamasoma: IL-1 $\beta$ , caspasa-1 e NLRP3 en dous dos tipos celulares con maior relevancia na patoloxía artrítica, monocitos/macrófagos e sinoviocitos pero, o tratamento co antioxidante resveratrol, unicamente foi capaz de prever a inflamación nas células sinoviais.

Como conclusións específicas:

- I. A indución dun escenario de estrés oxidativo polo estímulo LPS incrementa a os niveis de IL-1 $\beta$  na liña celular THP-1; sen embargo, a inhibición da vía do inflamasoma pola acción específica dos inhibidores MCC950 e AC-YVAD-CMK é capaz de revertir esta situación reducindo a concentración da IL-1 $\beta$  ante un aumento da produción de ROS. Sen embargo, os compostos antioxidantes, RSV e MitoTempo, non limitan a activación do complexo do inflamasoma nin a consecuente segregación de IL-1 $\beta$  na liña celular THP-1.
- II. A estimulación cos mediadores pro-inflamatorios/pro-oxidantes TNF- $\alpha$  e PQ induciu a expresión dos compoñentes do inflamasoma NLRP3: IL-1 $\beta$  e caspasa-1, demostrando a súa activación ante situacións de estrés oxidativo. Sen embargo, non se detectou un incremento destacable da expresión de NLRP3. Así mesmo, o tratamento preventivo con RSV reduce a expresión dos mediadores pro-inflamatorios caspasa-1 e IL-1 $\beta$ , pero amosa unha variación considerable na modulación de NLRP3.

Os resultados obtidos neste traballo permiten concluír que a disfunción mitocondrial e o consecuente aumento do estrés oxidativo posúen un papel central no desenvolvemento da inflamación ao regular a activación da vía do inflamasoma tanto en sinoviocitos como na liña celular THP-1. Do mesmo xeito, a inhibición desta vía reduce a expresión dos mediadores inflamatorios baixo condicións de estrés mitocondrial, ofrecendo unha diana para a elaboración de novos fármacos e tratamentos para a AR. Curiosamente, os estímulos antioxidantes non parecen exercer dita función sobre a liña THP-1, podendo ser consecuencia das propiedades oxidantes mostradas ao actuar sobre determinados tipos de células.

## 7. BIBLIOGRAFÍA.

1. Silva-Fernández L, Macía-Villa C, Seoane-Mato D, Cortés-Verdú R, Romero-Pérez A, Quevedo-Vila V, et al. The prevalence of rheumatoid arthritis in Spain. *Sci Rep* [Internet]. 2020 Dec 9 [cited 2022 Jul 12];10(1):21551 [9 p.]. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-76511-6>
2. Kurowska-Stolarska M, Alivernini S. Synovial tissue macrophages: Friend or foe? *RMD Open* [Internet]. 2017 Dec 6 [cited 2022 Jul 12];3(2):e000527 [10 p.]. Available from: <http://dx.doi.org/10.1136/rmdopen-2017-000527>
3. McInnes IB, Schett G. The pathogenesis of rheumatoid arthritis. *N Engl J Med* [Internet]. 2011 Dec 7 [cited 2022 Jun 27];365(23):2205–19. Available from: <https://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMra1004965>
4. Shakibaei M, Harikumar KB, Aggarwal BB. Resveratrol addiction: To die or not to die. *Mol Nutr Food Res* [Internet]. 2008 Dec 23 [cited 2022 Jul 5];53(1):115–28. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/mnfr.200800148>
5. Martini D. Health benefits of mediterranean diet. *Nutrients* [Internet]. 2019 Aug 5 [cited 2022 Jul 5];11(8):1802 [4 p.]. Available from: <https://www.mdpi.com/2072-6643/11/8/1802/htm>
6. Hernández-Hernández MV, Díaz-González F. Role of physical activity in the management and assessment of rheumatoid arthritis patients. *Reumatol Clin* [Internet]. 2017 [cited 2022 Jun 30];13(4): 214–20. Available from: <http://www.reumatologiaclinica.org/es-role-physical-activity-in-management-articulo-S1699258X1630016X>
7. Fournier C. Where do T cells stand in rheumatoid arthritis? *Jt Bone Spine*. 2005 Dec 1;72(6):527–32. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jbspin.2004.12.012>
8. Shegarfi H, Naddafi F, Mirshafiey A. Natural killer cells and their role in rheumatoid arthritis: Friend or foe? *ScientificWorldJournal* [Internet]. 2012 Apr 1 [cited 2022 Jul 5];2012: 491974 [10 p.]. Available from: <https://doi.org/10.1100/2012/491974>
9. Saha S, Shalova IN, Biswas SK. Metabolic regulation of macrophage phenotype and function. *Immunol Rev* [Internet]. 2017 Oct 13 [cited 2022 Jul 13];280(1):102–11. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/imr.12603>
10. Liu PS, Ho PC. Mitochondria: A master regulator in macrophage and T cell immunity. *Mitochondrion* [Internet]. 2017 Jul [cited 2022 Jul 13];41: 45-50. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1567724917302143>
11. Martinez FO, Sica A, Mantovani A, Locati M. Macrophage activation and polarization. *Front Biosci (Landmark Ed)* [Internet]. 2008 Jan 1 [cited 2022 Jul 9];13:453–61. Available from: <https://www.imrpress.com/journal/FBL/13/2/10.2741/2692>
12. Biniecka M, Kennedy A, Ng CT, Chang TC, Balogh E, Fox E, et al. Successful tumour necrosis factor (TNF) blocking therapy suppresses oxidative stress and hypoxia-induced mitochondrial mutagenesis in inflammatory arthritis. *Arthritis Res Ther* [Internet]. 2011 Jul 25 [cited 2022 Jul 13];13:R121 [9 p.]. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1186/ar3424>
13. Fearon U, Canavan M, Biniecka M, Veale DJ. Hypoxia, mitochondrial dysfunction and synovial invasiveness in rheumatoid arthritis. *Nat Rev Rheumatol* [Internet]. 2016 May 16 [cited 2022 Jul 13];12: 385–97. Available from: <https://www.nature.com/articles/nrrheum.2016.69>
14. McGarry T, Hanlon MM, Marzaioli V, Cunningham CC, Krishna V, Murray K, et al. Rheumatoid arthritis CD14+ monocytes display metabolic and inflammatory dysfunction, a

- phenotype that precedes clinical manifestation of disease. *Clin Transl Immunol* [Internet]. 2021 Jun 19 [cited 2022 Jul 13];10:e1237 [18 p.]. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1002/cti2.1237>
15. McGarry T, Biniecka M, Gao W, Cluxton D, Canavan M, Wade S, et al. Resolution of TLR2-induced inflammation through manipulation of metabolic pathways in Rheumatoid Arthritis. *Sci Rep* [Internet]. 2017 Feb 22 [cited 2022 Jul 13];7:43165 [13 p.]. Available from: <https://www.nature.com/articles/srep43165.pdf>
  16. Guo C, Fu R, Wang S, Huang Y, Li X, Zhou M, et al. NLRP3 inflammasome activation contributes to the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Clin Exp Immunol* [Internet]. 2018 Oct 19 [cited 2022 Jun 22];194(2):231–43. Available from: <https://academic.oup.com/cei/article/194/2/231/6411884>
  17. Kinne RW, Bräuer R, Stuhlmüller B, Palombo-Kinne E, Burmester GR. Macrophages in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* [Internet]. 2000 Apr 12 [cited 2022 Jul 8];2:189 [14 p.]. Available from: <https://arthritis-research.biomedcentral.com/articles/10.1186/ar86>
  18. Kremer JM, Westhovens R, Leon M, Di Giorgio E, Alten R, Steinfeld S, et al. Treatment of rheumatoid arthritis by selective inhibition of T-cell activation with fusion protein CTLA4Ig. *N Engl J Med* [Internet]. 2003 [cited 2022 Jul 8];349(20):1907–15. Available from: <https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/nejmoa035075>
  19. Stout RD, Suttles J. T cell signaling of macrophage function in inflammatory disease. [Internet]. *Front Biosci (Landmark Ed)* [Internet]. 1997 May 1 [cited 2022 Jul 8];2:d453–61. Available from: <https://www.imrpress.com/journal/FBL/13/2/10.2741/2692>
  20. Li J, Hsu HC, Mountz JD. Managing macrophages in rheumatoid arthritis by reform or removal. *Curr Rheumatol Rep* [Internet]. 2012 Aug 2 [cited 2022 Jul 8];14: 445–54. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11926-012-0272-4>
  21. Pap T, Müller-Ladner U, Gay RE, Gay S. Fibroblast biology: Role of synovial fibroblasts in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res* [Internet]. 2000 Jun 8 [cited 2022 Jul 4];2(5):361–7. Available from: <https://arthritis-research.biomedcentral.com/articles/10.1186/ar113>
  22. Cajas LJ, Casallas A, Medina YF, Quintana G, Rondón F. Pannus and rheumatoid arthritis: Historic and pathophysiological evolution. *Rev Colomb Reumatol (English Ed)*. 2019;26(2):118–28. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.rcreue.2018.10.005>
  23. Bottini N, Firestein GS. Duality of fibroblast-like synoviocytes in RA: Passive responders and imprinted aggressors. *Nat Rev Rheumatol* [Internet]. 2012 Nov 13 [cited 2022 Jul 5];9:24–33. Available from: <https://www.nature.com/articles/nrrheum.2012.190>
  24. Sun W, Ma J, Zhao H, Xiao C, Zhong H, Ling H, et al. Resolvin D1 suppresses pannus formation via decreasing connective tissue growth factor caused by upregulation of miRNA-146a-5p in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* [Internet]. 2020 Mar 27 [cited 2022 Jul 5];22(1):1–14. Available from: <https://arthritis-research.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13075-020-2133-2>
  25. Yang SJ, Lim Y. Resveratrol ameliorates hepatic metaflammation and inhibits NLRP3 inflammasome activation. *Metabolism*. 2014 May 1;63(5):693–701.
  26. Aggarwal BB, Shishodia S, Sandur SK, Pandey MK, Sethi G. Inflammation and cancer: How hot is the link? *Biochem Pharmacol*. 2006 Nov 30;72(11):1605–21.
  27. Raneros AB, Bernet CR, Flórez AB, Suarez-Alvarez B. An epigenetic insight into NLRP3 inflammasome activation in inflammation-related processes. *Biomedicines* [Internet]. 2021 Nov 4 [cited 2022 Jul 8];9(11),1614 [22 p.]. Available from: <https://doi.org/10.3390/biomedicines9111614>

28. López-Armada MJ, Fernández-Rodríguez JA, Blanco FJ. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in rheumatoid arthritis. *Antioxidants* [Internet]. 2022 Jun 12 [cited 2022 Jul 4];11(6):1151 [30 p.]. Available from: [/pmc/articles/PMC9220001/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/39220001/)
29. Chen Y, Zhou Z, Min W. Mitochondria, oxidative stress and innate immunity. *Front Physiol* [Internet]. 2018 Oct 18 [cited 2022 Jul 4];9:1487 [10 p.]. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphys.2018.01487/full>
30. Phull AR, Nasir B, Haq I ul, Kim SJ. Oxidative stress, consequences and ROS mediated cellular signaling in rheumatoid arthritis. *Chem Biol Interact*. 2018 Feb 1;281:121–36.
31. Ramil-Gómez O, Rodríguez-Carmona A, Fernández-Rodríguez JA, Pérez-Fontán M, Ferreiro-Hermida T, López-Pardo M, et al. Mitochondrial dysfunction plays a relevant role in pathophysiology of peritoneal membrane damage induced by peritoneal dialysis. *Antioxidants* [Internet]. 2021;10(3):1–14. Available from: <https://doi.org/10.3390/antiox10030447>
32. Riveiro-Naveira RR, Valcárcel-Ares MN, Almonte-Becerril M, Vaamonde-García C, Loureiro J, Hermida-Carballo L, et al. Resveratrol lowers synovial hyperplasia, inflammatory markers and oxidative damage in an acute antigen-induced arthritis model. *Rheumatol (Oxford)* [Internet]. 2016;55(10):1889–900. Available from: <https://academic.oup.com/rheumatology/article/55/10/1889/2196660>
33. O'Dell JR. Therapeutic strategies for rheumatoid arthritis. *N Engl J Med* [Internet]. 2004 Jun 17 [cited 2022 Jul 1];350(25):2591–602. Available from: <https://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMra040226>
34. Rodríguez F, Adriana J. Estudio de la activación de mecanismos de muerte celular programada inducida por el uso de resveratrol en un modelo de artritis inducida por antígeno (AIA).
35. Ma X, Xu S. TNF inhibitor therapy for rheumatoid arthritis. *Biomed Rep* [Internet]. 2013 Mar 1 [cited 2022 Jul 9];1(2):177–84. Available from: <http://www.spandidos-publications.com/10.3892/br.2012.42/abstract>
36. Vasanthi P, Nalini G, Rajasekhar G. Role of tumor necrosis factor-alpha in rheumatoid arthritis: A review. *APLAR J Rheumatol*. 2007 Dec 5 [cited 2022 Jul 9];10(4):270–4. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/j.1479-8077.2007.00305.x>
37. Davignon JL, Hayder M, Baron M, Boyer JF, Constantin A, Apparailly F, et al. Targeting monocytes/macrophages in the treatment of rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* [Internet]. 2012 Nov 29 [cited 2022 Jul 9];52(4):590–8. Available from: <https://academic.oup.com/rheumatology/article/52/4/590/1796189>
38. Ni B, Pei W, Qu Y, Zhang R, Chu X, Wang Y, et al. MCC950, the NLRP3 inhibitor, protects against cartilage degradation in a mouse model of osteoarthritis. *Oxid Med Cell Longev* [Internet]. 2021 Nov 3 [cited 2022 Jul 9];2021: 4139048 [14 p.]. Available from: <https://doi.org/10.1155/2021/4139048>
39. Miki H, Uehara N, Kimura A, Sasaki T, Yuri T, Yoshizawa K, et al. Resveratrol induces apoptosis via ROS-triggered autophagy in human colon cancer cells. *Int J Oncol* [Internet]. 2012 Apr 1 [cited 2022 Jul 13];40(4):1020–8. Available from: <http://www.spandidos-publications.com/10.3892/ijo.2012.1325/abstract>
40. Gatto F, Cagliani R, Catelani T, Guarnieri D, Moglianetti M, Pompa PP, et al. PMA-induced THP-1 macrophage differentiation is not impaired by citrate-coated platinum nanoparticles. *Nanomaterials* [Internet]. 2017 Oct 17 [cited 2022 Jun 24];7(10):332. Available from: <https://www.mdpi.com/2079-4991/7/10/332/htm>
41. Chanput W, Mes JJ, Wichers HJ. THP-1 cell line: An in vitro cell model for immune modulation approach. *Int Immunopharmacol* [Internet]. 2014 Aug 14 [cited 2022 Mar 15];23(1):37–45. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.intimp.2014.08.002>

42. Valcárcel-Ares MN, Riveiro-Naveira RR, Vaamonde-García C, Loureiro J, Hermida-Carballo L, Blanco FJ, et al. Mitochondrial dysfunction promotes and aggravates the inflammatory response in normal human synoviocytes. *Rheumatol (Oxford)* [Internet]. 2014 Jul 1 [cited 2022 Jul 5];53(7):1332–43. Available from: <https://academic.oup.com/rheumatology/article/53/7/1332/1794504>
43. Tyagi N, Singh R. Paraquat-induced oxidative stress and lung inflammation. In: Chakraborti S, Parinandi NL, Ghosh R, Ganguly NK, Chakraborti T, editors. *Oxidative Stress in Lung Diseases* [Internet]. Vol. 2. Singapore: Springer Nature Singapore; 2019 [cited 2022 Jul 9]. p. 245–70. Available from: [https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-981-32-9366-3\\_11](https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-981-32-9366-3_11)
44. Liu Z, Wang X, Wang Y, Zhao M. NLRP3 inflammasome activation regulated by NF- $\kappa$ B and DAPK contributed to paraquat-induced acute kidney injury. *Immunol Res.* 2017;65(3):687–98. 46.
45. Schädlich H, Ermann J, Biskop M, Falk W, Sperling F, Jüngel A, et al. Anti-inflammatory effects of systemic anti-tumour necrosis factor  $\alpha$  treatment in human/murine SCID arthritis. *Ann Rheum Dis* [Internet]. 1999 Jul 1 [cited 2022 Jul 5];58(7):428–34. Available from: <http://ard.bmj.com/content/58/7/428.short>
46. Fernández-Rodríguez JA, Almonte-Becerril M, Ramil-Gómez O, Hermida-Carballo L, Viñas-Diz S, Vela-Anero Á, et al. Autophagy Activation by Resveratrol Reduces Severity of Experimental Rheumatoid Arthritis. *Mol Nutr Food Res* [Internet]. 2021 Jan 1 [cited 2022 Apr 14];65(2):2000377. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/mnfr.202000377>