



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

Facultade de Ciencias

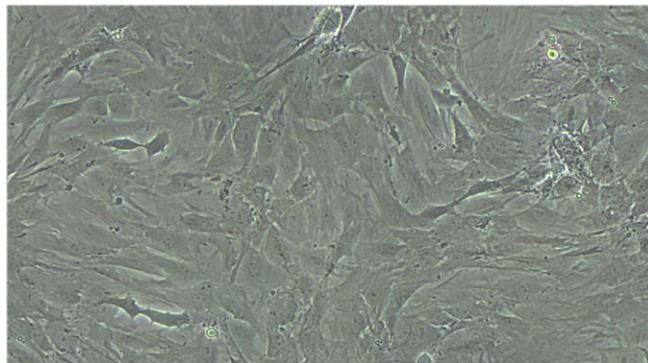
Grao en Bioloxía

Memoria do Traballo de Fin de Grao

**Regulación del flujo autofágico por resveratrol en
células sinoviales**

**Regulación do fluxo autofáxico por resveratrol en
células sinoviais**

**Regulation of autophagic flux by resveratrol in
synovial cells**



Ainoa López Novo

Curso: 2023-2024. Convocatoria: Junio

Director: Antonio Manuel Castro Castro

Directora: María José López Armada

ÍNDICE

Resumen/Resumo/Abstract	I
Palabras clave/Palabras chave/Keywords	II
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Artritis Reumatoide.....	1
1.1.1 Membrana sinovial.....	2
1.2 Flujo autofágico.....	4
1.2.1 Mediadores autofágicos	4
1.2.2 Mitofagia	6
1.3 Citocinas implicadas en el proceso inflamatorio.....	7
1.4 Resveratrol.....	8
2. OBJETIVOS.....	9
3. MATERIAL Y MÉTODOS	9
3.1 Obtención y procesamiento del material biológico	9
3.2 Células sinoviales	9
3.3 Estimulación.....	10
3.4 Extracción de la proteína y cuantificación.....	11
3.5 Western blot.....	11
4. RESULTADOS	13
4.1 Estimulación y Western blot.....	13
5. DISCUSIÓN.....	17
5.1 p62 y LC3-II	17
5.2 ULK-P, Beclin-1 y NIX dímero.....	19
6. CONCLUSIONES/CONCLUSIÓNS/CONCLUSIONS.....	20
7. BIBLIOGRAFÍA	21
ANEXO I.....	25
ANEXO II	26

Resumen

La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad autoinmune inflamatoria que afecta al 0,5-1% de la población mundial. Se caracteriza por la inflamación sinovial e hipertrofia, junto con la activación de diversas células inmunitarias e inflamatorias, que constituyen la sinovia, lo que finalmente daña el cartílago y el hueso adyacente. Esta enfermedad ha sido tratada históricamente con los fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad (FAME) sintéticos, a los que se les han unido en las tres últimas décadas los FAMEs biológicos o terapias dirigidas. Sin embargo, a pesar de los nuevos tratamientos, aún persisten un gran número de pacientes que no responden al tratamiento. Esto, junto con los efectos secundarios, determina que surjan nuevas alternativas farmacológicas, como el resveratrol, que es un antioxidante natural. Estudios previos en un modelo animal demostraron que el resveratrol reducía la gravedad de la enfermedad, activando la autofagia. Para profundizar en este proceso de autofagia se analizó la expresión proteica de distintos marcadores autofágicos como p62, LC3-II, ULK-P, Beclin-1 y NIX en sinoviocitos y su modulación por resveratrol en sinoviocitos.

Resumo

A artrite reumatoide (AR) é unha enfermidade autoinmune inflamatoria que afecta ao 0,5-1% da poboación mundial. Caracterízase pola inflamación sinovial e hipertrofia, xunto coa activación de diversas células inmunitarias e inflamatorias, que constitúen a sinovia, o que finalmente dana o cartílago e o óso adxacente. Esta enfermidade foi tratada historicamente cos fármacos antirreumáticos modificadores da enfermidade (FAME) sintéticos, aos que se lles uniu nas tres últimas décadas os FAMEs biolóxicos ou terapias dirixidas. Sen embargo, a pesar dos novos tratamentos, aínda persisten un gran número de pacientes que non responden ao tratamento. Isto, xunto cos efectos secundarios determina que surxan novas alternativas farmacolóxicas, como o resveratrol, que é un antioxidante natural. Estudos previos nun modelo animal demostraron que o resveratrol reducía a gravidade da enfermidade, activando a autofaxia. Para profundizar neste proceso de autofaxia analizouse a expresión proteica de distintos marcadores autofáxicos como p62, LC3-II, Beclin-1 e NIX en sinoviocitos e a súa modulación por resveratrol en sinoviocitos.

Abstract

Rheumatoid arthritis (RA) is an inflammatory autoimmune disease that affects 0.5-1% of the global population. It is characterized by synovial inflammation and hypertrophy, along with the activation of various immune and inflammatory cells that constitute the synovium, ultimately damaging the cartilage and adjacent bone. Historically, this disease has been treated with synthetic disease-modifying antirheumatic drugs (DMARDs), which have been joined in the last three decades by biological DMARDs or targeted therapies. However, despite new treatments, a significant number of patients still do not respond to treatment.

This, along with side effects, necessitates the emergence of new pharmacological alternatives, such as resveratrol, which is a natural antioxidant. Previous studies in an animal model demonstrated that resveratrol reduced the severity of the disease by activating autophagy. To delve deeper into this autophagy process, the protein expression of various autophagic markers such as p62, LC3-II, ULK-P, Beclin-1, and NIX was analyzed in synoviocytes, as well as their modulation by resveratrol in synoviocytes.

Palabras clave: artritis reumatoide, autofagia, mitofagia, mTOR, membrana sinovial, sinoviocito, TNF, *pannus*, resveratrol.

Palabras chave: artrite reumatoide, autofaxia, mitofaxia, mTOR, membrana sinovial, sinoviocito, TNF, *pannus*, resveratrol.

Keywords: rheumatoid arthritis, autophagy, mitophagy, mTOR, synovial membrane, synoviocyte, TNF, *pannus*, resveratrol.

1. INTRODUCCIÓN

En el presente estudio se va a realizar una caracterización mediante la técnica del Western blot de mediadores implicados en la regulación del flujo autofágico en células sinoviales estudiando asimismo la implicación del resveratrol en dicho proceso.

1.1 Artritis Reumatoide

La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad autoinmune inflamatoria que afecta al 0,5-1% de la población mundial. Se caracteriza por la inflamación sinovial e hipertrofia, junto con la activación de diversas células inmunitarias e inflamatorias, que constituyen la sinovia, lo que finalmente daña el cartílago y el hueso adyacente (**Figura 1**) (Tsaltskan & Firestein, 2022).

Además de las articulaciones, también hay otros órganos que podrían verse afectados, como los pulmones, la piel y el sistema vascular. En conjunto, la artritis reumatoide puede provocar dolor crónico, discapacidad y un aumento de la mortalidad que puede llegar a ser más del doble en pacientes con AR que en la población general (Masoumi et al., 2021) y esto parece estar ampliándose, actualmente se estima que en España más de 300.000 personas padecen AR (Fundación Española de Reumatología, s.f.)

Existen evidencias de que el desarrollo del estrés oxidativo o desequilibrio redox juega un papel crucial en la patogénesis de la enfermedad, al producir un nivel excesivo de diferentes especies reactivas de oxígeno (ERO). Esto origina un cambio de metabolismo en varios tipos de células de la AR, como los sinoviocitos, que utilizan la vía glucolítica para producir ATP en lugar de la vía más productiva de la fosforilación oxidativa (López-Armada et al., 2022).

Además de lo mencionado anteriormente, hay patologías que pueden agravar la diagnosis de la AR, como la periodontitis, las infecciones de pulmón, infecciones gastrointestinales, así como el ser una persona fumadora. También, se ve que hay un sesgo de género en la susceptibilidad de esta enfermedad, siendo las mujeres más afectadas que los hombres en una ratio de 3:1.

La AR ha sido tratada históricamente con los llamados fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad (FAME) sintéticos, a los que se les han unido en las tres últimas décadas los FAMEs biológicos o terapias dirigidas. Sin embargo, a pesar de los nuevos tratamientos, aún persiste un porcentaje importante de pacientes que no responden al tratamiento. Esto unido a los inevitables efectos secundarios determina que surjan nuevos objetivos farmacológicos (Tsaltskan & Firestein, 2022), como el resveratrol, que se va a abordar en este trabajo.

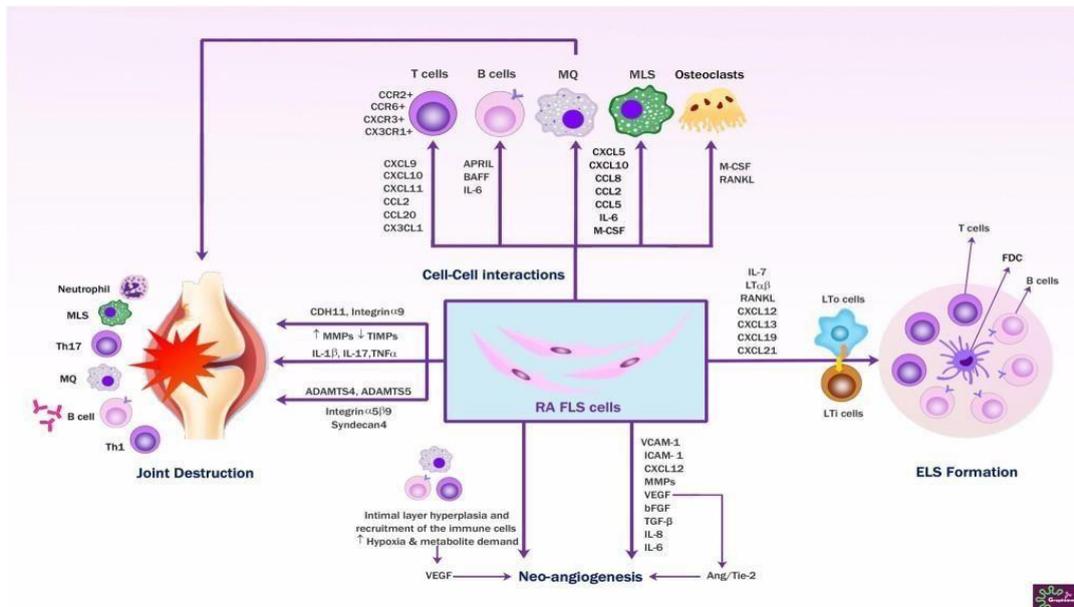


Figura 1: Desarrollo de la Artritis Reumatoide. Imagen tomada de Masoumi et al. (2021).

1.1.1 Membrana sinovial

La sinovia se caracteriza por una capa de células que contiene una mezcla de macrófagos derivados de la médula ósea y de células especializadas tipo fibroblastos (Edwards, 1994).

Hay dos importantes tipos de células en la sinovia: los sinoviocitos tipo A y tipo B. Los tipo A tienen naturaleza macrófagica (del inglés, macrophage like synoviocyte, MLS), que derivan de las líneas celulares de monocitos/macrófagos y los tipo B que son sinoviocitos de naturaleza fibroblástica (del inglés, fibroblast-like synoviocyte, FLS) (Masoumi et al., 2021).

Los FLS son células no inmunológicas, derivadas del mesénquima que desempeñan un papel importante en la fisiología de la sinovia al producir ciertos componentes del líquido sinovial y del cartílago articular, como la lubricina y el ácido hialurónico (Tsaltskan & Firestein, 2022). Estas células en una situación de inflamación crónica se pueden convertir en un fenotipo invasivo, inflamado e hiperplásico que produce la formación del *pannus*. El *pannus* está compuesto de diferentes tipos celulares, incluyendo monocitos, macrófagos, linfocitos, células endoteliales, osteoclastos y fibroblastos (Masoumi et al., 2021).

Las interacciones que presentan los FLS con las células inmunes o no inmunes permiten el desarrollo y la organización de estructuras terciarias como las estructuras linfoides ectópicas, órganos linfoides terciarios y la secreción de citoquinas proinflamatorias. Las citoquinas intervienen tanto en la interacción célula-célula, como en la interacción de las células FLS con otras células inmunes o no, lo que va a estimular y activar las células inmunitarias (Masoumi et al., 2021).

Los sinoviocitos tipo fibroblastos producen mediadores tanto anti-inflamatorios como proinflamatorios. Tienen un comportamiento tumoral y pueden migrar desde tejidos afectados a otros que no lo están, causando la sinovitis. Por ello, estas células están implicadas en varios procesos patológicos de la AR, como la formación del *pannus*, la sinovitis y la destrucción del hueso/cartílago. En concreto, podrían participar directamente en la destrucción del tejido y deformarlo, convirtiéndose los sinoviocitos de tipo fibroblasto normales en un fenotipo invasivo por la comunicación con las células T a través de quimiocinas, citoquinas, moléculas de adhesión y proteínas de membrana (Masoumi et al., 2021).

La sinovitis es causada por la influencia o activación o ambas de células mononucleares (incluidas células T, células B, células plasmáticas, células dendríticas, macrófagos y células de mastocitos) y por la angiogénesis. Se forma el *pannus*, luego el revestimiento se vuelve hiperplásico, lo que provoca que los sinoviocitos invadan tejidos adyacentes como huesos, cartílagos y tendones, resultando en daño del cartílago/hueso en pacientes con AR. Esta hiperplasia sinovial se define como un aumento de las células de la capa interna, que pasa de tener en condiciones normales de 1 a 3 capas de células a tener unas 15 capas de células (**Figura 2**). En este proceso es importante la interacción de las moléculas de adhesión, como las cadherinas y las integrinas que están implicadas en la formación y mantenimiento de capas sinoviales (Choy, 2012). Por otro lado, es importante destacar que a causa de la hiperplasia y el reclutamiento de células del sistema inmunológico como las células B y T, y macrófagos hacia la subcapa se induce un ambiente hipóxico, aumentándose la demanda de metabolitos en la sinovia, lo que potencia este proceso. La hiperplasia sinovial y la hipoxia conducen a la producción del factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) que es el mediador en la neoangiogénesis (Masoumi et al., 2021).

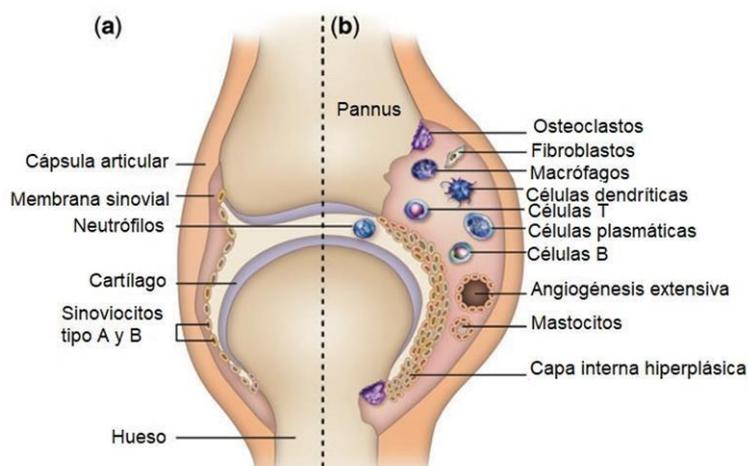


Figura 2: Visión de una articulación normal (a) y de una articulación afectada por AR (b). Imagen obtenida y modificada de Choy (2012).

1.2 Flujo autofágico

La naturaleza de la AR se desconoce pero se cree que uno de los posibles mecanismos afectados sea los niveles deficientes de autofagia. La autofagia se define como un proceso metabólico implicado en la degradación de componentes intracelulares vía maquinaria lisosomal (Vomero et al., 2022). Es provocada por el daño extracelular o se debe a un número excesivamente alto de orgánulos no funcionales (López-Armada et al., 2022). Aunque se describen varios tipos de autofagia en células de mamíferos, la macroautofagia es la más estudiada (ANEXO I) (Nakatogawa et al., 2009). Una desregulación del flujo autofágico, o autofagia, está implicada en procesos patogénicos inflamatorios severos como la AR (Vomero et al., 2018).

La quinasa mTOR es un factor clave de la autofagia. Si está activa se inhibe la autofagia y si está suprimida, la promueve. Hay 3 serin/treonina quinazas, entre ellas se encuentra ULK1 que forma un complejo con ULK2, Atg13 y la proteína FIP200. Además del complejo que forma ULK1 está el complejo VPS34 que contiene PI3K de clase III, Beclin-1, p150 y el gen Atg 14 que está asociado a la resistencia de la radiación ultravioleta y además es requerido para la inducción de la autofagia, ya que el Atg 14 va a activar a los otros genes Atg que intervienen en la formación del autofagosoma. Las proteínas Atg que participan en la autofagia son producidas por la transcripción y la traducción de genes Atg que se agregan para formar complejos funcionales específicos que se activan y reclutan en las membranas para iniciar la autofagia (Wang et al., 2020).

Además de la existencia de la macroautofagia o autofagia, existe otro tipo de autofagia selectiva, denominada mitofagia. Recibe este nombre debido a que el proceso actúa sobre la mitocondria, eliminando aquellas mitocondrias dañadas o que resulten innecesarias para la célula. Cuando se produce un daño mitocondrial, la proteína PINK va a reclutar a la ligasa PARKIN, que va a poliubiquitinar las proteínas de membrana de mitocondrias para reclutar otros adaptadores de la autofagia. Además, en condiciones de estrés oxidativo, BNIP3L/NIX va a ser directamente reclutado para inducir la formación del autofagosoma (Cell Signaling Technology, 2016).

1.2.1 Mediadores autofágicos

Para poder entender bien el funcionamiento del proceso autofágico se va a empezar por hablar del complejo mTOR. Existen dos complejos distintos mTORC1 (cuya proteína accesoria clave es RAPTOR) y mTORC2 (cuya proteína clave es RICTOR), este trabajo se va a centrar en mTORC1 (**Figura 3**).

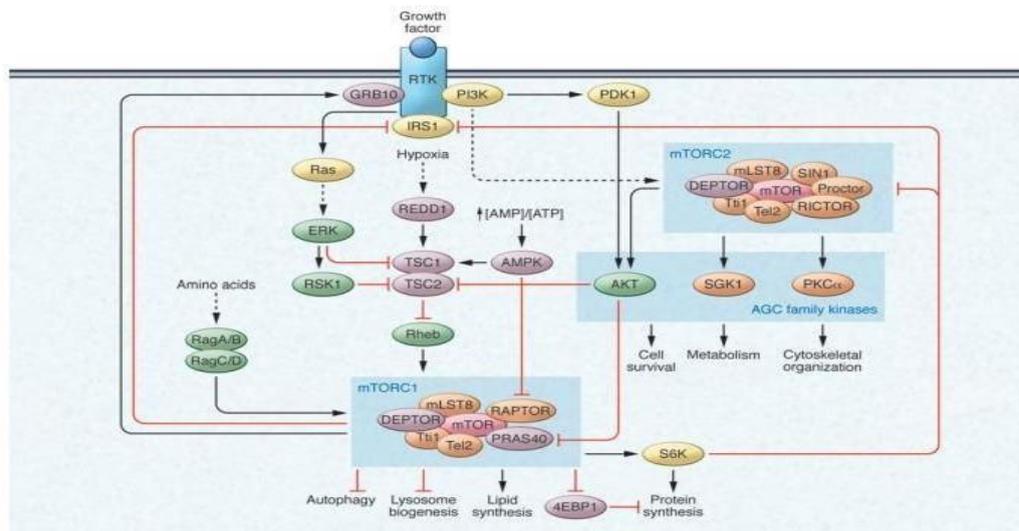


Figura 3: Esquema de los dos complejos de mTOR (mTORC1 y mTORC2). Imagen tomada de Kim & Guan (2015).

mTORC1 es una “llave maestra” para la mayoría de los procesos energéticos de la célula, impulsando el crecimiento celular y construyendo biomasa celular en casos de insuficiencia de nutrientes y, a la inversa, permitiendo el reciclaje autofágico de componentes celulares ante la limitación de nutrientes. Por tanto, se puede decir que una de las funciones bien establecidas de mTORC1 es la de promover el metabolismo celular anabólico para promocionar los componentes básicos necesarios para el crecimiento y proliferación celular mencionados anteriormente. Integra varios estímulos y redes de señales para estimular la síntesis de proteínas, lípidos, nucleótidos y bloquear procesos catabólicos. Un buen regulador de mTOR (aguas arriba) es la vía de señalización del factor de crecimiento PI3K/AKT. Diversos factores de crecimiento como la insulina e IGF (Factor de Crecimiento de la Insulina) activan receptores de quinasa y, por lo tanto, activa el eje PI3K/AKT. AMPK es un sensor de los niveles celulares y es activado por la relación AMP/ATP. AMPK fosforila directamente RAPTOR, lo que provoca una disminución de la actividad de mTOR a través de la inhibición alostérica. Se ha observado que bajos niveles de oxígeno celular también inhiben mTORC1 al regular positivamente la respuesta a un daño del ADN que puede llegar a modular la actividad de TSC2 para inhibir mTORC1.

La regulación de la autofagia por mTORC1 es la mayor digestión celular que elimina macromoléculas y orgánulos dañados. La mayoría de todas las condiciones de inducción de autofagia, como la privación de nutrientes o factores de crecimiento y la disminución de los niveles de energía celular inhiben la actividad de mTORC1. Esto sugiere un acoplamiento estrecho e inverso entre la inducción de la autofagia y la activación de mTORC1. La regulación de la autofagia por mTORC1 puede ser a través de dos complejos, uno el complejo ULK y el otro el complejo VPS34, ambos complejos se van abordar en este trabajo por estar relacionados con ULK1 (proteína quinasa relacionada con el proceso autofágico) y con Atg14, respectivamente. El complejo mTORC1 y

ULK1 (activada por AMP) regulan las etapas tempranas y tardías de la autofagia (Jia et al., 2023).

El inicio de la autofagia por ULK está regulado recíprocamente por mTORC1 y AMPK en respuesta a cambios dinámicos en los nutrientes celulares y los niveles de energía. AMPK y mTORC1 también regulan el complejo VPS34 (**Figura 4**), la asociación entre este complejo y Atg14 está implicado en la regulación autofágica. mTORC1 fosforila Atg14 en VPS34 e inhibe la actividad de la quinasa lipídica VPS34, siendo esta otra vía de inhibición de la autofagia (Kim & Guan, 2015). VPS34 es una subunidad catalítica del complejo PI3K de clase III que fosforila el fosfatidilinositol 3-fosfato promoviendo la autofagia (Jia et al., 2023).

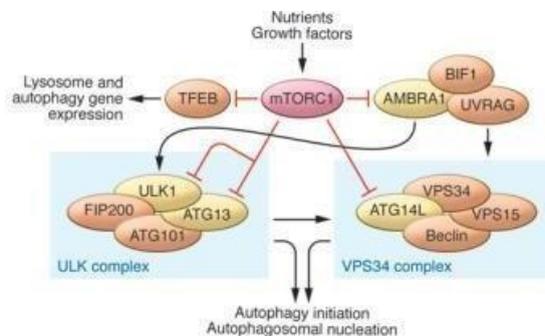


Figura 4: Regulación de la autofagia por el complejo mTORC1, donde se observan los complejos indicados, el ULK y el VPS34. Imagen tomada de Kim & Guan (2015).

mTORC1 bloquea la autofagia mediante inhibición directa de los primeros pasos del proceso de control de la capacidad degradativa lisosomal de la célula mediante la inhibición de la transactivación de genes que codifican factores estructurales, reguladores y catalíticos. Una de las dianas de mTORC1 en el citoplasma de lisosomas es ULK1 (Jia et al., 2023).

1.2.2 Mitofagia

La mitocondria es la “central energética” de la célula. Se encarga de producir energía en forma de ATP y está implicada en diversos procesos celulares. La disfunción de las mitocondrias está correlacionada con el daño celular presente en las enfermedades degenerativas y autoinmunes, como la AR. Por tanto, es muy importante que se mantenga la homeostasis mitocondrial. La mitofagia es una autofagia selectiva de la mitocondria que juega un papel importante en el mantenimiento de dicha homeostasis. Se han encontrado varios mecanismos y estímulos que inducen a la mitofagia. En general, la mitofagia se puede dividir en vía dependiente o independiente de PRKN (proteína ubiquitina ligasa PARKIN) (**Figura 5**) (Sun et al., 2021).

La vía mejor conocida de la mitofagia ha sido estudiada en células de mamíferos y está mediada por PTEN inducido por la quinasa 1 (PINK1) y PARKIN (Wang et al., 2020). PARKIN es una ligasa ubiquitina E3 y es reclutada por PINK1 en mitocondrias disfuncionales con una pérdida de potencial transmembrana (Marinkovic & Novak, 2021).

La vía independiente de PARKIN es llevada a cabo por receptores de proteínas, entre los que destaca el receptor BNIP3/NIX, donde sirve como receptor de la mitofagia en células en desarrollo o en condiciones patológicas. El proceso por el que actúa BNIP3/NIX es un proceso sin ubiquitinización (Sun et al., 2021).

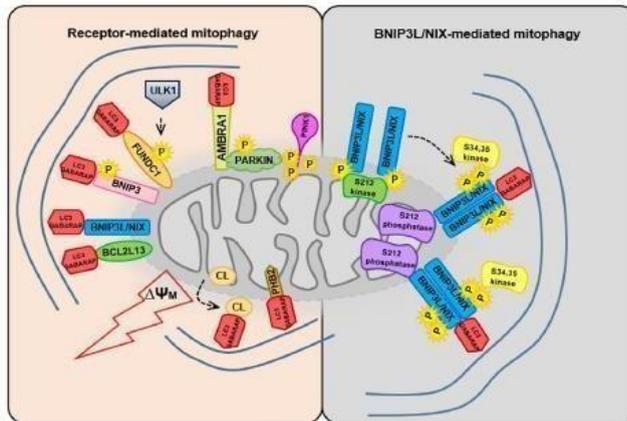


Figura 5: Esquema que representa los mecanismos moleculares de la mitofagia mediada por receptores, como se describe en detalle en la parte izquierda, y también puede estar mediada por BNIP3/NIX, como se explica en la parte derecha. Imagen tomada de Marinkovic & Novak (2021).

Parece haber una relación entre la baja cantidad de BNIP3 y la menor actividad autofágica. Sin embargo, el aumento de BNIP3 relacionado con el control de la mitofagia aún no está claro. En mamíferos BNIP3 forma un homómero u homodímero, pero no están claras las contribuciones del monómero o del homodímero a la mitofagia (Wu et al., 2021). La activación de la mitofagia puede desencadenarse por condiciones de estrés o por eliminación programada de las mitocondrias. La mitofagia inducida por el estrés se activa por la vía de PARKIN mientras que la que se da por eliminación programada se debe a los receptores como BNIP3/NIX (Marinkovic & Novak, 2021).

1.3 Citocinas implicadas en el proceso inflamatorio

Las citocinas son proteínas o glucoproteínas de bajo peso molecular (<30kDa) con una vida media corta, producidas principalmente por células del sistema inmunológico. Entre las citocinas que están implicadas en procesos inflamatorios como la AR, se encuentran el factor de necrosis tumoral alfa (TNF α), que es objeto de estudio en este trabajo, y la interleucina 1 beta (IL-1 β) (Yan et al., 2015).

Estos mediadores van a ser producidos por diferentes tipos celulares presentes en la membrana sinovial con AR. Mientras que el factor TNF α es un estímulo importante para las células productoras de mediadores inflamatorios, IL-1 β media la destrucción del cartílago y del hueso.

La IL-1 β es un miembro clave de las interleucinas 1L que median las respuestas inflamatorias a través del receptor 1L-1. Si se da estimulación con activadores NLRP3 se observa un aumento en la secreción de la IL-1 β en macrófagos con deficiencia de autofagia/mitofagia paralela a la acumulación de mitocondrias dañadas.

La reducción de la producción de mtROS o la eliminación de mitocondrias despolarizadas conduce a un cese de la secreción excesiva de interleucina beta. La mitofagia puede representar un mecanismo antiinflamatorio intrínseco de las células al restringir la producción excesiva de IL-1 β . El control de mitocondrias disfuncionales puede vincular la mitofagia con otras citocinas inflamatorias. En ausencia de autofagia, la liberación de ADN mitocondrial conduce a la producción mejorada transcripcionalmente de múltiples citoquinas inflamatorias incluidas el factor de necrosis tumoral TNF α (Xu et al., 2020). TNF α es una citoquina proinflamatoria que juega un papel clave en enfermedades inflamatorias (Malaviya et al., 2017). Se sabe que la autofagia está implicada en la presentación de antígenos, por tanto, se ha demostrado que el TNF activa la mitofagia para la degradación específica de las proteínas mitocondriales en macrófagos. Diversos estudios realizados recientemente destacan el papel fundamental de la mitofagia en la regulación de la producción de citoquinas inflamatorias, homeostasis y diferenciación de las células inflamatorias correlacionando con la patogénesis de enfermedades autoinflamatorias a múltiples niveles (Xu et al., 2020).

1.4 Resveratrol

Ante el auge que tuvo el desarrollo de nuevos tratamientos para la AR, se llevó a cabo la aplicación del resveratrol.

El resveratrol (3,4',5-trihydroxy-trans-stilbene) fue aislado por primera vez en 1939 por Takaoka de *Veratrum grandifolium* (**Figura 6**) (Pezzuto, 2019). Se trata de un compuesto polifenólico que también se encuentra en numerosos productos naturales como la uva y sus derivados como el vino tinto, la mora, los frutos secos. Su isómero trans es la forma más común y estable del resveratrol, y biológicamente activa (**Figura 7**).

Tiene propiedades antiinflamatorias, antioxidantes y antienvjecimiento. Además, presenta efectos positivos terapéuticos en enfermedades autoinmunes, como la AR (Shaito et al., 2020).

Hay evidencias de que el resveratrol suprime la proliferación y supervivencia celular inducidas por BAFF (factor activador de células B) de manera que promueve el flujo autofágico y la autofagia lo cual está asociado con su inhibición vía AKT/mTOR en linfocitos B normales y neoplásicos. Se puede decir que el resveratrol induce la autofagia inhibiendo la vía mTOR ULK1 (Park et al., 2016).



Figura 6: Imagen de la planta *Veratrum grandifolium*. Imagen tomada de "Veratrum" (2024).

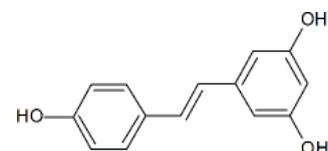


Figura 7: Imagen de la estructura del resveratrol. Tomada de Pezzuto (2019).

En este sentido, distintos estudios en modelos animales de AR han demostrado que el resveratrol suprimió notablemente los signos patológicos de AR, incluyendo la infiltración sinovial de células inflamatorias, el estrés oxidativo, la hiperplasia sinovial y la neovascularización en los tejidos sinoviales.

2. OBJETIVOS

Los principales objetivos planteados para el presente estudio son:

- Cuantificar la expresión de diferentes mediadores autofágicos como ULK- P, p62, NIX, LC3-II y Beclin-1 mediante Western blot.
- Evaluar el posible efecto protector del antioxidante natural resveratrol sobre el flujo autofágico en un contexto inflamatorio inducido por la inflamación con la citocina TNF α .

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 Obtención y procesamiento del material biológico

Se recogieron muestras de tejido sinovial de pacientes que han sido sometidos a cirugía de reemplazo de rodilla o cadera en el Hospital Universitario de A Coruña. Además de los cultivos de células sinoviales humanas, se emplearon para el presente trabajo cultivos de células sinoviales de ratas.

Las células se conservan mediante criopreservación, congelándose en nitrógeno líquido a temperaturas muy bajas (-196°C). Para ello, se añadió un preparado con medio DMSO (dimetilsulfóxido) (20%), RPMI (40%) y Suero bovino fetal (SBF) (40%). El DMSO se utiliza como criopreservante y como anticongelante, evitando que se formen cristales de hielo, además, como es tóxico, es importante añadir suero para reducir la toxicidad.

Todos los estudios se realizaron de acuerdo con la Ley 14/2007 de Investigación Biomédica, cumpliendo con los requisitos éticos de la Declaración de Helsinki y aprobados por el Comité Ético de Investigación de Galicia. Se ha obtenido el consentimiento informado por escrito de todos los pacientes donantes de muestras sinoviales y todas las muestras se codificaron para ser tratadas de manera anónima.

La obtención de muestras de tejido sinovial de ratas se realizó según la ley española vigente (RD53/2013) / (RD118/2021), que modifica el Real Decreto 53/2013, de 1 de febrero, que establece las normas aplicables para proteger los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia.

3.2 Células sinoviales

Se van a utilizar células sinoviales de humanos y de ratas. La única diferencia es el medio de cultivo, que en el caso de células sinoviales humanas es el

medio RPMI 20% SBF + insulina 0,12UI/ml, 100UI/ml penicilina, 100µg/ml estreptomicina (Gibco), y en el caso de células sinoviales de ratas es el medio RPMI 10% SBF. El resto del procedimiento experimental es el mismo para ambas células.

Las células sinoviales que estaban preservadas en nitrógeno líquido se descongelan y se añade medio RPMI (Corning, Manassas, VA, EE. UU.) al 10 % de SBF con la Pipeta Pasteur con precaución, y al mismo tiempo que se añade el medio se va retirando al otro vial. De esta manera, se evita que las células sufran un choque térmico y se reduce el efecto tóxico del DMSO.

Luego, se centrifugan a 1500 rpm durante 5 minutos, se decanta y se resuspenden en 7-8 ml de medio RPMI 10% SBF activado y se dejan en una placa en cuarentena para pasar la prueba de micoplasma.

Una vez que las células han alcanzado la confluencia se realiza un pase (tripsinización). Primero, se retira el medio que tenían las células y se añaden 5 ml de tampón salino para lavar los restos de suero. Luego se añaden 3 ml de tripsina para romper los enlaces de arginina y lisina de las membranas celulares. Se incuban las placas a 37°C durante 5 minutos. Tras el período de incubación, la tripsina se inactiva añadiendo 3 ml de medio RPMI al 10% de suero bovino fetal. Se recogen las células y se centrifugan a 1500 rpm durante 5 minutos. Tras decantarlo, queda el pellet, que se va a resuspender en 5 ml de medio RPMI al 10% de suero bovino fetal para luego realizar el conteo de las células en la cámara Neubauer.

Tras contar las células, se siembran el número de células necesario en 2 ml por pocillo de 6 y en espiral para distribuir las uniformemente y luego se agita en cruz.

3.3 Estimulación

Antes de estimular las células, se deplecionan, retirando el medio RPMI 10% SBF activado y añadiendo 1 ml de medio RPMI 0,5% a cada pocillo, y se incuban en la estufa a 37 °C durante 24 h.

Para llevar a cabo la estimulación, se emplean los siguientes estímulos: rapamicina, cloroquina, TNF y resveratrol. Se van a realizar diferentes diluciones en función de la concentración a la que se encuentre cada estímulo, como se indica en el ANEXO II A.

Se realizaron dos experimentos, en el primero se utilizó una placa de 6 pocillos, en la que se añadieron los siguientes estímulos: basal, TNF, cloroquina, rapamicina, TNF + cloroquina y TNF + rapamicina. En el segundo experimento se realizaron 8 condiciones, ya que se les sumó dos condiciones: resveratrol y TNF + resveratrol.

En primer lugar, se añaden los estímulos de rapamicina, cloroquina y resveratrol, ya que tienen que incubarse en la estufa a 37°C durante 1 h.

Posteriormente, se añade el TNF en las condiciones correspondientes.

Por último, después de añadir los estímulos en los respectivos pocillos, se incuban en la estufa durante 24 h. En el caso de las células sinoviales de ratas, el tiempo de incubación se redujo a 18 h para reducir el efecto tóxico de la cloroquina.

3.4 Extracción de la proteína y cuantificación

Para extraer la proteína, primero se prepara un tampón de lisis, cuya composición se indica en el ANEXO II B. En el momento de su uso es necesario añadir por cada 1000 µl de tampón de lisis, 10 µl de PMSF y 10 µl de cóctel de inhibidores. En nuestro caso, se necesitaron 320 µl de tampón de lisis, 3,2 µl de PMSF, 3,2 µl de cóctel de inhibidores, para los 6 pocillos y 400 µl de tampón de lisis, 4 µl de PMSF y 4 µl de cóctel de inhibidores para los 8 pocillos, pero se prepara algo más para luego realizar la medición de la proteína.

A continuación, se elimina el medio que contenían los pocillos y se añade 1 ml de medio salino a cada pocillo para lavarlos. Posteriormente, se retira el medio salino de los pocillos y se añaden 40 µl de tampón de lisis en cada pocillo. Luego, se “scrapea” o se raspa para facilitar mecánicamente la lisis celular y recoger la lisis celular que contiene las proteínas a un tubo eppendorf. El siguiente paso consiste en hervir las muestras con el tampón de lisis en un Termoblock a 100°C durante 5 minutos para desnaturalizar las proteínas. Es imprescindible pinchar la tapa de los eppendorfs con una aguja para evitar que salte.

Por último, se centrifugan a 13000 rpm a 4°C durante 10 minutos. Y se cuantifica la proteína en el espectrofotómetro *NanoDrop ND-1000* (Nanodrop, EE. UU.), midiendo la absorbancia a 280 nm. Para ello, primero se añade 2 µl de agua en el Nanodrop para calibrarlo y luego se añade 2 µl de tampón de lisis para hacer el blanco, y por último, se van añadiendo 2 µl de cada una de las muestras.

3.5 Western blot

Se cuantificó la expresión de diferentes mediadores autofágicos como ULK1, ULK-P, p62, NIX, LC3-I, LC3-II, Beclin-1 mediante Western blot. Se trata de un método que permite identificar y cuantificar una proteína específica de un extracto de células o tejido previamente lisados. En primer lugar, se separan las proteínas desnaturalizadas mediante electroforesis en gel y luego se transfieren a una membrana que posteriormente se incubará con el anticuerpo específico que permite detectar la proteína de estudio. De esta manera, se puede detectar el tamaño y la cantidad de proteínas que hay en cada muestra.

Como las proteínas que queríamos detectar tenían un tamaño molecular muy diferentes, realizamos 2 geles con un porcentaje de acrilamida diferente para cada uno de los experimentos. En los geles cabe distinguir una fase inferior (*running fase* o gel separador) en nuestro caso del 12% y 7,5% de acrilamida, y

una superior (*stacking fase* o gel concentrador) al 4%.

Una vez realizados los geles, se preparan las muestras. Para ello, primero, se hace la mezcla de laemmlí y β -mercaptoetanol en una proporción 1:10 (90 μ l de tampón de carga azul de laemmlí y 10 μ l de β -mercaptoetanol). El laemmlí permite ver dónde está el frente y el β -mercaptoetanol desnaturaliza las proteínas y de esta manera, las proteínas se separan por su tamaño. Luego, se cargan 25 μ g de cada una de las muestras a las que se les añade 1/3 de su volumen de la mezcla anterior y se hierven a 95°C 5 minutos para luego enfriarlas a 4°C durante 15 minutos. Posteriormente se cargan las muestras en el gel y se aplica una corriente de 100 V durante 20 minutos para el *stacking* para después aumentar el voltaje a 120 V durante 1h. Una vez que el frente de las muestras ha alcanzado la parte final del gel, se transfiere a una membrana PVDF durante 40 minutos a 20 V, y después, se realiza una tinción Ponceau para verificar que se ha realizado correctamente la transferencia y conocer donde estaban las proteínas, de esta manera, se puede cortar la membrana, ya que los diferentes anticuerpos (ANEXO II C) necesitaban ser bloqueados en diferentes soluciones de bloqueo (5% de leche o BSA). Después de 1h de incubación en la solución de bloqueo correspondiente, se añade al fragmento superior de la membrana original correspondiente al gel 12%, que se encontraba en una solución al 5% de BSA, el anticuerpo p62 (1:500) (*Cell Signaling*, EE. UU.). Mientras, a la parte inferior, que se bloqueó en una solución al 5% leche, se le añadió el anticuerpo de LC3 (1:700) (*Cell Signaling*). Por otra parte, en la membrana del gel de 7,5%, después de 1 h de bloqueo en 5% BSA, se añade a la parte inferior el anticuerpo NIX (1:1000) (*Cell Signaling*). Se dejan las membranas incubando en la cámara de 4°C durante toda la noche en movimiento. A la mañana siguiente, tras realizar 3 lavados de 5 minutos cada uno en tampón de lavado 1X (ver composición en ANEXO II D), se añade el anticuerpo secundario anti-conejo (1:4000) (Abcam, Reino Unido) en las membranas (ANEXO II E). Se vuelve a lavar cada vez, con tampón de lavado y luego se revela, usando el kit *Luminata Classico Western HRP Substrate* (Millipore, EE. UU.). Se trata de un kit de revelado por quimioluminiscencia, que reacciona con la enzima peroxidasa de rábano (del inglés, Horseradish peroxidase, HRP) unida al anticuerpo secundario, produciendo una reacción que emite una señal a 428 nm, posteriormente detectada por una cámara de revelado Amersham Imager 600 (Cytiva, Japón). A continuación, se volvieron a bloquear las membranas en BSA 1 h, para añadir los siguientes anticuerpos. En la membrana del gel 12% se añade el anticuerpo de ULK-1 (1:1000) (*Cell Signaling*) y en la otra membrana del gel 7,5%, en el fragmento superior se añade el anticuerpo ULK-P (1:1000) (*Cell Signaling*) y en el fragmento inferior se añade el anticuerpo Beclin-1 (1:500) (*Cell Signaling*). Luego, se dejaron las membranas incubando en la cámara de 4°C durante toda la noche. A la mañana siguiente, después de haber realizado 3 lavados de 5 minutos cada uno, se añade el anticuerpo secundario anti-conejo (1:4000) (Abcam, Reino Unido) en las membranas. Se lavan otra vez las membranas 3 veces, 5 minutos

cada vez y luego se revelan en la cámara de revelado de quimioluminiscencia. Finalmente, como control de carga, se emplea el anticuerpo tubulina (1:5000) (Sigma-Aldrich, EE. UU.), que es el único anticuerpo que se incubó con el anticuerpo secundario anti- ratón (ANEXO II E).

4. RESULTADOS

4.1 Estimulación y Western blot

Tras estimular las células sinoviales humanas se obtuvieron los siguientes resultados reflejados en la **Tabla 1**. En el caso del estímulo de cloroquina se puede observar que hay valores de concentración de proteínas muy bajos, con una ratio 260/280 muy alto, de 4,87 y 4,62. Aunque por lo general, no se ha obtenido ningún valor óptimo que esté entre 1,7 y 2,3, y esto se puede deber a que tenemos concentraciones de proteína muy pequeñas. Como hay concentraciones de proteína muy pequeñas, no pudimos obtener los 15 µg mínimo que necesitamos para poder realizar el Western blot. Por este motivo, y dada la dificultad que teníamos en obtener células humanas, se decidió realizar los siguientes experimentos en células sinoviales de rata.

Tabla 1: Resultados de los estímulos empleados en las células sinoviales humanas. Se representan los valores de ratio 260/280 y de concentración (mg/ml).

Muestra	Ratio 260/280	Concentración mg/ml
Basal	1,50	0,32
TNF	1,46	0,46
Cloroquina	4,87	0,19
Rapamicina	1,18	1,43
TNF+Cloroquina	4,62	0,27
TNF+Rapamicina	1,13	0,73

En comparación con los resultados de células sinoviales humanas, en el experimento realizado con células de rata se ve que hay mayor concentración de proteína en todos los estímulos. En la muestra basal hay mayor concentración de proteína, que en presencia de los estímulos. Además, con respecto a la ratio 260/280, hay valores óptimos, como 1,78 y 1,75 en los estímulos que tienen cloroquina, y en el resto por lo general, los valores rondan 1,50. Por lo que, no hay valores tan disparados como en las células sinoviales humanas.

Tabla 2: Resultados de los estímulos en las células sinoviales de ratas. Se representan los valores de ratio 260/280 y de concentración (mg/ml).

Muestra	Ratio 260/280	Concentración mg/ml
Basal	1,53	6,03
TNF	1,52	4,85
Cloroquina	1,78	3,93
Rapamicina	1,55	4,93
TNF + Cloroquina	1,75	4,99
TNF + Rapamicina	1,53	4,87

Cuando se realizó un segundo experimento, la concentración y pureza de los extractos fue similar al experimento anterior (**Tabla 3**). Se puede ver en comparación con el experimento anterior que no existen grandes diferencias con respecto a los valores de ratio 260/280 y de la concentración de proteína con los diferentes estímulos. Al calcular la media de la concentración de proteína con los diferentes estímulos, se puede comprobar que no hay una diferencia notable, puesto que la media de la concentración de proteínas varía entre un 5,5 y un 4,9 en ambos experimentos. Lo que se observa en común es que la concentración de proteína en presencia de cloroquina es bastante baja.

Tabla 3: Resultados de los estímulos en las células sinoviales de ratas. Se representan los valores de ratio 260/280 y de concentración (mg/ml).

Muestra	Ratio 260/280	Concentración mg/ml
Basal	1,49	5,70
TNF	1,51	6,79
Cloroquina	1,97	3,87
Rapamicina	1,49	7,09
TNF + Cloroquina	1,96	3,94
TNF + Rapamicina	1,53	5,94
Resveratrol	1,53	5,85
TNF + Resveratrol	1,58	5,56

A continuación, se muestran las imágenes obtenidas tras realizar los Western blot y el resultado de la cuantificación de las bandas obtenidas para cada una de las proteínas y que fueron ajustadas empleando el programa ImageJ. En primer lugar, cuantificamos la expresión proteica de p62 y LC3-II. Como estímulo positivo de inducción de autofagia se empleó la rapamicina, un potente inhibidor de mTOR. La cloroquina se empleó como inhibidor de la degradación

de los lisosomas, lo que permite evaluar la acumulación de autofagosomas. Y por último, el TNF, mediador inflamatorio cuya acción queremos evaluar.

Tras realizar la media de la cuantificación de los dos experimentos, los resultados obtenidos se muestran en la **Figura 8**.

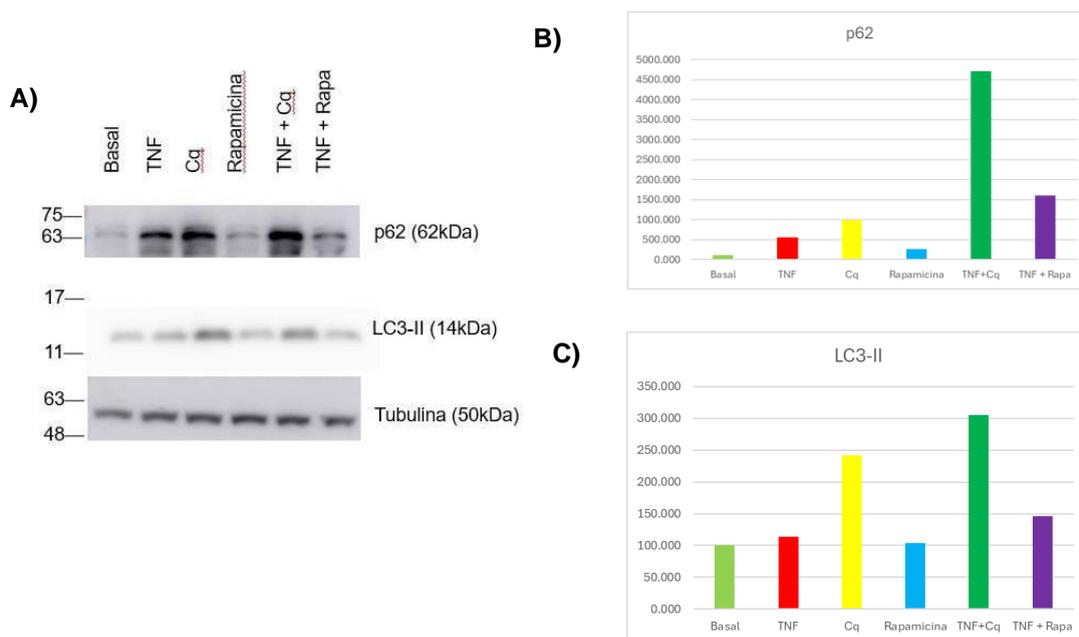


Figura 8. Expresión proteica de p62 y LC3-II en sinoviocitos de rata. Células sinoviales de rata confluentes, en placas de 6 pocillos, previamente estimuladas con un inhibidor (cloroquina) o un inductor (rapamicina) de la autofagia se estimularon durante 18 h en presencia o no de TNF α . **(A)** Imagen representativa de uno de los geles. **(B)** y **(C)** Representación gráfica de la cuantificación de las bandas, p62 y LC3-II, respectivamente.

En condiciones basales hay una débil expresión de p62, pero en presencia de TNF, como inhibe la degradación lisosomal de los autofagosomas, la expresión de p62 aumenta y al igual que la cloroquina también inhibe la fusión del autofagosoma con el lisosoma, su expresión es mayor, porque se está acumulando. Por tanto, en presencia de ambos estímulos, cloroquina y TNF, la expresión de p62 es mayor, ya que ambos están inhibiendo la última fase de la autofagia. Por otra parte, como la rapamicina es un regulador positivo de la autofagia al inhibir mTOR, entonces la expresión de p62 es menor, y parece que se está degradando al producirse la autofagia. Algo similar pasa con TNF + rapamicina, que se está induciendo la autofagia y en consecuencia la acción de TNF no está siendo efectiva, en presencia de la rapamicina.

En relación a LC3-II, que es la forma lipídica y activa de LC3. En presencia de cloroquina, al parar la autofagia, LC3-II se acumula. La cloroquina junto con el

estímulo TNF, la acumulación de LC3-II es mayor, parece que el TNF está inhibiendo la degradación lisosomal, al actuar de forma sinérgica con cloroquina. Por el contrario, con rapamicina, parece que se produce una autofagia efectiva, ya que la expresión de LC3-II es menor y por lo tanto, se está consumiendo y lo mismo pasa junto con el TNF.

También se investigó la modulación de otros mediadores implicados en el flujo autofágico como la forma fosforilada de ULK (ULK-P), Beclin-1 y el receptor de mitofagia NIX, cuyos resultados se muestran en la **Figura 9**.

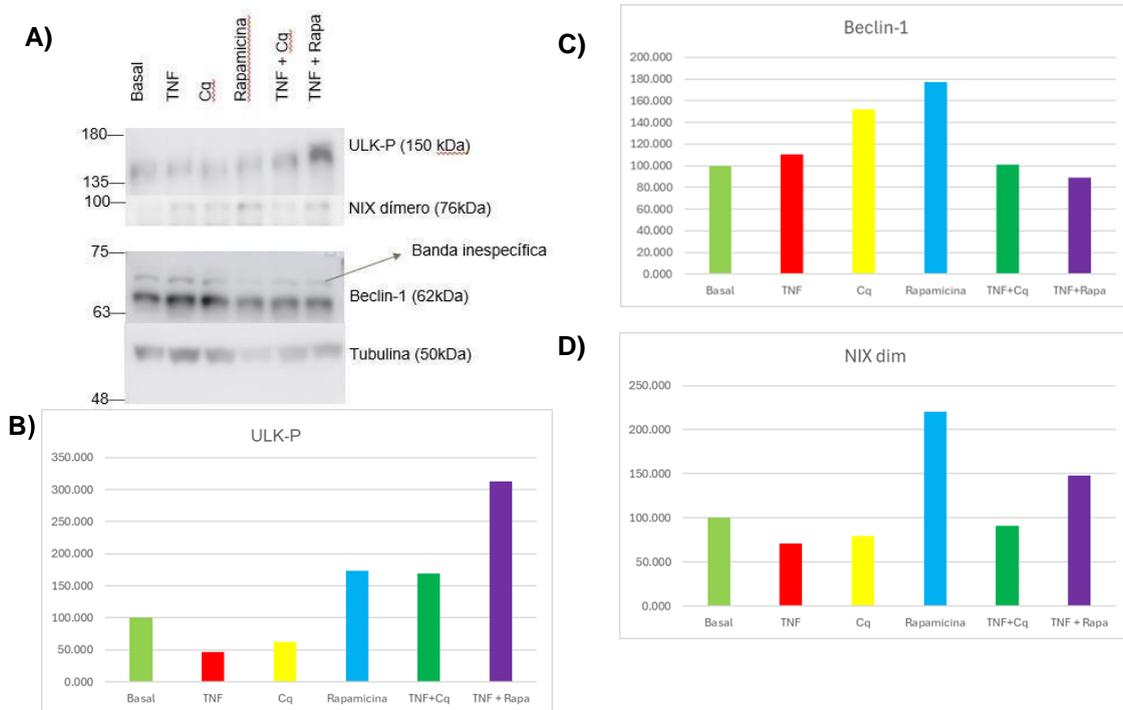


Figura 9. Expresión proteica de ULK-P, Beclin-1 y NIX dímery en sinoviocitos de ratas. Células sinoviales de rata confluentes, en placas de 6 pocillos, previamente estimuladas con un inhibidor (cloroquina) o un inductor de la autofagia (rapamicina) se estimularon durante 18 h en presencia o no de TNF α . **(A)** Imagen representativa de uno de los geles. **(B)**, **(C)** y **(D)** Representación gráfica de la cuantificación de las bandas, ULK-P, Beclin-1 y NIX dim, respectivamente.

En primer lugar, parece que la expresión de ULK-P disminuye en presencia de TNF, ya que este activa la vía AKT e induce a mTOR, que a su vez inhibe la activación de ULK-P. Con la cloroquina la expresión apenas varía con respecto a TNF, puesto que, si no se produce autofagia, la cloroquina no puede pararla. Sin embargo, con rapamicina al inhibir mTOR, se activa ULK-P y si se juntan rapamicina y TNF por su acción sinérgica inducen la autofagia, por lo que ULK-P se activa.

En cuanto al dímery de NIX, su expresión por lo general no se ve muy afectada, excepto con la rapamicina, que parece que al inducir la autofagia su expresión aumenta, y lo mismo pasa con TNF + rapamicina, parece que el TNF por si solo no induce la autofagia, en cambio, sí es capaz de actuar de forma sinérgica con la rapamicina.

Como se observa en la **Figura 9**, con Beclin-1 parece que no se producen grandes cambios con respecto a la condición basal, excepto con la cloroquina y la rapamicina, que su expresión es mayor. En el caso de la cloroquina, parece que al parar la autofagia, Beclin-1 se puede estar acumulando y con la rapamicina, al inducir la autofagia, Beclin-1 se activa para participar en la formación del fagóforo, la membrana del autofagosoma.

Con respecto al resveratrol, se van a explicar los resultados, centrándose en los estímulos TNF junto con el resveratrol y en la cuantificación de p62 y LC3-II (**Figura 10**).

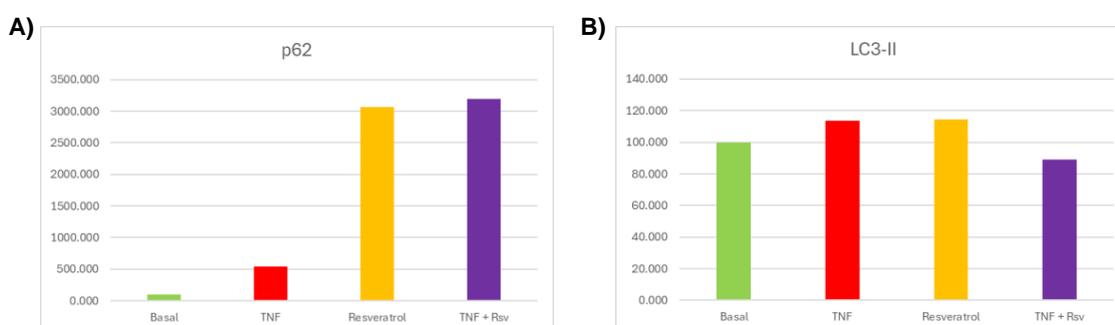


Figura 10. Expresión proteica de p62 y LC3-II en sinoviocitos de ratas. Células sinoviales de rata confluentes estimuladas con resveratrol durante 18 h en presencia o no de TNF α . **(A)** y **(B)** Representación gráfica de la cuantificación de las bandas, p62 y LC3-II, respectivamente.

Los resultados obtenidos en relación al resveratrol no son concluyentes. Por un lado, el resveratrol aumenta la expresión de p62 y no se modifica en presencia de TNF, sin embargo, por otro lado, los niveles de LC3-II apenas se modifican en presencia de resveratrol, y disminuyen ligeramente con la combinación de TNF y resveratrol, lo que podría sugerir que LC3-II se está consumiendo al inducirse la autofagia.

5. DISCUSIÓN

5.1 p62 y LC3-II

p62 es una proteína que se encuentra en el endosoma tardío y lisosoma. Cuando es degradada selectivamente por autofagia, la concentración intracelular de p62 disminuye. También, puede actuar como receptor para la degradación autofágica de orgánulos específicos y proteínas ubiquitinizadas (Shin et al., 2020).

Hay que tener en cuenta la interacción existente entre p62 con LC3-II cuando se unen y son incorporadas al autofagosoma para luego ser degradadas por la autofagia (Mizushima et al., 2010). LC3-II es la cadena ligera 3B de la proteína 1A/1B que se encuentra conjugada con el fosfolípido (PE) o fosfatidiletanolamina. Se localiza en la membrana interna y externa de los autofagosomas.

En el presente estudio se analizó el efecto de la cloroquina sobre p62 y LC3-II, puesto que es un inhibidor de la autofagia al impedir la fusión del autofagosoma con el lisosoma. Además, también afecta a la acidez y/o actividad degradativa del lisosoma, ya que es una base débil y puede elevar el pH de los compartimentos celulares, inhibiendo la actividad de las hidrolasas residentes (Mauthe et al., 2018). Asimismo, en otro experimento se demostró que la cloroquina tiene la capacidad de bloquear la autofagia en células de ratón *in vitro*. Al bloquear la última fase de la autofagia, se produce una acumulación de autofagosomas, lo que conlleva a un aumento significativo de los niveles de LC3-II y de p62 en comparación con las células control (Mauthe et al., 2018).

Siguiendo la línea en la que tiene lugar la autofagia, la rapamicina, utilizada como control positivo, induce la autofagia al formar un complejo con la proteína FKB12. Este es un receptor intracelular que se une específicamente a mTOR e inhibe de forma alostérica su actividad quinasa (Kim & Guan, 2015). Se ha demostrado que la rapamicina también es efectiva en una variedad de enfermedades inflamatorias en modelos animales, de manera que los niveles de p62 y LC3-II van a disminuir tras el desarrollo de la autofagia. Esto se puede contrastar con otro experimento en el que tratan ratones que tienen otitis con rapamicina y con el polisacárido-peptidoglucano de *Streptococcus* (PGPS, del inglés streptococcal peptidoglycan-polysaccharide), como contaminante que induce la autofagia para comparar los niveles de autofagia entre la rapamicina y el PGPS. Sus resultados, tras realizar técnicas inmunohistoquímicas de LC3 en células epiteliales muestran que había una menor expresión de LC3 en los ratones tratados con rapamicina, al igual que observaron también que había una menor acumulación de la proteína p62, todo ello en comparación con PGPS. Por lo que, estos resultados pueden sugerir que la función de degradación puede mejorar en presencia de rapamicina (Xie et al., 2021).

En otro escenario, donde actúa la citocina TNF, se puede deducir que está estimulando la vía AKT y mTOR y por tanto se inhibe la autofagia. Asimismo, esta citocina puede inhibir la degradación lisosomal de los autofagosomas a través de la desregulación de las proteínas SNARE que median la fusión autofagosómica lisosómica (Bishop et al., 2024). Por tanto, se puede producir una acumulación tanto de p62 como LC3-II, porque se está parando la autofagia en la fase final. El conjunto de estos resultados son acordes a los obtenidos en nuestro estudio.

Tras realizar una evaluación del posible efecto protector del resveratrol sobre el flujo autofágico en un contexto inflamatorio inducido por la citocina TNF se vio que la expresión tanto de p62 como de LC3-II aumentó, por lo que parece

que el resveratrol no está reestableciendo el flujo autofágico, lo está parando. Por el contrario, sí hay una disminución de LC3-II con TNF + resveratrol que llega a los niveles basales. Con los datos obtenidos, como ya se ha comentado no son concluyentes. Inicialmente cabría esperar que hubiese una disminución de p62 porque hubiese una autofagia efectiva. Como se pudo comprobar en otro estudio que utilizaron modelos animales de ratones con problemas de fibrosis asociados con AR, en el que detectaron una disminución del nivel de expresión de p62, tras revertirlo de su acumulación basal y de LC3-II de manera significativa con el tratamiento de resveratrol. Por lo que sus resultados sugirieron que el flujo autofágico aumentó significativamente después del tratamiento con resveratrol y de esta manera se mejora la enfermedad (Bao et al., 2022).

5.2 ULK-P, Beclin-1 y NIX dímero

ULK-P es la forma activa de ULK-1, una quinasa serina/treonina que forma parte del complejo ULK1 junto con otras proteínas y participa en el inicio de la autofagia (Zachari & Ganley, 2017). Su principal inhibidor es mTOR, que es inducido por el TNF, por lo que en presencia de este no se produce la activación de ULK-P (Bishop et al., 2024). Como no se induce la autofagia, la cloroquina no puede pararla, por lo que no afecta al nivel de expresión de ULK-P. Sin embargo, con el inductor de la autofagia, la rapamicina, se une a FKBP12 e inhibe la actividad quinasa del complejo multiproteico mTOR. De este modo, la expresión de ULK-P aumenta. Como se demuestra en otro estudio, utilizando células de ratones, la rapamicina se une a FKBP12, inhibiendo la actividad quinasa del complejo mTORC1. Pero el complejo mTORC2 no interacciona con FKBP12-rapamicina, aunque esta puede unirse al mTOR libre una vez están libres cuando son recién sintetizadas. Por lo tanto, una exposición prolongada a la rapamicina puede llevar a la unión de FKBP12-rapamicina a las moléculas de mTOR (Sarbasov et al., 2006).

Beclin-1 es el componente central del complejo PI3K que interviene en la iniciación de la autofagia, interactúa con BCL2 para regular el tamaño y el número de autofagosomas. Su expresión se ve aumentada en presencia de la cloroquina, puesto que está inhibiendo la fusión del autofagosoma con el lisosoma y entonces Beclin-1 junto con los autofagosomas se acumulan. Lo mismo pasa con la rapamicina, que al inhibir mTOR, Beclin-1 puede actuar. En otro estudio con modelos animales de ratones, después de estimularlos con factores de daño tisular, se comprobó que Beclin-1 es liberado y ocurre la autofagia (Bao et al., 2022).

NIX dímero se encuentra en la membrana externa mitocondrial, donde actúa como receptor de la mitofagia tanto en el desarrollo celular como en condiciones patológicas. Media a través de la despolarización mitocondrial el inicio de la autofagia. La despolarización mitocondrial lleva al compromiso de la membrana externa mitocondrial, lo que conduce a la liberación o activación de enzimas destructivas. Las membranas generadas por la autofagia sirven para

compartimentar estas enzimas y realizar una función protectora (Wu et al., 2021). Estudios en modelos animales de ratones demostraron que NIX puede inducir la autofagia, bajo condiciones hipóxicas al interrumpir el complejo BCL2-Beclin-1 (Bao et al., 2022). Por todo ello, en presencia de rapamicina, al inducir la autofagia, el dímero NIX presenta la mayor expresión. Por otro lado, su disminución en presencia de TNF sugiere que el TNF actúa inhibiendo la autofagia, acción que la rapamicina es capaz de revertir.

6. CONCLUSIONES

1. Tras llevarse a cabo la cuantificación de la expresión de diferentes mediadores autofágicos, como p62, LC3-II, ULK-P, Beclin-1 y NIX mediante Western blot se pueden apreciar diferencias en el nivel de expresión de los diferentes mediadores según el estímulo aplicado. Estas diferencias se pueden asociar a si existe una progresión adecuada de la autofagia, o por el contrario, esta no se lleva a cabo. De esta manera, se va a influir en la mejora o no de la patología de la AR.

2. El resveratrol no parece estar estableciendo el flujo autofágico. Por lo que no está siendo un tratamiento efectivo y no se está reduciendo la gravedad de la artritis reumatoide experimental. Sin embargo, los datos obtenidos no son concluyentes. Sería necesario aumentar la n de experimentos y estudiar nuevos elementos de la ruta autofágica, así como otros inhibidores o inductores de la misma para poder clarificar el papel del resveratrol como posible tratamiento de la AR.

CONCLUSIÓNS

1. Tras levarse a cabo a cuantificación da expresión de diferentes mediadores autofáxicos, como p62, LC3-II, ULK-P, Beclin-1 e NIX mediante Western blot pódense apreciar diferenzas no nivel de expresión dos diferentes mediadores segundo o estímulo aplicado. Estas diferenzas pódense asociar a si existe unha progresión adecuada da autofaxia, ou polo contrario, esta non se leva a cabo. De este xeito, vaise influir na mellora ou non da patoloxía da AR.

2. O resveratrol non parece estar establecendo o fluxo autofáxico. Polo que non está sendo un tratamento efectivo e non se está reducindo a gravidade da artrite reumatoide experimental. Sen embargo, os datos obtidos non son concluíntes. Sería necesario aumentar a n de experimentos e estudar novos elementos da ruta autofáxica, así como outros inhibidores ou indutores da mesma para poder cuantificar o papel de resveratrol como posible tratamento da AR.

CONCLUSIONS

1. After quantifying the expression of different autophagic mediators such as p62, LC3-II, ULK-P, Beclin-1, and NIX using Western blot, differences in the expression levels of the various mediators can be observed depending on the applied stimulus. These differences can be associated with whether there is an adequate progression of autophagy or, on the contrary, if it does not occur. In this way, it will influence the improvement or not of the RA pathology.

2. Resveratrol does not appear to be establishing the autophagic flux. Therefore, it is not being an effective treatment and is not reducing the severity of experimental rheumatoid arthritis. However, the obtained data are not conclusive. It would be necessary to increase the number of experiments and study new elements of the autophagic pathway, as well as other inhibitors or inducers of it, to clarify the role of resveratrol as a potential treatment for RA.

7. BIBLIOGRAFÍA

Bao, L., Ye, J., Liu, N., Shao, Y., Li, W., Fan, X., Zhao, D., Wang, H., & Chen, X. (2022). Resveratrol ameliorates fibrosis in rheumatoid arthritis-associated interstitial lung disease via the autophagy-lysosome pathway. *Molecules*, 27(23), 8475. <https://doi.org/10.3390/molecules27238475>

Bishop, E. L., Gudgeon, N., Fulton-Ward, T., Stavrou, V., Roberts, J., Boufersaoui, A., Tennant, D. A., Hewison, M., Raza, K., & Dimeloe, S. (2024). TNF- α signals through ITK-Akt-mTOR to drive CD4+ T cell metabolic reprogramming, which is dysregulated in rheumatoid arthritis. *Science Signaling*, 17(833), eadg5678. <https://doi.org/10.1126/scisignal.adg5678>

Cell Signaling Technology. (2016). *Autophagy Pathway*. Recuperado 28 de febrero de 2024, de <https://www.cellsignal.com/pathways/autophagy-signaling-pathway>

Choy, E. (2012). Understanding the dynamics: Pathways involved in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Rheumatology*, 51 (Suppl. 5), v3-v11. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/kes113>

Edwards, J. C. (1994). The nature and origins of synovium: Experimental approaches to the study of synoviocyte differentiation. *Journal of Anatomy*, 184(3), 493-501.

Fundación Española de Reumatología. (s.f.). *Artritis reumatoide: Qué es, síntomas, diagnóstico y tratamiento*. Recuperado el 23 de mayo de 2024, de <https://inforeuma.com/enfermedades-reumaticas/artritis-reumatoide>

Jia, M., Yue, X., Sun, W., Zhou, Q., Chang, C., Gong, W., Feng, J., Li, X., Zhan, R., Mo, K., Zhang, L., Qian, Y., Sun, Y., Wang, A., Zou, Y., Chen, W., Li, Y., Huang, L., Yang, Y., ... Cheng, X. (2023). ULK1-mediated metabolic reprogramming regulates Vps34 lipid kinase activity by its lactylation. *Science Advances*, 9(22), eadg4993. <https://doi.org/10.1126/sciadv.adg4993>

Kim, Y. C., & Guan, K.-L. (2015). mTOR: A pharmacologic target for autophagy regulation. *The Journal of Clinical Investigation*, 125(1), 25-32. <https://doi.org/10.1172/JCI73939>

López-Armada, M. J., Fernández Rodríguez, J. A. & Blanco, F. J.

- (2022). Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in rheumatoid arthritis. *Antioxidants*, 11(6), 1151. <https://doi.org/10.3390/antiox11061151>
- Malaviya, R., Laskin, J. D., & Laskin, D. L. (2017). Anti-TNF α therapy in inflammatory lung diseases. *Pharmacology & Therapeutics*, 180, 90-98. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2017.06.008>
- Marinkovic, M., & Novak, I. (2021). A brief overview of BNIP3L/NIX receptor-mediated mitophagy. *FEBS Open Bio*, 11(12), 3230-3236. <https://doi.org/10.1002/2211-5463.13307>
- Masoumi, M., Bashiri, H., Khorramdelazad, H., Barzaman, K., Hashemi, N., Sereshki, H. A., Sahebkar, A., & Karami, J. (2021). Destructive roles of fibroblast-like synoviocytes in chronic inflammation and joint damage in rheumatoid arthritis. *Inflammation*, 44(2), 466-479. <https://doi.org/10.1007/s10753-020-01371-1>
- Mauthe, M., Orhon, I., Rocchi, C., Zhou, X., Luhr, M., Hijlkema, K.-J., Coppes, R. P., Engedal, N., Mari, M., & Reggiori, F. (2018). Chloroquine inhibits autophagic flux by decreasing autophagosome-lysosome fusion. *Autophagy*, 14(8), 1435-1455. <https://doi.org/10.1080/15548627.2018.1474314>
- Mizushima, N., Yoshimori, T., & Levine, B. (2010). Methods in mammalian autophagy research. *Cell*, 140(3), 313-326. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.01.028>
- Nakatogawa, H., Suzuki, K., Kamada, Y., & Ohsumi, Y. (2009). Dynamics and diversity in autophagy mechanisms: Lessons from yeast. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 10(7), 458-467. <https://doi.org/10.1038/nrm2708>
- Park, D., Jeong, H., Lee, M. N., Koh, A., Kwon, O., Yang, Y. R., Noh, J., Suh, P.-G., Park, H., & Ryu, S. H. (2016). Resveratrol induces autophagy by directly inhibiting mTOR through ATP competition. *Scientific Reports*, 6(1), 21772. <https://doi.org/10.1038/srep21772>
- Pezzuto, J.M. (2019). Resveratrol: Twenty years of growth, development and controversy. *Biomolecules & Therapeutics*, 27(1), 1-14. <https://doi.org/10.4062/biomolther.2018.176>
- Sarbassov, D. D., Ali, S. M., Sengupta, S., Sheen, J.-H., Hsu, P. P., Bagley, A. F., Markhard, A. L., & Sabatini, D. M. (2006). Prolonged rapamycin treatment inhibits mTORC2 assembly and Akt/PKB. *Molecular Cell*, 22(2), 159-168. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2006.03.029>
- Shaito, A., Posadino, A. M., Younes, N., Hasan, H., Halabi, S., Alhababi, D., Al-Mohannadi, A., Abdel-Rahman, W. M., Eid, A. H., Nasrallah, G. K., & Pintus, G. (2020). Potential adverse effects of resveratrol: A literature review. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(6), 2084.

<https://doi.org/10.3390/ijms21062084>

Shin, W. H., Park, J. H., & Chung, K. C. (2020). The central regulator p62 between ubiquitin proteasome system and autophagy and its role in the mitophagy and Parkinson's disease. *BMB Reports*, 53(1), 56-63. <https://doi.org/10.5483/BMBRep.2020.53.1.283>

Sun, K., Jing, X., Guo, J., Yao, X., & Guo, F. (2021). Mitophagy in degenerative joint diseases. *Autophagy*, 17(9), 2082-2092. <https://doi.org/10.1080/15548627.2020.1822097>

Tsalktskan, V., & Firestein, G. S. (2022). Targeting fibroblast-like synoviocytes in rheumatoid arthritis. *Current Opinion in Pharmacology*, 67, 102304. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2022.102304>

Veratrum. (2024). En *Wikipedia, la enciclopedia libre*.

<https://es.wikipedia.org/w/index.php?title=Veratrum&oldid=157026960>

Vomero, M., Barbati, C., Colasanti, T., Perricone, C., Novelli, L., Ceccarelli, F., Spinelli, F. R., Di Franco, M., Conti, F., Valesini, G., & Alessandri, C. (2018). Autophagy and rheumatoid arthritis: Current knowledges and future perspectives. *Frontiers in Immunology*, 9, 24. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01577>

Vomero, M., Caliste, M., Barbati, C., Speziali, M., Celia, A. I., Ucci, F., Ciancarella, C., Putro, E., Colasanti, T., Buoncuore, G., Corsiero, E., Bombardieri, M., Spinelli, F. R., Ceccarelli, F., Conti, F., & Alessandri, C. (2022). Tofacitinib decreases autophagy of fibroblast-like synoviocytes from rheumatoid arthritis patients. *Frontiers in Pharmacology*, 13, 852802. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.852802>

Wang, S., Deng, Z., Ma, Y., Jin, J., Qi, F., Li, S., Liu, C., Lyu, F.-J., & Zheng, Q. (2020). The role of autophagy and mitophagy in bone metabolic disorders. *International Journal of Biological Sciences*, 16(14), 2675-2691. <https://doi.org/10.7150/ijbs.46627>

Wu, X., Zheng, Y., Liu, M., Li, Y., Ma, S., Tang, W., Yan, W., Cao, M., Zheng, W., Jiang, L., Wu, J., Han, F., Qin, Z., Fang, L., Hu, W., Chen, Z., & Zhang, X. (2021). BNIP3L/NIX degradation leads to mitophagy deficiency in ischemic brains. *Autophagy*, 17(8), 1934-1946. <https://doi.org/10.1080/15548627.2020.1802089>

Xie, D., Zhao, T., Zhang, X., Kui, L., Wang, Q., Wu, Y., Zheng, T., Ma, P., Zhang, Y., Molteni, H., Geng, R., Yang, Y., Li, B., & Zheng, Q. Y. (2021). Autophagy contributes to the rapamycin-Induced improvement of otitis media. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 15, 753369. <https://doi.org/10.3389/fncel.2021.753369>

Xu, Y., Shen, J., & Ran, Z. (2020). Emerging views of mitophagy in

immunity and autoimmune diseases. *Autophagy*, 16(1), 3-17.
<https://doi.org/10.1080/15548627.2019.1603547>

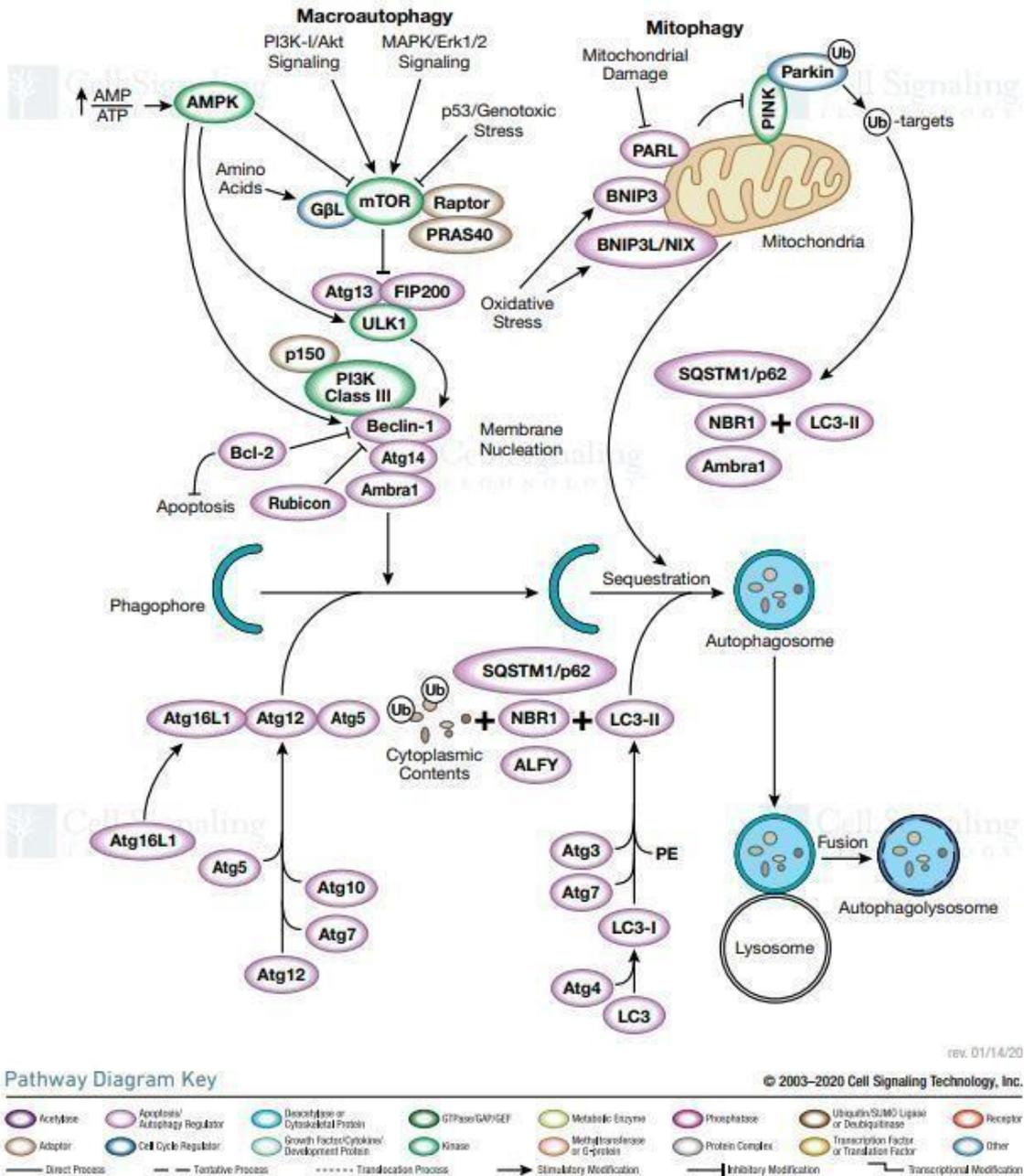
Yan, H., Zhou, H.-F., Hu, Y., & Pham, C. T. N. (2015). Suppression of experimental arthritis through AMP-activated protein kinase activation and autophagy modulation. *Journal of Rheumatic Diseases and Treatment*, 1(1), 5. <https://doi.org/10.23937/2469-5726/1510005>

Yao, Y., Zhu, J., Qin, S., Zhou, Z., Zeng, Q., Long, R., Mao, Z., Dong, X., Zhao, R., Zhang, R., Zhang, S., Huang, S., & Chen, L. (2022). Resveratrol induces autophagy impeding BAFF-stimulated B-cell proliferation and survival by inhibiting the Akt/mTOR pathway. *Biochemical Pharmacology*, 202, 115139. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2022.115139>

Zachari, M., & Ganley, I. G. (2017). The mammalian ULK1 complex and autophagy initiation. *Essays in Biochemistry*, 61(6), 585-596. <https://doi.org/10.1042/EBC20170021>

ANEXO I

Autophagy



Esquema donde se observan las dos vías de autofagia: la macroautofagia y la mitofagia, centrándose en los procesos donde participan mTOR, Atg, NIX y PARKIN. Imagen tomada de (Cell Signaling Technology, 2016).

ANEXO II

A) Lista de estímulos empleados, con sus respectivas concentraciones, volúmenes y diluciones.

Estímulos	Concentración inicial	Volumen inicial	Concentración final	Volumen final	Dilución
Cloroquina	30 mM	8,33 μ l	25 μ M	1 ml	1/1200
Rapamicina	10 mM	1 μ l	100 mM	1 ml	1/100000
TNF humanos	10 μ g/ml	1 μ l	10 ng/ml	1 ml	1/1000
TNF ratas	100 μ g/ml	1 μ l	10 ng/ml	1 ml	1/10000
Resveratrol	50 mM	1 μ l	50 μ M	1 ml	1/1000

B) Composición del tampón de lisis celular para la extracción proteica.

REACTIVOS	VOLUMEN	CASA COMERCIAL
SDS al 10%	0,2 ml	Sigma
Glicerol 100%	0,2 ml	Sigma
Tris 1M-HCL pH 6,8	0,2 ml	Sigma
Agua destilada	0,4 ml	Grifols
PMSF 0,1 mM	10 μ l	Sigma
Cóctel de inhibidores de proteasas	10 μ l	Sigma

C) Caracterización de los anticuerpos primarios empleados.

Anticuerpos primarios	Especie	Mono/policlonal	Dilución	KDa	Referencia
Beclin-1	conejo	policlonal	1:500 BSA	60	3738 (Cell Signaling)
Nix monómero/dímero	conejo	monoclonal	1:1000 BSA	38,76	12396(Cell Signaling)
α-Tubulin	ratón	monoclonal	1:5000 leche	50	T5168
p62	conejo	policlonal	1:500 BSA	62	5114 (Cell Signaling)
LC3I/LC3II	conejo	monoclonal	1:700 leche	14, 16	3868 (Cell Signaling)
ULK1	conejo	monoclonal	1:1000 BSA	150	8054 (Cell Signaling)
ULK1-s757	conejo	policlonal	1:1000 BSA	150	6888 (Cell Signaling)

D) A continuación, se muestra la composición del tampón de lavado 10 X utilizado en el Western blot:

-Tris base: 12,1 g

-NaCl: 14,6 g

-Tween 20: 5 ml

Se usa al 1X, se añaden 450 ml de agua y también 50 ml del tampón de lavado 10 X, y de esta manera se obtiene el tampón de lavado 1X.

E) Caracterización de los anticuerpos secundarios empleados.

Anticuerpos secundarios	Especie	Dilución	Referencia
Anti-conejo IgG, unido a peroxidasa	burro	1:4000 BSA	NA934 (Cytiva)
Anti-ratón IgG	ratón	1:2500 leche	NA931 (Cytiva)