



VNIVERSITAT [ò*]
D VALÈNCIA
Facultat de Farmàcia

Departament de Farmacologia

Doctorat en BIOMEDICINA I FARMÀCIA

Modulació de l'artritis gotosa per dues molècules inhibidores de la caspasa-1

Tesi Doctoral presentada per:

Laura Catalán Prades

Directores de la Tesi Doctoral:

Dra. Maria José Alcaraz Tormo

Dra. Maria Luisa Ferrándiz Manglano

Dra. Maria Carmen Terencio Silvestre

València, gener 2020



VNIVERSITAT DE VALÈNCIA

Facultat de Farmàcia - Departament de Farmacologi

Doctorat en Biomedicina i Farmàcia

M^a José Alcaraz Tormo, M^a Luisa Ferrándiz Manglano, i M^a Carmen Terencio Silvestre, Catedràtiques de la Universitat de València.

CERTIFIQUEN:

Que el treball presentat per la Llicenciada **Laura Catalán Prades**, titulat “**Modulació de l’artritis gotosa per dues molècules inhibidores de la caspasa-1**”, per obtindre el grau de Doctora, ha sigut realitzat en la Universitat de València en el Departament de Farmacologia, sota la nostra direcció i assessorament.

Conclòs el treball experimental i bibliogràfic, autoritzem la presentació de la Tesi Doctoral, per tal que siga jutjada pel Tribunal corresponent.

Pel que signem en València, gener de 2020

Dra. Maria José Alcaraz Tormo

Dra. Maria Luisa Ferrándiz Manglano

Dra. Maria Carmen Terencio Silvestre

TAULA DE CONTINGUTS:

RESUM.....	ix
ABREVIATURES	xv
INTRODUCCIÓ.....	1
1. ARTRITIS GOTOSA	3
1. 1. CARACTERÍSTIQUES GENERALS DE L'ARTRITIS GOTOSA	4
1.1.1. Fases de la gota.....	7
1. 2. DIAGNÒSTIC DE L'ARTRITIS GOTOSA	9
1. 3. TRACTAMENT DE LA GOTA	11
1.3.1. Tractament farmacològic	13
1.3.1.1. Tractament simptomàtic o antiinflamatori.....	14
o AINE	16
o Colquicina	16
o Glucocorticoïdes	17
o Inhibidors de l'IL-1.....	17
1.3.1.2. Tractament de la hiperuricèmia	18
o Inhibidors de la xantina-oxidasa:.....	19
o Uricosúrics	21
o Uricolítics	22
1.4. FISIOPATOLOGIA	23
1.4.1. Activació de la resposta immune	23
1.4.1.1. Resposta immune innata en la gota	23
1.4.1.2. Resposta immune adaptativa en la gota	27
1.4.2. L'inflamasoma i la caspasa-1 en l'artritis gotosa	30

1.4.2.1. Inflamasoma NLRP3	31
1.4.2.2. Caspasa-1	33
o Components de la caspasa-1	33
o Funció inflamatòria caspasa-1	34
o Funció antiinflamatòria.....	36
1.4.2.3. Senyalització NLRP3-caspasa-1 pels cristalls d'MSU	37
1.4.2.4. IL-1B com a mediador de la resposta inflamatòria	41
1.4.3. Estrès oxidatiu en gota	42
1.4.4. Resolució de la inflamació	47
1.5. MODELS EXPERIMENTALS D'ARTRITIS GOTOSA	48
2. MOLÈCULES AMB POTENCIAL INTERÈS EN EL TRACTAMENT DE L'ARTRITIS GOTOSA	50
2.1 DERIVATS CALCONA	50
2.2 OSTEOSTATINA.....	53
OBJECTIUS	59
MATERIAL I MÈTODES	63
1. PRODUCTES I ANIMALS D'EXPERIMENTACIÓ.....	65
1.1. PRODUCTES I REACTIUS	65
1.2. ANIMALS D'EXPERIMENTACIÓ	66
2. MÈTODES D'ESTUDI EX VIVO	67
2.1. AÏLLAMENT I CULTIU DE MACRÒFAGS PERITONEALS	67
2.1.1. Extracció.....	67

2.1.2. Cultiu dels macròfags peritoneals i tractaments	68
2.2. AVALUACIÓ DE LA CITOTOXICITAT DELS PRODUCTES PER L'ASSAIG D'MTT.....	71
2.2.1. Protocol assaig MTT	72
2.3. AVALUACIÓ DE LA PIROPTOSI PER L'ASSAIG D'LDH.....	72
2.3.1. Protocol assaig LDH	73
2.4. DETERMINACIÓ DE CITOCINES PER ELISA.....	74
2.4.1. Protocol ELISA.....	75
2.5. DETERMINACIÓ DE L'ACTIVACIÓ DE CASPASA-1 i NF- κ B PER WESTERN BLOT.....	76
2.5.1. Fonament i protocol experimental del Western Blot ..	77
2.5.2. Preparació de les mostres.....	77
2.5.3. Electroforesi.....	78
2.5.4. Transferència	79
2.5.5. Incubació de la membrana	81
2.6. DETECCIÓ D'ESPÈCIES REACTIVES D'OXIGEN	83
2.6.1 Determinació de ROS mitocondrials amb MitoSOX™ ...	83
2.6.2. Determinació de ROS extracel·lulars per quimioluminescència.....	84
2.7. DETERMINACIÓ DE LA TRANSLOCACIÓ D'Nrf2 AL NUCLI PER IMMUNOFLUORESCÈNCIA.....	84
3. MÈTODES D'ESTUDI <i>IN VIVO</i>.....	85
3.1. BOSSA D'AIRE EN RATOLÍ ESTIMULADA AMB CRISTALLS CPPD..	85
3.1.1. Protocol experimental	86

3.1.2. Determinació de l'activitat mieloperoxidasa.....	89
3.2. ARTRITIS GOTOSA EN RATOLÍ INDUÏDA PER CRISTALLS MSU ...	90
3.2.1. Protocol experimental.....	91
3.2.1. Obtenció i processament de les mostres	92
4. ANÀLISI ESTADÍSTIC I EXPRESSIÓ DE RESULTATS.....	94
RESULTATS	95
1. ESTUDI DE L'EFECTE FARMACOLÒGIC DEL DERIVAT CALCONA.....	97
1.1. ESTUDIS <i>EX VIVO</i> EN MACRÒFAGS PERITONEALS.....	97
1.1.1. Determinació de la citotoxicitat per l'assaig MTT	97
1.1.2. Determinació de citocines proinflamatòries	98
1.1.3. Activació de caspasa-1	100
1.1.4. Avaluació de la piroptosi per l'assaig d'LDH	101
1.1.5. Detecció de p-p65-NF-κB	103
1.1.6. Determinació de la generació de ROS.....	104
1.1.6.1. Determinació de ROS extracel·lulars per quimioluminescència.....	105
1.1.6.2. ROS mitocondrials amb MitoSOX™.....	106
1.1.6.3. Efecte sobre la translocació d'Nrf2	108
1.2. ESTUDIS <i>IN VIVO</i>	111
1.2.1. Bossa d'aire en ratolí estimulada amb cristalls de CPPD	111
1.2.1.1. Migració cel·lular i activitat MPO	112
▫ Migració cel·lular	112

□ Activitat MPO	113
1.2.1.1. Citocines proinflamàtores	114
1.2.1.2. Activació de caspasa-1	116
1.2.1.3. Detecció de p-p65-NF-κB	118
1.2.2. Artritis gotosa en ratolí induïda per cristalls d'MSU ..	119
1.2.2.1. Estudi tempsdependent de la formació de l'edema	120
1.2.2.2. Activitat MPO	122
1.2.2.3. Determinació de citocines proinflamàtores	123
1.2.2.4. Activació de caspasa-1	125
1.2.2.5. Detecció de p-p65-NF-κB	126

2. ESTUDI DE L'EFFECTE FARMACOLÒGIC D'OSTEOSTATINA

.....	129
2.1. ESTUDIS <i>EX VIVO</i> EN MACRÒFAGS PERITONEALS	129
2.1.1. Determinació de la citotoxicitat per l'assaig MTT	129
2.1.2. Determinació de citocines proinflamàtores	131
2.1.3. Activació de caspasa-1	132
2.1.4. Avaluació de la piroptosi per l'assaig d'LDH	134
2.1.5. Activació d'NF-κB	135
2.1.6. Determinació de la generació de ROS	136
2.1.6.1. ROS extracel·lulars per quimioluminescència	136
2.1.6.2. ROS mitocondrials amb MitoSOX™	137
2.1.6.3. Efecte sobre la translocació d'Nrf2	139

2.2. ESTUDIS <i>IN VIVO</i>	141
2.2.1. Bossa d'aire en ratolí estimulada amb cristalls de CPPD	141
2.2.1.1. Migració cel·lular i activitat MPO	142
o Migració cel·lular	142
o Activitat MPO.....	142
2.2.1.2. Citocines proinflamatòries	143
2.2.1.3. Activació de caspasa-1	145
2.2.1.4. Detecció de p-p65-NF-κB.....	146
2.2.2. Artritis gotosa en ratolí induïda per cristalls d'MSU ..	148
2.2.2.1. Estudi tempsdependent de la formació de l'edema	148
2.2.2.2. Activitat MPO.....	150
2.2.2.3. Determinació de citocines proinflamatòries	151
2.2.2.4. Activació de caspasa-1	153
2.2.2.5. Detecció de p-p65-NF-κB.....	154
DISCUSSIÓ	157
A. EFECTE DE LA CALCONA	159
B. EFECTE DE L'OSTEOSTATINA	165
CONCLUSIONS	171
REFERÈNCIES	175
ANNEXOS	197
1. LLISTA DE FIGURES	199

2. LLISTA DE TAULES	203
3. AUTORITACIONS DEL PROCEDIMENTS.....	204

Resum

L'artritis gotosa es una de les malalties articulars més freqüents d'artritis inflamatòria. Es produeix a causa de la deposició d'urat monosòdic (MSU) en les articulacions, donant lloc a episodis aguts d'inflamació, que poden ser molt persistents i fins i tot poden arribar a cronificar-se. Els cristalls d'MSU produeixen el ràpid reclutament de neutròfils cap a les articulacions en les primeres etapes de l'atac de gota. La fagocitosi d'aquests cristalls pels neutròfils i macròfags genera la producció de ROS i l'activació del factor nuclear NF- κ B, donant lloc a l'alliberament de citocines proinflamatòries i l'activació de l'inflamasoma NLRP3. Aquest inflamasoma té un paper clau en el desenvolupament de la resposta inflamatòria en la gota, ja que indueix l'activació de la caspasa-1 i la consegüent producció de les formes actives d'IL-1 β i l'IL-18, citocines que participen en la hiperalgèsia i la inflamació induïda pels cristalls d'MSU.

Hi ha un gran interès en l'estudi de noves dianes terapèutiques que poden facilitar la prevenció o tractament de la gota, ja que actualment no existeix ningun tractament totalment eficaç o desproveït d'efectes adversos. En aquest sentit, les calcones són un grup de compostos fenòlics de la família dels flavonoides, que han demostrat interessants propietats antiinflamatòries i antiartrítiques, actuant sobre diverses dianes terapèutiques. Concretament, el derivat 2,4,5-trimetoxi-2'-trifluorometilcalcona (CH) és un potent inhibidor de l'alliberament de l'òxid nítric i de l'expressió d'òxid nítric sintasa induïble en macròfags. D'altra banda, l'osteostatina (OT), pentapèptid derivat de la proteïna relacionada amb l'hormona paratiroide, ha demostrat recentment propietats antiinflamatòries en osteoblasts i en un model d'artritis en ratolí, reduint el dany articular i l'alliberament de citocines proinflamatòries.

Amb aquestes premisses, en la present Tesi Doctoral, s'ha abordat l'estudi de CH i OT com a potencials molècules amb propietats antigotoses, realitzant la seua avaluació tant en protocols ex vivo en macròfags peritoneals, com en models d'inflamació in vivo relacionats amb l'artritis gotosa.

Inicialment, s'ha dut a terme l'estudi en macròfags peritoneals de ratolí estimulats amb LPS i ATP, per a induir una resposta inflamatòria relacionada amb l'activació de la caspasa-1. En aquestes condicions, tant el derivat CH (1 - 10 μ M) com OT (100 - 500 nM) han inhibit l'activació de caspasa-1 i d'NF- κ B, així com l'alliberament de les citocines proinflamatòries IL-1 β , IL-18, IL-6 i TNF- α . A més, ambdues molècules han demostrat un efecte citoprotector en l'assaig de l'MTT i en el de làctic deshidrogenasa, enzim alliberat com a conseqüència del fenomen de piroptosi que produeix l'activació de caspasa-1. Paral·lelament, CH i OT presenten un clar perfil antioxidant, reduint la producció de ROS extracel·lulars determinades per quimioluminescència, i de ROS mitocondrials detectades per fluorescència amb el reactiu MitoSOX TM. Es destaca l'augment de la translocació al nucli de l'Nrf2 produït principalment pel tractament amb CH.

En una segona fase, s'ha utilitzat el model in vivo de la bossa d'aire en ratolí induït pels cristalls de dihidrat de pirofosfat càlcic. En aquest model, l'administració de CH (100 μ g/bossa) i d'OT (3 - 6 μ g/bossa) 20 minuts abans de la injecció dels cristalls, ha reduït l'activació de caspasa-1 i d'NF- κ B, així com l'alliberament de citocines proinflamatòries, confirmant per tant els efectes ja observats en l'estudi preliminar amb macròfags. A més, aquest model ens ha permès demostrar l'efecte inhibitor d'ambdues molècules sobre la migració neutrofílica i l'alliberament de CXCL-1 (quimiocina per als neutròfils).

Finalment, s'ha posat a punt un model d'artritis gotosa induïda en ratolí per injecció de cristalls d'MSU. En aquest model s'ha demostrat l'efecte antiinflamatori de CH (30 mg/kg via oral) i OT (80-120 µg/kg), ja que l'administració de ambdues molècules ha reduït de manera significativa l'edema plantar produït entre les 3 hores i les 24 hores de durada de l'estudi. A més, s'ha confirmat l'efecte inhibidor de CH i OT sobre la migració neutrofílica mitjançant la determinació de l'activitat mieloperoxidasa en els homogeneïtzats de les potes. En aquests homogeneïtzats també s'ha pogut corroborar la reducció de les citocines IL-1 β , IL-18, IL-6, TNF α , i CXCL-1 així com la inhibició de l'activació de caspasa-1 i d'NF- κ B.

Tots aquest resultats demostren l'efecte antiinflamatori de 2,4,5-trimetoxi-2'-trifluorometilcalcona i de osteostatina per mecanismes relacionats amb l'efecte antioxidant i la inhibició de l'activació de caspasa-1 i NF- κ B, i suggereixen el seu potencial interès en el tractament de l'artritis gotosa i patologies relacionades.

Paraules clau: artritis gotosa, caspasa-1, MSU, CPPD, 2,4,5-trimetoxi-2'-trifluorometilcalcona, osteostatina, NF- κ B, Nrf2, ROS

Abreviatures

En base a les directrius del “Manual de Català Científic” de Carles Riera i Fonts, (1993) per la coherència amb el lleguatge científic ampliament divulgat, s’ha respectat algunes de les abreviatures segons l’estructura de la llegua original.

aa	Aminoàcids
ADN	Àcid desoxiribonucleic
AIM2	<i>Absent in melanoma 2</i>
AINE	Antiinflamatoris no esteroidals
AMP	Adenosina Monofosfat
AMPK	<i>AMP-activated protein kinase</i>
Apaf-1	<i>Apoptotic proteases activin factor-1</i>
APC	Cèl·lules presentadores d’antigen
APS	Persulfat Amònic
ARE	<i>Antioxidant responsive element</i>
ASC	<i>Apoptosis-Associated Speck-Like Protein Containing a CARD</i>
ATP	<i>Adenosine triphosphate</i>
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
bZIP	<i>Basic Leucine Zipper Domain</i>
CARD	<i>Caspase recruitem domain</i>
CH	<i>2,4,5-trimethoxy-2’-trifluoromethylchalcone.</i>
CMPK2	<i>Cytidine/Uridine Monophosphate Kinase 2</i>

COX-2	Ciclooxigenasa - 2
CPPD	<i>Calcium pyrophosphate dihydrate</i>
CXCL-1	<i>C-X-C motif chemokine ligand - 1</i>
CYP3A4	<i>Cytochrome P450 3A4</i>
DAMPs	<i>Damage-associated molecular patterns</i>
DC	<i>Dendritic cells</i>
DTT	Ditiotreitol
ECL	<i>Electrochemiluminescence</i>
ELISA	<i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>
EPISER	Estudi de prevalença de la Sociedad Española de Reumatología (SER)
ER	<i>Endoplasmic reticulum</i>
EULAR	<i>European League Against Rheumatism</i>
FDA	<i>Food and Drugs Administration</i>
FGF-2	<i>Fibroblast growth factor - 2</i>
GPx	<i>Glutathione peroxidase</i>
GAPDH	<i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>
GLUT9	<i>Glucose transporter 9</i>
HMGB1	<i>High mobility group box 1</i>
HO-1	<i>Heme oxygenase 1</i>
IFI16	<i>γ-interferon-inducible protein-16</i>
IgG	Immonoglobulina G

IFN γ	<i>Interferon gamma</i>
IL	Interleucina
IL-1R1	Receptor IL-1 tipus 1
IL-1Ra	Antagonista del receptor sintètic IL-1
IL-1RAcP	Proteïna accessòria del receptor
iNOS	Inhibidor de la inducció de l'enzim òxid nítric sintasa
I κ B	Inhibidor de kappa B
JNK	<i>c-Jun N-terminal kinase</i>
Keap1	<i>Kelch-like ECH-associated protein 1</i>
LDH	Lactat deshidrogenasa
LPS	Lipopolisacàrid bacterià
LRR	<i>Leucine-rich repeat</i>
LTB ₄	Leucotriè B ₄
MAP	<i>Mouse air pouch</i>
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MLKL	<i>Mixed lineage kinase domain-like protein</i>
MPO	Mieloperoxidasa
MSU	<i>Monosodium urate</i>
mtDNA	ADN mitocondrial
mtROS	Espècies reactives d'oxigen mitocondrials
MTT	Bromur de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) - 2,5-difenil tetrazole

MyD88	<i>Myeloid differentiation primary response 88</i>
NACHT	Domini central vinculant als nucleòtids
NAD	<i>Dihyronicotinamide-adenine dinucleotide</i>
NADPH	<i>Dihyronicotinamide-adenine dinucleotide phosphate</i>
NEK7	<i>NIMA (Never In Mitosis Gene A)-Related Kinase 7</i>
NET	<i>Neutrophil Extracellular Traps</i>
NF-κB	<i>Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
NK	<i>Naturak Killer</i>
NLR	<i>NOD - like receptor</i>
NLRP3	<i>nucleotide binding oligomerization domain, leucine rich repeat and pyrin domain containing protein-3</i>
NO	Óxid nítric
NOD	<i>Nucleotide-binding Oligomerization Domain</i>
NOX	NADPH-oxidasa
NQO1	<i>NADPH quinone oxidoreductase</i>
Nrf2	<i>Nuclear factor erythroid 2-related factor 2</i>
PAMPs	<i>Pathogen-associated molecular pattern.</i>
PARP1	Poli (ADP-ribosa) polimerasa 1
PBS	Tampó fosfat
PGE ₂	Prostaglandina E ₂
PKC	<i>Protein kinase C</i>

PMS	Metasulfat de fenazina
PMSF	<i>Phenylmethysulphonyl fluoride</i>
PPAR	<i>Peroxisome proliferator-activated receptors</i>
PPI	Inhibidor del transportador de la bomba de protons
PR3	Proteïna-3
PRR	Receptor de reconeixement de patrons
PTH	Hormona paratiroide
PTHr1	Receptor comú de PTH tipus 1
PTHrP	Pèptid relacionat amb la PTH
PYD	Domini piridina
qsp	Quantitat suficient per
RANKL	<i>Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand</i>
rhIL-37	<i>IL-37 humana recombinant</i>
RIP2	<i>Receptor-interacting protein kinase 2</i>
RIPK3	<i>Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 3</i>
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute Medium</i>
SBF	Sèrum Boví Fetal
SDS	Dodecilsulfat sodic
SF	Sèrum fisiològic
SOD1	<i>Superoxide dismutase 1</i>

TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletilenodiamina
TGF- β	<i>Transforming growth factor β</i>
TLR	<i>Toll-like receptors</i>
TMB	3,3',5,5'-tetrametil-benzidina
TNF α	Factor de necrosis tumoral α
TPA	13-acetat de 12-O-tetradecanoilforbol
TPH1R	Receptor PTH tipus 1
Tregs	Cèl·lules T reguladores
URAT1	<i>Urate transporter 1</i>
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>

Introducció

1. ARTRITIS GOTOSA

La gota es tracta d'una malaltia històrica. El primer afectat per la gota del qual es té alguna referència és Hieró (478 - 467 aC), tirà de Siracusa, de qui es va arribar a afirmar que "estava simultàniament afecte d'arenas renals", una de les complicacions més freqüents de la gota.

Al llarg del temps, la gota ha estat nomenada com el rei dels mals i com el mal dels reis, per la freqüència amb què ha afectat personatges de l'aristocràcia com Carles V, Felip II, Isaac Newton...

Ja Hipòcrates (segle V aC) va descriure aquesta malaltia com podagra. El concepte d'Hipòcrates és que la gota no afecta els eunucs, els nens i les dones fins a la menopausa.

Als segles successius es va acceptar la seua opinió, fins que autors com Galè o Sèneca, van rebatre aquestos conceptes. Però, no és fins al segle XII quan s'introdueix el terme gota procedent del llatí. Se suposava que per una causa estranya es destil·lava com un verí, gota a gota, en l'articulació (Caracuel, 2019).

En l'actualitat, la gota es troba entre les patologies més freqüents de l'artritis inflamatòria. Es caracteritza per la deposició d'urat monosòdic (MSU) en les articulacions i en estructures periarticulars i subcutànies. Els símptomes clínics cursen amb episodis aguts d'inflamació, que poden arribar a donar lloc a manifestacions clíniques persistents i, fins i tot, fer-se crònica (figura 1) (Fenando i Widrich, 2019; Garrote Corral *et al.*, 2017).



Figura 1: La gota per James Gillray.
Publicada el 14 de maig de 1799
(Alamy, 2019)

1. 1. CARACTERÍSTIQUES GENERALS DE L'ARTRITIS GOTOSA

La prevalença informada de la gota a nivell mundial varia des del 0,1 fins al 10 % d'alguns grups ètnics d'Oceania. Pot variar per sexe, sent de 2 a 6 vegades més comú en els homes (3 - 6 %) que en les dones (1- 2 %), tot i que en les dones es produeix un increment després de la menopausa per l'efecte uricosúric dels estrògens. També augmenta amb l'edat, sobretot a partir dels 70 anys (Kuo *et al.*, 2015), així com en individus amb malalties cròniques com hipertensió arterial, insuficiència renal crònica, diabetis, insuficiència cardíaca congestiva, infart de miocardi i obesitat, la qual s'ha observat que augmenta en un 55 % el risc de sofrir gota (Fenando i Widrich, 2019; Aune *et al.*, 2014). Altres grups amb major risc són els pacients de psoriasi, perquè s'augmenta la producció d'urat.

Pel que fa a la incidència, es calcula que està entre 0,3 i 6 casos per cada 1.000 habitants a l'any (Kuo *et al.*, 2015). Tant la prevalença com la incidència de la gota és major en els països desenvolupats i ambdues han augmentat en els últims anys. Concretament a l'estat espanyol, l'estudi EPISER 2016 de la Sociedad Española de Reumatología, situa la prevalença en el 2,4 %.

Com s'ha comentat abans, la hiperuricèmia és la causa principal de la gota (Neogi, 2016). Tanmateix, existeixen alguns factors genètics que predisposen a patir aquesta patologia. En les últimes dècades s'han identificat diversos polimorfismes (Merriman *et al.*, 2014) i en els estudis de l'associació GWAS (*Genome-wide association study*), s'han identificat 28 *locus* que controlen els nivells d'urats sèrics. Els majors efectes genètics es veuen en els gens implicats en l'excreció renal de l'àcid úric i altres implicats en la glicòlisi. En canvi, es coneix poc sobre el control genètic de les respostes inflamatòries als cristalls MSU (Tin *et al.*, 2019).

Paral·lelament, hi ha una sèrie de factors que es poden modificar, com la dieta, ja que el consum d'aliments rics en purines, com ara marisc, vísceres i carn vermella poden contribuir a la hiperuricèmia i per tant a la gota. A més, l'alcohol (Roddy i Choi, 2014), les begudes carbonatades i aliments amb una elevada concentració de fructosa també poden influir a aquesta malaltia (Neogi, 2016). D'altra banda, el consum de cafè, derivats làctics i vitamina C poden tenir un efecte protector (Roddy i Choi, 2014).

A part de la dieta, el canvi en l'estil de vida pot disminuir el risc de sofrir gota. Perdre pes i fer exercicis redueix la resistència a la insulina i els nivells d'àcid úric en sang. La correcta ingesta d'aigua també ajudarà a l'eliminació renal de l'excés d'àcid úric de la sang (Marangella, 2005).

Finalment, qualsevol condició que pugui provocar alteracions en la concentració extracel·lular d'àcid úric, com l'estrès (procediment quirúrgic, trauma recent o fam) i medicaments (aspirina, diürètics, ...) poden contribuir a l'augment del risc (Fenando i Widrich, 2019).

La hiperuricèmia és el factor clau per al desenvolupament de la gota. Es considera que la concentració d'urat en plasma igual o superior a 6,8 mg/dl, juntament amb factors genètics, metabòlics i ambientals, faciliten l'agregació dels cristalls. La gota es desencadena, doncs, per la formació de cristalls d'MSU com a resultat de la supersaturació d'àcid úric local.

La concentració sèrica d'àcid úric està determinada per l'equilibri entre la producció i eliminació d'urat. L'àcid úric és el producte final del metabolisme de degradació de les purines, que es troben en cèl·lules humanes i en molts aliments. Mitjançant l'enzim xantina oxidoreductasa, la hipoxantina es converteix en xantina i aquesta en àcid úric (figura 2).

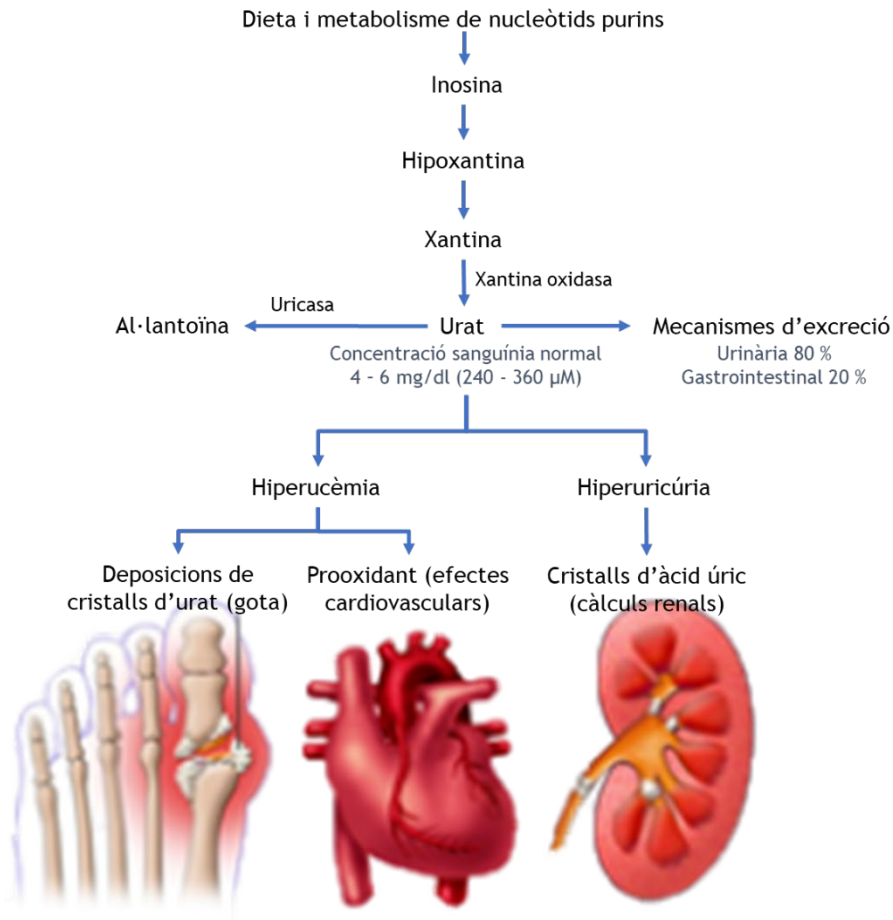


Figura 2: Vies de l'homeòstasi de l'urat (Modificada de So i Thorens, 2010)

L'àcid úric és transportat per la sang per a convertir-se en al·lantoïna per l'acció de l'enzim hepàtic uricasa o be ser excretat (Desai *et al.*, 2017). El 80 % de l'àcid úric s'elimina per via renal i el 20 % pel tracte gastrointestinal. En el renyó, el 90 % és reabsorbit fonamentalment a nivell del túbul contornejat proximal per diferents transportadors com l'URAT1 (*Urate transporter 1*) i el GLUT9 (*Glucose transporter 9*) (Lemos Lima *et al.*, 2015).

1.1.1. Fases de la gota

Es poden diferenciar 4 fases en la patologia, les quals presenten uns símptomes i tractaments diferents (Desai *et al.*, 2017).

a) Hiperuricèmia asimptomàtica

La hiperuricèmia asimptomàtica és el període que transcorre abans del primer atac de gota. En aquest període no hi ha símptomes, però els nivells d'àcid úric en sang són elevats i es comencen a formar els dipòsits de cristalls d'MSU en les articulacions (Desai *et al.*, 2017; Dalbeth *et al.*, 2016).

b) Gota aguda

La presentació clínica més freqüent de la gota en humans és la presència d'episodis recurrents d'artritis aguda en una articulació. L'artritis gotosa es caracteritza per l'aparició sobtada, sovint començant durant la nit, de manera que el pacient es desperta amb dolor articular a primera hora del matí per un augment brusc d'àcid úric en sang, que indueix a la deposició de l'àcid úric en les articulacions en forma de cristalls.

Aquest brot de gota s'associa a un dolor sever, inflamació, enroigiment i calor local, a nivell articular i periarticular (Chen *et al.*, 2017). El punt àlgid de dolor i d'inflamació arriba aproximadament a les 6 - 12 hores després de l'inici de la cristal·lització. En conseqüència, es poden produir periartritis, tendinitis o bursitis. Les característiques clíniques de l'artritis gotosa poden ser indistingibles de les artritis sèptiques, sobretot perquè l'atac agut de gota pot presentar símptomes i característiques sistèmiques que poden incloure febre, malestar general i fatiga (Neogi, 2016).

La localització més freqüent és a la primera articulació metatarsofalàngica (figura 3). En alguns casos també es pot implicar el talar, subtalar, turmell i genoll. A més de les articulacions, pot afectar a altres estructures periarticulars com els tendons i la bossa sinovial (Neogi, 2016).



Figura 3: Gota aguda. El més freqüent és l'afecció a la primera articulació metatarsofalàngica, que es troba en la base del dit gros del peu. (Mayo Clinic, 2019)

Un tret característic de l'artritis gotosa aguda és la seua naturalesa a autoregular-se, i normalment desapareix en un lapse de 7 a 10 dies. Algunes persones no tornaran a experimentar un segon atac de gota, però un 60 % dels afectats tindrà un altre brot en el període d'un any, i un 84 % sofrirà un altre episodi d'atac de gota en els tres anys següents (Desai *et al.*, 2017; Dalbeth *et al.*, 2016).

Com que els cristalls d'MSU continuen en l'articulació, aquesta resolució espontània pot implicar l'activació de mecanismes que suprimeixen la inflamació induïda pel cristall, com ara reguladors negatius de la inflamació estèril i l'eliminació de cèl·lules mortes i xarxes de neutròfils agregats (Fenando i Widrich, 2019).

c) Gota d'interval

La gota d'interval és el període de temps entre els atacs de gota aguda. Malgrat que no hi ha dolor, la gota no ha desaparegut. La inflamació produirà danys en les articulacions en aquesta fase. Arribats a aquest punt, el millor per a començar a controlar la gota és canviar d'estil de vida i sotmetre's a tractaments farmacològics, per a evitar més brots

d'atacs de gota i sobretot prevenir la cronificació de la patologia (Desai *et al.*, 2017; Dalbeth *et al.*, 2016).

d) Gota crònica

La gota crònica es desenvolupa quan els nivells d'àcid úric han sigut elevats durant molts anys i pot tardar fins 10 anys en aparèixer. En contrast amb l'artritis gotosa aguda, els atacs es tornen més freqüents i el dolor tarda més en desaparèixer. Es poden produir danys articulars que afecten a la mobilitat.

La fase d'artritis gotosa crònica és deguda a la presència persistent de masses de cristall d'urat monosòdic dipositades, que causen una inflamació local o sistèmica mitjançant reaccions de cossos estranys similars al granuloma. Aquests s'anomenen **tofus gotosos**. Normalment no són dolorosos, però poden inflamar-se i donar lloc a l'atac de gota (Fenando i Widrich, 2019; Garrote Corral *et al.*, 2017).

Els tofus normalment es produeixen a les articulacions. Els més freqüents al dit gros del peu, teixits cartilaginosa, teixit tou, els tendons i les bosses sinovials (Fenando *et al.*, 2019). En pacients amb gota crònica, el brot pot implicar múltiples articulacions, la qual cosa pot causar un síndrome de resposta inflamatòria sistèmica que es pot confondre per una sèpsia (Shah *et al.*, 2015).

1. 2. DIAGNÒSTIC DE L'ARTRITIS GOTOSA

La identificació del cristall d'urat monosòdic és l'indicatiu indiscutible per al diagnòstic de la gota. En un brot de gota el líquid sinovial sol tenir un color groc i un aspecte més nuvolós. Conté cristalls i leucòcits (menys que en l'artritis sèptica) (Fenando i Widrich, 2019).

La identificació de cristalls d'MSU en líquid sinovial o en material aspirat de tofos és el punt clau per al diagnòstic de la gota (Punzi *et al.*, 2019; Schlesinger, 2010;). En la figura 4 es mostra la imatge al microscopi de líquid sinovial a 600 augments amb llum ordinària (imatge esquerra), on s'aprecia un cristall en forma d'aigua dins d'un leucòcit. Sota la llum polaritzada simple (imatge central), el cristall mostra una intensitat de birefringència que pot aplicar el compensador vermell de primer ordre (imatge dreta) (Sivera *et al.*, 2017).

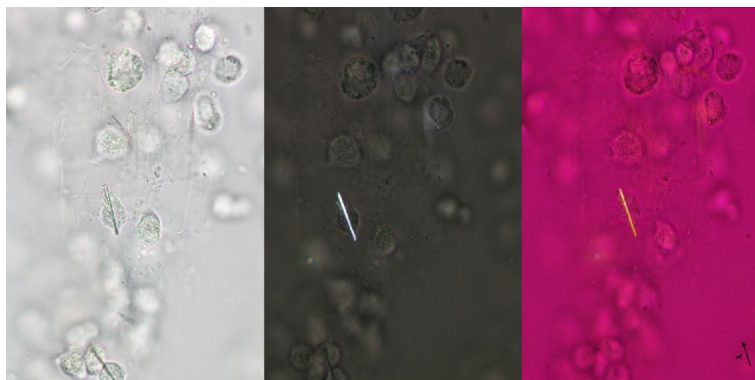


Figura 4: Microscòpia de líquid sinovial i tècniques d'observació
(Sivera *et al.*, 2017)

Actualment la tècnica més fiable per a diagnosticar la gota és l'anàlisi del líquid sinovial (Punzi *et al.*, 2019). D'altra banda, en la pràctica clínica és comú establir el diagnòstic previ d'hiperuricèmia. La incorporació de l'artrocentesi i l'anàlisi de líquid sinovial a l'avaluació del pacient amb artritis permet un millor seguiment de la malaltia i el diagnòstic en els casos de les presentacions menys típiques de la malaltia.

L'ecografia i la tomografia computada de doble energia, aquesta última amb una disponibilitat limitada, són tècniques d'imatge que poden ser de gran ajuda per diagnosticar i avaluar pacients amb gota.

L'ecografia pot indicar quan s'haurà de realitzar una artrocentesi d'articulació profunda, perquè marcarà una possible zona amb un dipòsit de cristalls. A més, la tomografia computada de doble energia presenta una sensibilitat més baixa que l'ecografia, però ens permetrà caracteritzar la presència gairebé inequívoca de cristalls d'MSU (Sivera *et al.*, 2017).

La gota ha d'incloure el diagnòstic diferencial de tot aquell pacient amb l'artritis aguda, junt amb l'artritis per cristalls de pirofosfat càlcic, l'artritis sèptica i altres menys comunes, com l'artritis reactiva o l'artritis psoriàsica. Alguns problemes articulars de tipus mecànic (per exemple, artrosi, hemartrosi) es poden confondre amb atacs de gota, per la similitud dels seus símptomes. En alguns pacients d'evolució àmplia que no s'ha pogut discutir i que presenten una gran extensió de dipòsits de cristalls d'MSU, la gota pot afectar diverses articulacions (oligoartritis o poliartritis) i d'una forma més persistent, per la qual cosa hauria de diferenciar altres formes d'artritis cròniques, com l'artritis reumatoide o l'espondiloartritis. Com es mencionava anteriorment, l'anàlisi sistemàtica del líquid sinovial facilita el diagnòstic dels casos menys característics (Sivera *et al.*, 2017).

1. 3. TRACTAMENT DE LA GOTA

Per a combatre la malaltia de la gota s'ha d'actuar tant per la via farmacològica com la no farmacològica. El tractament de la gota serà diferent depenent de la fase de la patologia en què s'estiga. Durant la fase aguda l'objectiu terapèutic és únicament reduir la inflamació i símptomes, a més d'evitar recaigudes i la progressió de la patologia. D'altra banda, l'objectiu a llarg termini és reduir els nivells d'urats sèrics

per a aconseguir prevenir i revertir les conseqüències dels depòsits de cristalls d'MSU (Fenando i Widrich, 2019).

Quan ja s'ha detectat la hiperuricèmia, primerament, el que s'ha de fer és avaluar les causes d'aquesta i detectar les possibles malalties associades, per a modificar l'estil de vida, manejar la comorbiditat i, en cas de necessitat, iniciar la teràpia hipouricèmiant més adequada a les característiques del pacient per a la profilaxis de nous atacs de gota (Neogi, 2016).

El pronòstic de la gota depèn de la comorbiditat de cada individu. La mortalitat és més elevada en individus amb comorbiditat cardiovascular. Si la gota rep un tractament adequat, la majoria dels pacients viuran una vida normal amb seqüeles lleus. Els pacients que tenen símptomes a una edat més primerenca, solen presentar una malaltia més severa a la presentació. Els que no modifiquen el seu estil de vida experimenten brots recurrents de manera habitual (Fenando i Widrich, 2019).

Les complicacions més habituals en l'artritis gotosa són la formació de tofus, que pot derivar en deformació articular, artrosi, pèrdua òssia, nefropatia per cristalls d'urat i nefrolitiasi. La gota també pot causar complicacions oculars, com ara conjuntivitis, uveïtis o esclerosi, a causa de la precipitació del cristall d'urat (Berman, 1995).

Per a un bon pronòstic de la malaltia es necessita educar al pacient, se'ls recomana canviar el seu estil de vida, limitar la ingesta d'alcohol, evitar determinats aliments i mantenir un pes corporal saludable. Aquests canvis per si sols no solen ser suficients per a combatre o revertir la gota, s'apliquen complementàriament amb la teràpia mèdica, perquè la majoria de pacients amb gota solen tenir altres comorbiditats. També s'ha d'educar el pacient en el compliment de la medicació i en verificar la dosificació adequada (Fenando i Widrich, 2019).

1.3.1. Tractament farmacològic

En els últims temps, el coneixement de la fisiopatologia de la gota ha millorat molt i la seua gestió ha avançat molt ràpidament. Les primeres recomanacions de la EULAR (*European League Against Rheumatism*) es centraven, quasi exclusivament, en reduir la concentració d'àcid úric en sang, limitant el tractament a l'al·lopurinol. Des d'aleshores, hi ha molts més medicaments disponibles o que es troben en les últimes fases d'estudi, per exemple, febuxostat, pegloticasa, bloquejadors d'interleucina (IL)-1 i lesinurad. També hi ha noves dades sobre fàrmacs més coneguts com la colquicina i l'al·lopurinol. Endemés, hi ha més coneixements sobre la patologia, fins i tot s'ha arribat a detectar mortalitat cardiovascular en pacients que tenien la malaltia de la gota (figura 2).

En qualsevol cas, el compliment del tractament és fonamental per a controlar la malaltia. EULAR 2016 estableix les directrius de la teràpia on s'han de tindre en compte els següents punts: primera presentació de gota (el primer atac agut), la presència d'atacs aguts recurrents, tofus, artropatia gota i/o pedres al ronyó i la seua presència mantinguda amb el pas del temps (Richette *et al.*, 2017).

L'objectiu del tractament farmacològic es pot enfocar des de dos punts de vista (figura 5): el tractament simptomàtic o antiinflamatori i el tractament de la hiperuricèmia, per a prevenir la formació dels cristalls reduint els nivells d'àcid úric en sang, per davall dels límits de la solubilitat en un llinar de 6 mg/dl (Punzi *et al.*, 2019).

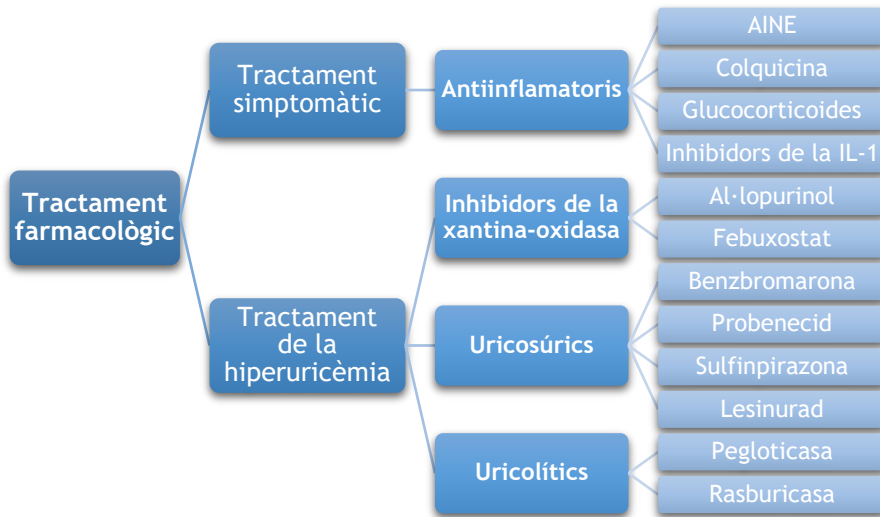


Figura 5: Tractament farmacològic de la gota

1.3.1.1. Tractament simptomàtic o antiinflamatori

El tractament del brot agut té com a objectiu alleujar ràpidament el dolor i la inflamació en una o més articulacions. Els antiinflamatoris no esteroidals (AINE), els glucocorticoïdes, la colquicina i els inhibidors d'IL-1 són els principals fàrmacs utilitzats per la seua efectivitat en el tractament. A la fi, l'elecció de cadascun d'ells dependrà de la comorbiditat associada i les preferències del pacient. Tanmateix, l'efectivitat del tractament està relacionada amb la rapidesa de l'inici del tractament, un cop detectada la inflamació (Burns i Wortmann, 2011).

2016 EULAR RECOMANACIONS PER AL TRACTAMENT DE L'ATAc AGUT DE GOTA

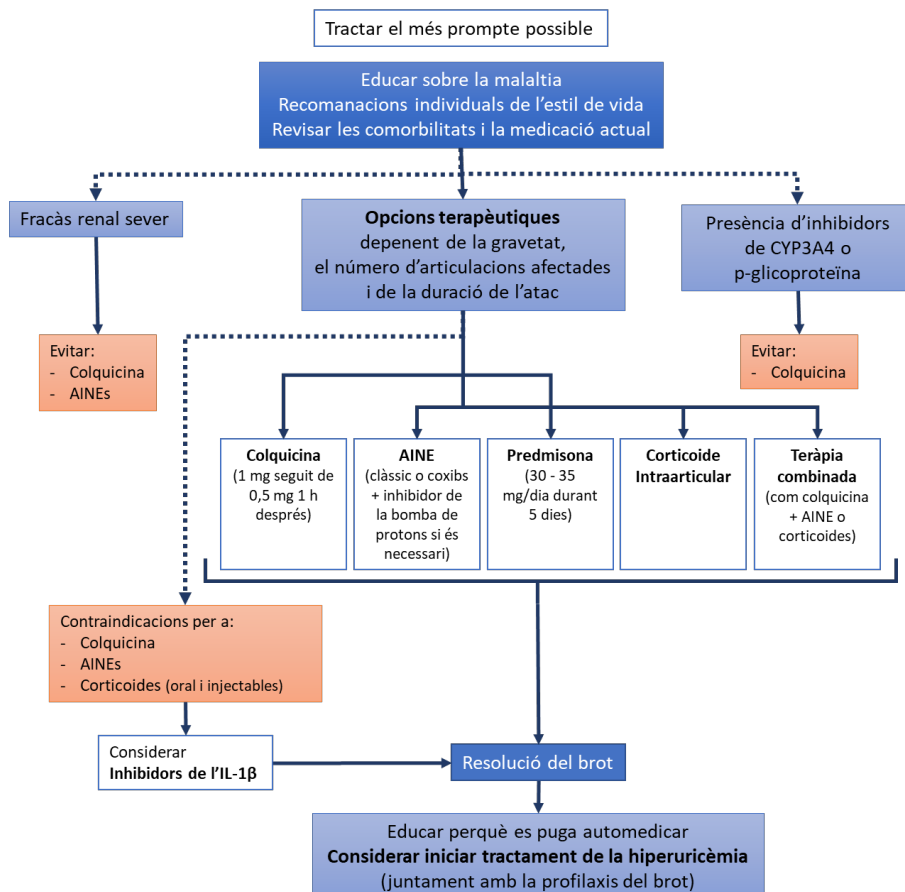


Figura 6: Arbre de decisions en un atac agut de gota segons les recomanacions de l'EULAR. Els inhibidors de P-glicoproteïna o CYP3A4 són ciclosporina, claritromicina, ketoconazole i ritonavir. IL, interleucina; AINEs, antiinflamatoris no esteroidals (Modificada de Richette *et al.*, 2017)

El tractament hauria de començar en les primeres 24 hores de l'inici del brot per reduir la seua gravetat i la seua durada. Tanmateix, es pot combinar amb la gestió no farmacològica com el descans i

l'aplicació de gel. La durada dels tractaments hauria de ser d'almenys de 7 a 10 dies per evitar que es produísca gota de rebot (Fenando *et al.*, 2019). En la figura 6 se resumeix l'algoritme de tractament segons les recomanacions de EULAR 2016.

- AINE

Els AINEs comparteixen accions terapèutiques i efectes secundaris semblants. La seua acció antiinflamatoria, analgèsica i antipirètic és exercida principalment a través de la inhibició de la ciclooxigenasa, enzim que catalitza la transformació de l'àcid araquidònic en prostaglandines.

Els AINEs solen ser el tractament de primera línia, si no hi ha contraindicacions. Es recomana la utilització a dosis màximes. Estan associats a una ràpida resolució dels símptomes perquè redueixen la inflamació i el dolor en l'articulació (Khanna *et al.*, 2012b).

No hi ha dades per afavorir un AINE sobre l'altre, excepte en el cas de la indometacina, la qual és l'última opció pel seu perfil tòxic (Abhishek *et al.*, 2017). A més a més, l'àcid acetilsalicílic hauria d'evitar-se perquè disminueix l'excreció renal de l'àcid úric (Neogi, 2016). AINE d'acció ràpida, com el naproxèn o el diclofenac, són bones opcions.

- Colquicina

La colquicina és l'alcaloide obtingut de les llavors i del bulb del còlquic (*Colchicum autumnale*) que s'utilitza per a aturar la mitosi durant la metafase, ja que impedeix l'acoblament de la tubulina i inhibeix la formació dels microtúbuls. S'utilitza per a la profilaxi i la millora dels atacs aguts de gota, ja que redueix la activitat leucocitària i la fagocitosi dels microcristalls d'urat.

Aquest fàrmac produeix una ràpida resposta clínica essent una alternativa eficaç i ben tolerada però s'ha d'administrar a dosis baixes. Els efectes adversos de la colquicina són majoritàriament símptomes gastrointestinals (nàusees i diarrea), mitotoxicitat i mielosupressió (leucopènia, trombocitopènia i anèmia aplàstica). La població amb més edat, pacients amb malaltia renal crònica o insuficiència hepàtica requereixen reducció de la dosi (Fenando *et al.*, 2019).

Aquest seria l'únic fàrmac aprovat per a la profilaxis de la malaltia, tot i que en alguns casos refractaris on la colquicina està contraindicada, s'empren AINE, prednisona a dosis baixes o inclús algun inhibidor de l'IL-1 β (Sivera *et al.*, 2017).

- **Glucocorticoides**

Els fàrmacs glucocorticoides són una alternativa per a pacients que tenen gota però tenen contraindicacions als AINE i/o colquicina. Aquests medicaments són també d'elecció per a pacients amb insuficiència renal. Els glucocorticoides poden ser administrats via intraarticular per a una gota monoarticular i per via parenteral o oral per a les eclosions poliarticulars (Khanna *et al.*, 2012b).

Els corticoides intraarticulars (per exemple, acetònid de triamcinolona) poden ser efectius, tot i que hi ha que descartar primer l'etiologia infecciosa. La prednisona per via oral (30 - 35 mg durant 5-7 dies) sol ser el més utilitzat. L'efectivitat és igual que la dels AINE, el problema és que pot causar un efecte rebot després de la seua suspensió, per la qual cosa s'hauria d'iniciar juntament amb la colquicina.

- **Inhibidors de l'IL-1**

L'evidència de què en el procés inflamatori s'allibera la citocina IL-1 β fa que els inhibidors de l'IL-1, com ara anakinra, canakinumab i

riloncept, tinguen un paper essencial, sobretot durant els brots de gota. Encara hi ha estudis en curs per a aquesta classe d'implicacions terapèutiques, tant en el tractament de l'atac agut, com per a la profilaxis de la gota, per això s'està estudiant com a opció en els casos resistents, amb múltiples brots o per als pacients que tenen contraindicats els tractaments de primera línia (Neogi, 2016).

Els inhibidors de l'IL-1 β són eficaços i ben tolerats, però hi ha que estar alerta amb les possibles infeccions a causa del seu ús. Tot i això, hi ha països com els Estats Units d'Amèrica que no els tenen aprovats per a aquest ús (Fenando *et al.*, 2019).

1.3.1.2. Tractament de la hiperuricèmia

Els tractaments hipouricèmians es centren en reduir la uricèmia per davall del punt de saturació, situat en 6 mg/dl d'àcid úric en sang per la majoria de les recomanacions i guies de pràctica clínica (Punzi *et al.*, 2019; Schlesinger, 2010). També s'utilitzen en casos com, per exemple, de tofus o de dany estructural, on es recomanen objectius més estrictes de < 5 mg/dl d'àcid úric en sang, perquè a menor uricèmia, major rapidesa en la dissolució dels depòsits de cristalls. La teràpia que redueix l'urat s'inicia a dosis baixes per controlar els efectes secundaris i la resposta al tractament. La valoració de la dosi es fa entre les 2 i les 6 setmanes per a assolir nivells d'urat sèric inferiors a 6 mg/dl o 5 mg/dl en aquells pacients amb tofus (Khanna *et al.*, 2012a).

L'inici del tractament amb hipouricèmians s'ha de considerar des del primer diagnòstic inequívoc de gota, ja que un tractament precoç permet una curació més ràpida i eficaç. Però, no s'hauria d'iniciar aquest tractament si hi ha una hiperuricèmia asimptomàtica o gota amb atacs molt poc freqüents (1 brot/any) (Fenando i Widrich, 2019).

A l'inici del tractament s'han d'administrar a dosis baixes, que aniran incrementant-se segons la resposta de la uricèmia, la funció renal i els possibles efectes adversos (Jordan *et al.*, 2007). En aquesta etapa inicial, hi ha un risc més elevat d'atacs de gota, per la qual cosa es recomana la profilaxi amb colquicina durant 3 mesos abans d'aconseguir la concentració d'urat sèric desitjada en pacients sense tofus o 6 mesos amb pacients amb tofus per reduir el risc de nous brots (Khanna *et al.*, 2012a).

Actualment, existeixen diferents opcions terapèutiques per reduir la uricèmia. Podem agrupar-les en 3 grups de fàrmacs segons el seu mecanisme d'acció: inhibidors de la xantina-oxidasa, uricosúrics i uricolítics; en tots estos casos la finalitat és la mateixa, reduir la uricèmia per davall del punt de saturació. En la figura 7 es resumeix l'algoritme EULAR 2016 per al tractament de la hiperuricèmia.

- **Inhibidors de la xantina-oxidasa:**

Els inhibidors de la xantina oxidasa actuen inhibint la síntesi de l'àcid úric. Aquest grup de fàrmacs inclou l'al·lopurinol i el febuxostat.

L'al·lopurinol és l'inhibidor de la xantina-oxidasa de primera línia per al tractament de la gota. Per la seua facilitat d'ús i efectivitat és el fàrmac més prescrit i utilitzat independentment de la causa de la hiperuricèmia (Dalbeth *et al.*, 2016).

L'administració oral s'inicia a dosis de 100 mg/dia, augmentant 100 mg mensualment fins a la dosi habitual de 300 mg/dia, encara que s'ha vist que a dosis de 600 mg/dia és més eficaç. En l'atenció primària no es sol administrar més de la dosi de 300 mg/dia.

2016 EULAR RECOMANACIONS PER AL TRACTAMENT DE LA HIPERURICÈMIA EN PACIENTS EN GOTA

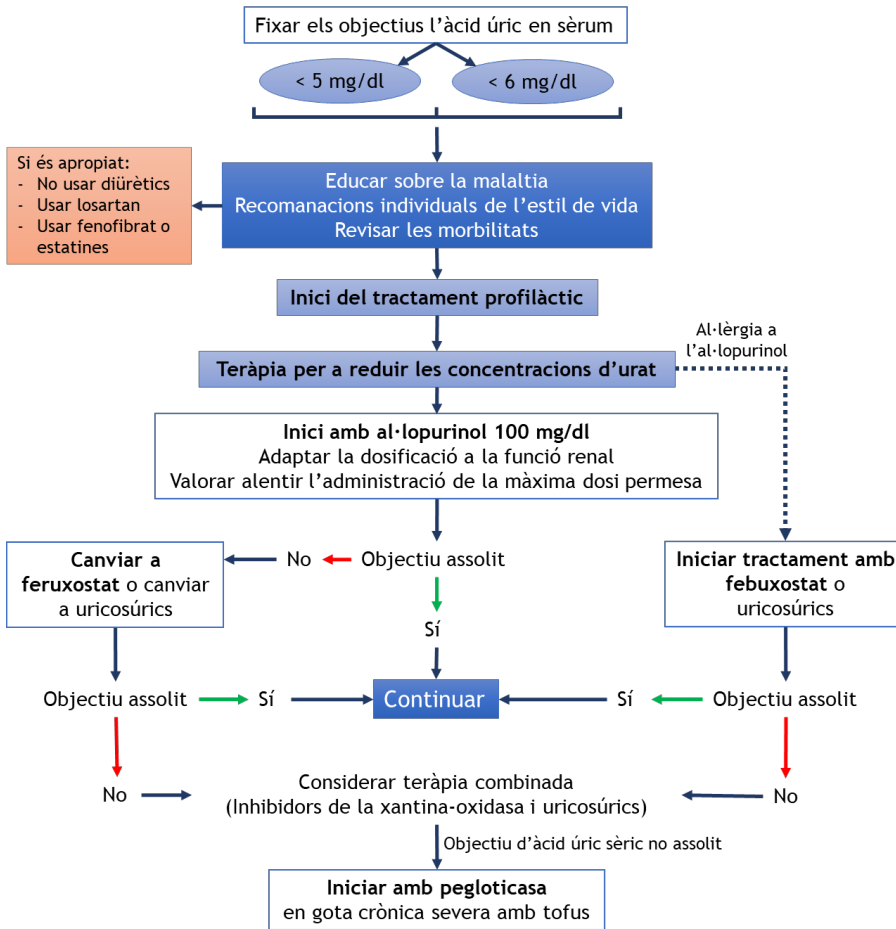


Figura 7: Gestió de la hiperuricèmia en pacients amb gota segons les recomanacions de l'EULAR. En aquesta fase també es recomana combinar l'al·lopurinol i un uricosúric (Modificada de Richette *et al.*, 2017)

En pacients tractats amb aquest fàrmac s'han de vigilar els efectes adversos que pot tenir, realitzant controls dels enzims hepàtics, de la funció renal i de la concentració plasmàtica de l'al·lopurinol. La majoria d'aquests efectes adversos són lleus i reversibles, com un augment en les

transaminases o erupcions cutànies, però d'altres vegades són greus i inclús mortals, com la hipersensibilitat a l'al·lopurinol. Normalment això es dona en pacients amb insuficiència renal (Fenando *et al.*, 2019).

Un altre inhibidor de la xantina-oxidasa molt utilitzat és el **febuxostat**. Aquest fàrmac s'administra com una dosi única diària entre 80 i 120 mg. En ell s'ha demostrat l'eficàcia i seguretat en pacients amb insuficiència renal lleu i moderada, per la qual cosa es tracta d'una alternativa segura si es produeix la intolerància a l'al·lopurinol. A més a més, és un fàrmac de primera línia per a pacients amb insuficiència renal o amb uricèmies molt elevades (Burns i Wortmann, 2011).

o Uricosúrics

Els agents uricosúrics provoquen un augment de l'excreció renal d'àcid úric perquè disminueixen la reabsorció d'aquest en el túbul proximal. Aquesta funció és interessant per al tractament de gota, ja que la majoria de pacients amb gota tenen l'excreció renal disminuïda. Els fàrmacs uricosúrics són ineficaços en monoteràpia en pacients amb reduït aclariment de creatinina (menys de 30 ml/minut) i estan contraindicats en pacients amb antecedents de nefrolitiasi. Els fàrmacs d'aquesta classe inclouen benzbromarona, probenecid, sulfinpirazona i lesinurad.

La **benzbromarona** inhibeix la reabsorció tubular de l'àcid úric pel transportador URAT1; té un efecte hipouricemiant similar al de l'al·lopurinol. La benzbromarona pot utilitzar-se en insuficiència renal de lleu a moderada, però és l'únic uricosúric que produeix hepatotoxicitat. La posologia s'inicia a dosis d'uns 50 mg/dia i es va augmentant paulatinament fins arribar a l'objectiu terapèutic de 200 mg/dia. Pot administrar-se juntament amb altres fàrmacs amb mecanismes d'acció diferents, com són l'al·lopurinol o el febuxostat, donant lloc a notables

millores en la reducció de la uricèmia i pot ser una estratègia per a pacients refractaris.

Probenecid és l'únic agent aprovat per a la seua utilització com a monoteràpia i la **sulfinpirazona** és un sulfòxid derivat de la pirazolidina que actua com a agent analgèsic. Els dos, el probenecid i la sulfinpirazona, també actuen inhibint la reabsorció tubular, no són hepatotòxics, però són ineficaços si hi ha alguna alteració de la funció renal (Burns i Wortmann, 2011).

Lesinurad és un altre inhibidor selectiu del transportador URAT1. El seu tractament està aprovat a dosis de 200 mg/dia combinat amb inhibidors de la xantina-oxidasa (Sivera *et al.*, 2017).

- **Uricolítics**

Els fàrmacs uricolítics contenen enzims que ajuden a metabolitzar l'àcid úric, contribuint a la reducció de la seua concentració plasmàtica. L'uricasa, enzim que el cos humà no sintetitza, actua convertint l'àcid úric en al·lantoïna soluble, producte final del metabolisme purínic. El tractament amb uricasa es reserva per a pacients amb gota refractària.

Pegloticasa i **Rasburicasa** són els agents uricasa homologats per al tractament de la hiperuricèmia. Els pacients han de deixar de prendre altres medicaments que redueixen els nivells d'urat mentre inicien aquesta teràpia, ja que poden desenvolupar anticossos contra la uricasa, els quals només es poden detectar mitjançant el seguiment del nivell d'urat sèric sense ser influenciats per altres teràpies. Aquesta classe de fàrmacs també està contraindicada en persones amb deficiència de glucosa-6-fosfat deshidrogenasa; per tant, el tractament potencial requereix el cribratge d'aquest enzim abans d'iniciar la teràpia (Fenando *et al.*, 2019).

La **pegloticasa** consta d'un conjunt covalent d'uricasa (o urat oxidasa) produït per *Escherichia coli* codificada genèticament i monometoxi polietilenglicol. La pegloticasa està aprovada per l'FDA (*Food and Drugs Administration*) des de 2010 per al tractament de la gota crònica resistent als tractaments convencionals. S'aplica via intravenosa i les reaccions per la perfusió són freqüents.

La **rasburicasa** consta de la forma recombinant de l'enzim urat oxidasa obtingut a partir de la soca *Saccharomyces cerevisiae*. Rasburicasa és una proteïna tetramèrica amb subunitats idèntiques i amb un pes molecular aproximadament de 34 kDa. Es comercialitza per al tractament i la profilaxi de la lisi tumoral, però no és apropiat el seu ús per la immunogenicitat i per la seua curta semivida (Burns i Wortmann, 2011).

1.4. FISIOPATOLOGIA

1.4.1. Activació de la resposta immune

La presència de cristalls d'MSU, actua com a “senyal de perill” afectant al sistema immunitari, reclutant diferents tipus cel·lulars al lloc on precipiten els cristalls i desencadenant la producció de citocines i l'expressió de molècules efectores (figura 8). Per tant, s'activa la resposta immunitària innata desencadenant al mateix temps respostes immunitàries adaptatives (Chen *et al.*, 2017).

1.4.1.1. Resposta immune innata en la gota

Els monòcits, macròfags, mastòcits, neutròfils, cèl·lules dendrítiques (DC) i cèl·lules *Natural Killer* (NK) són cèl·lules efectores

vitals de la immunitat innata i participen en la patogènesi de la inflamació aguda de la gota (Chen *et al.*, 2017).

La resposta precoç desencadenada per les deposicions de cristalls d'MSU és produïda pels macròfags residents (So i Martinon, 2017; Dalbeth *et al.*, 2016). Aquests, juntament amb els monòcits circulants que s'infiltra als llocs inflamats, són el primer pas per a iniciar la cascada inflamatòria en l'atac de gota (Martinon, 2010) (figura 8).

La fagocitosi dels cristalls MSU pels macròfags dirigeix el senyal de l'estrès oxidatiu en la cèl·lula, generant la producció d'espècies reactives d'oxigen (ROS) i l'alliberament de la cathepsina B, per la ruptura dels lisosomes. També condueix a l'augment massiu de sodi a l'interior de la cèl·lula, augmentant la tonicitat i donant lloc a l'afluència d'aigua. Aquest procés dilueix la concentració intracel·lular de potassi, que constitueix un clàssic senyal de perill intracel·lular. Tot això és un factor clau per a l'activació de l'inflamasoma NLRP3 (*nucleotide binding oligomerization domain, leucine rich repeat and pyrin domain containing protein-3*) (Fenando i Widrich, 2019; Martinon, 2010), que condueix a l'activació de la caspasa-1 i l'alliberament d'IL-1 β i IL-18 actives a l'espai extracel·lular (Fenando i Widrich, 2019; Dalbeth *et al.*, 2016). Els cristalls MSU també poden iniciar l'activació d'NLRP3 simplement amb el contacte sobre la membrana plasmàtica exterior dels macròfags (Fenando i Widrich, 2019).

L'IL-1 β s'ha identificat com una citocina crucial en la inflamació produïda en el brot de gota, ja que produeix l'activació dels fagòcits mononuclears residents i afavoreix la polarització dels macròfags cap al fenotip proinflamatori M1 (Fenando i Widrich, 2019). Endemés, l'IL-1 β contribueix al reclutament de monòcits i de neutròfils al lloc on estan els dipòsits de cristalls. L'alliberament d'aquesta citocina per part dels macròfags i les cèl·lules dendrítiques pot activar altres cèl·lules a través

del receptor IL-1 (IL-1R), donant lloc a la producció d'altres citocines proinflamàtòries i quimiocines, com IL-6, IL-8 i factor de necrosi tumoral α (TNF α) (So i Martinon, 2017).

Els cristalls d'MSU produeixen també el ràpid reclutament de neutròfils cap a les articulacions en les primeres etapes de l'atac de gota (Chen *et al.*, 2017; Martinon, 2010). La fagocitosi dels cristalls d'MSU indueix en els neutròfils l'alliberament de la seua cromatina junt a enzims granulars, com l'elastasa o la catepsina G. Es formen estructures similars a xarxes extracel·lulars, anomenades trampes extracel·lulars de neutròfils (NET) (Fenando i Widrich, 2019; Desai *et al.*, 2017).

El procés de formació de NET pot ser diferent depenent de l'estímul, però sol implicar la producció de ROS produïda per la NADPH oxidasa (NOX) dels neutròfils. Endemés, la formació de NET induïda pels cristalls d'MSU condueix a la mort dels neutròfils per la via de senyalització dependent de RIPK3 (*Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 3*) (Desai *et al.*, 2017).

En l'articulació inflamada també es troben cèl·lules NK, les quals participen en la fase aguda de gota, tot i que el seu paper encara no està del tot clar. D'altra banda, els mastòcits també són capaços de secretar IL-1 β i activar l'inflamasoma NLRP3 (Chen *et al.*, 2017).

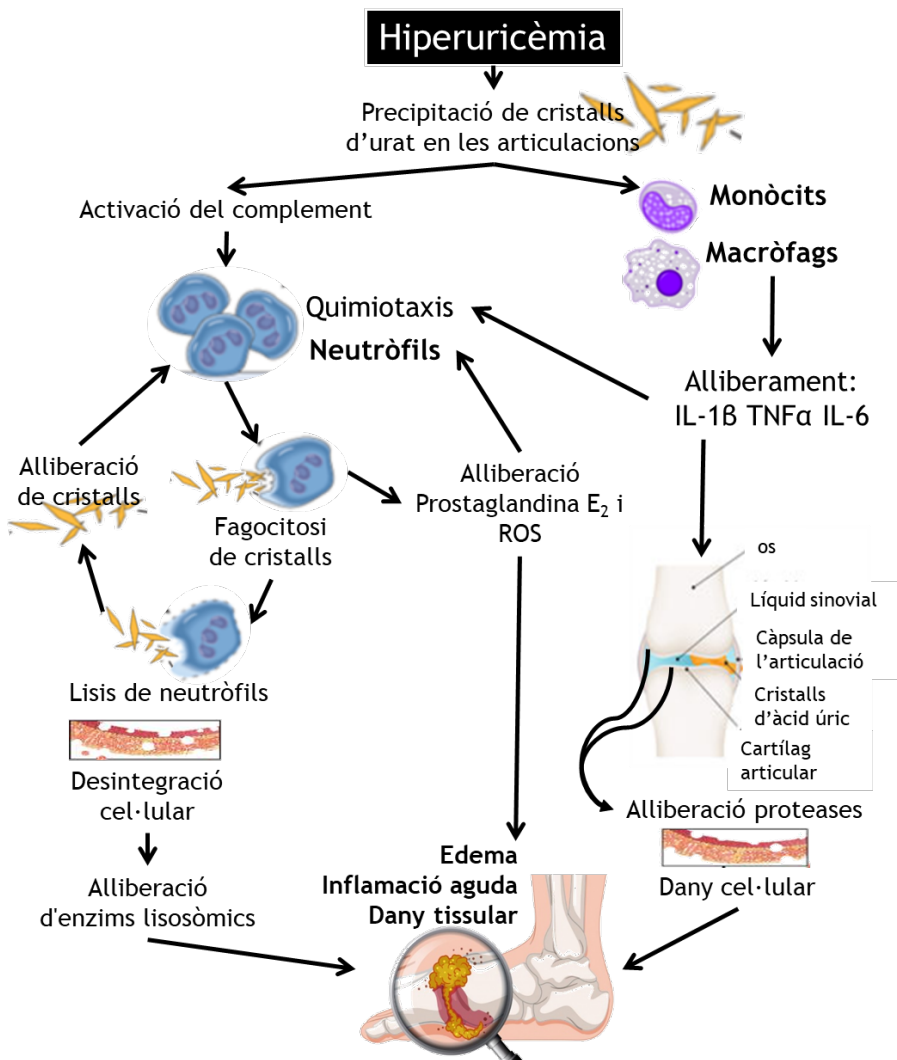


Figura 8: Resposta immunitària innata en l'artritis gotosa
(Modificada de Devlin, 2000)

Així doncs, la resposta inflamatòria aguda en la gota és amplificada per l'activació de macròfags, neutròfils, mastòcits i cèl·lules NK, donant lloc a l'alliberació de ROS, citocines proinflamatòries i enzims lisosomals,

entre altres (figura 9). No obstant, aquestes cèl·lules també són responsables de la secreció de citocines antiinflamatòries i mediadors lipídics que donen lloc a l'inici de la fase de resolució. En aquest sentit, les trapes extracel·lulars de neutròfils participen també en l'inici d'aquesta contraregulació de la inflamació, ja que una vegada formats els agregats cel·lulars es poden degradar la majoria de citocines proinflamatòries (Dalbeth *et al.*, 2016).

1.4.1.2. Resposta immune adaptativa en la gota

Aquesta resposta immune realitza la seua funció mitjançant les cèl·lules plasmàtiques, que segreguen anticossos (immunitat humoral) i cèl·lules T efectores (immunitat cel·lular) (Yao *et al.*, 1995).

S'ha observat que els cristalls d'MSU són capaços d'activar directament cèl·lules T. És per això que la deposició de cristalls d'MSU als teixits articulars produeix directament sinovitis i destrucció cel·lular. Les cèl·lules T activades pel lligant del receptor activador per al factor nuclear kappa-B (RANKL) que activa la diferenciació a osteoclasts (Lee *et al.*, 2011). Recentment, s'ha descobert que la destrucció de l'os en l'artritis gotosa es deu en part a l'activació d'aquests receptors per les cèl·lules T (Chen *et al.*, 2017).

Les cèl·lules Th17, identificades per la secreció d'IL-17, tenen un paper clau en l'artritis reumatoide, la psoriasi, l'artritis idiopàtica juvenil i altres malalties autoimmunitàries. Les dades recents també han assenyalat que els cristalls d'MSU són capaços de diferenciar i activar Th17 en presència d'IL-1 α / β i IL-18. A més, la caspasa-1 és també essencial per a les respostes de Th17 (Conforti-Andreoni *et al.*, 2011).

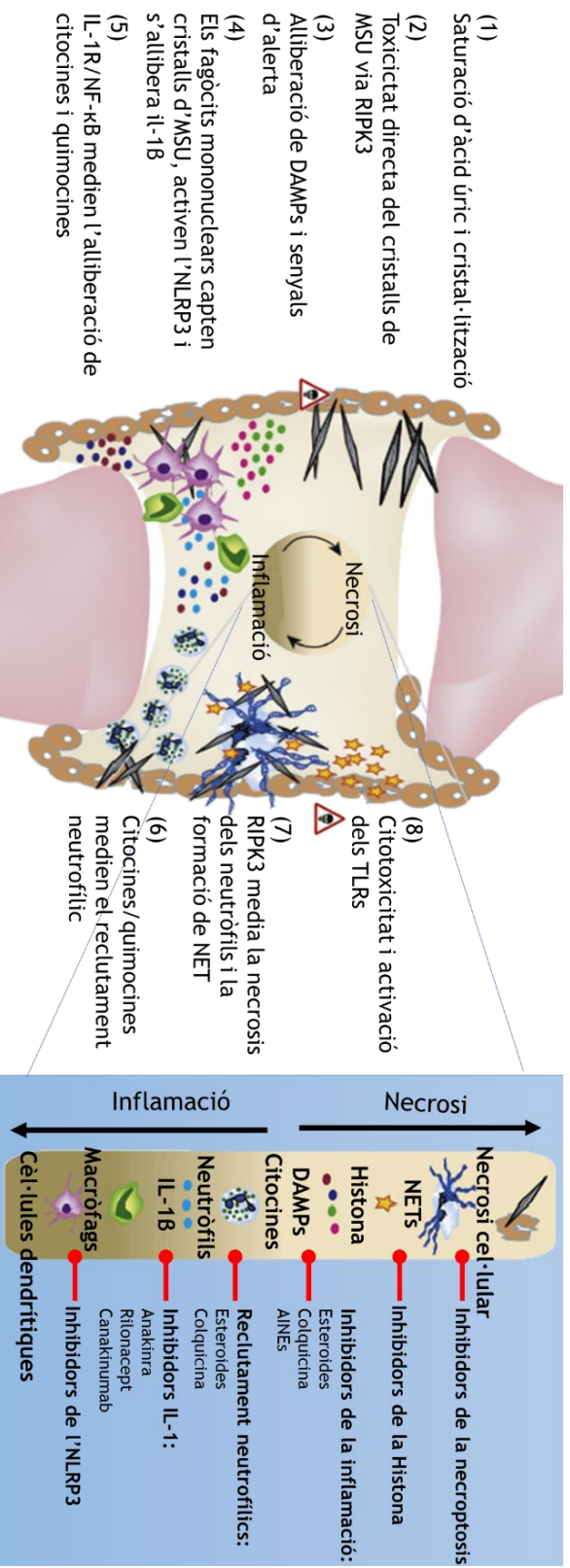


Figura 9: Inflamació en la gota aguda i principals dianes terapèutiques. En la formació de cristalls d'MSU estan involucrats la hiperuricèmia i les anomalies estructurals (1). L'MSU genera citotoxicitat sobre les cèl·lules epitelials al activar RLPK3, així formen el necroptosoma i pertorben les membranes cel·lulars (2). La mort de cèl·lules epitelials allibera patrons moleculars associats a danys (DAMPs), desencadenant el senyal d'alerta (3). Els fagòcits mononuclears capturen l'MSU, que activa l'NLRP3 i la secreció d'IL-1β i IL-1α (4). Les IL-1 activen els IL-1R de la superfície de les cèl·lules parenquimàtiques i immunes per segregar mediadors proinflamatoris (5). Els mediadors, promouen el reclutament de neutròfils (6) que per l'MSU produeixen necroptosi i formació de NET. Els neutròfils i les xarxes necròtiques alliberen mediadors proinflamatoris com proteases lítica i histones citotòxiques, que contribueixen a l'autoamplificació de la necroinflamació. (Modificada de Desai *et al.*, 2017)

Els cristalls d'MSU poden també estimular les cèl·lules T CD8⁺ i desencadenar una fagocitosi intensa, que indueix citocines proinflamatòries. En aquest sentit, s'ha vist que en els pacients amb gota, les cèl·lules T CD8⁺ es localitzen en les zones fibrovasculars on hi ha presència de cristalls d'urat. Aquests cristalls també poden augmentar l'expressió de molècules coestimuladores de les cèl·lules presentadores d'antigen (APC), com ara les cèl·lules dendrítiques que, al seu torn, activen les cèl·lules T CD8⁺ (Chen *et al.*, 2017).

En contrast amb les cèl·lules T efectores, les cèl·lules T reguladores (Tregs) suprimeixen la diferenciació dels osteoclasts i regulen l'activitat de les cèl·lules T efectores secretant les citocines IL-4, IL-10 i TGF- β (*transforming growth factor β*). Les cèl·lules Treg CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ eviten la resposta immunitària excessiva suprimint i regulant la resposta immune (Wang *et al.*, 2013; Luo *et al.*, 2011).

Respecte a l'immunitat humoral, les cèl·lules B afavoreixen la cristallització mitjançant la generació d'immunoglobulines, que s'uneixen als cristalls d'MSU i acceleren la resposta immune adaptativa en la gota. Altres estudis han posat de manifest que els pacients amb gota poden també generar anticossos front als cristalls d'MSU. Així mateix, s'ha demostrat que es pot trobar una gran quantitat de cèl·lules B CD20⁺ al voltant del teixit afectat pels cristalls. Aquestes dades indiquen que els limfòcits B, com a cèl·lules immunes específiques, estan implicats en la resposta immune adaptada de l'artritis gotosa (Chen *et al.*, 2017).

1.4.2. L'inflamasoma i la caspasa-1 en l'artritis gotosa

Els inflamosomes són complexos multiproteics d'alt pes molecular que es localitzen al citosol cel·lular. Aquests actuen assemblats per una molècula central que recluta directament o indirectament l'enzim caspasa-1. Basant-nos en la naturalesa d'aquest acoblament central, distingim diferents tipus d'inflamasomes (Martinon, 2010).

En concret, un inflamasma està definit per la seua proteïna sensor o receptor de reconeixement de patrons (PRR), que s'activa en resposta a estímuls nocius. Així, els PRR reconeixen la presència de components microbians, anomenats patrons moleculars associats al patogen (PAMPs), o patrons moleculars associats als danys (DAMPs), desencadenant tots ells una cascada de respostes inflamatòries dirigides a eliminar l'agent causant i reparar els teixits danyats (Franchi *et al.*, 2009).

Fins ara es coneixen els inflamosomes NLRP1, NLRP3, NLRP6, NLRP7, NLRP12, NLRC4, AIM2 (*Absent in melanoma 2*) i IFI16 (*Gamma-interferon-inducible protein-16*) (Winkler i Rösen-Wolff, 2015). Tres d'aquests tipus d'inflamasomes, l'inflamasoma NLRP1 (també conegut com a NALP1), l'inflamasoma NLRP3 (també conegut com a NALP3) i l'inflamasoma NLRC4 (també conegut com a IPAF), estan constituïts pel PRR tipus NOD-like (NLR) (*Nucleotide-binding Oligomerization Domain-like receptor*). Els NLR són una família de receptors citosòlics reguladors de la immunitat innata crucials per detectar l'estructura microbiana i els senyals d'estrès (Kelley *et al.*, 2019).

Com s'ha comentat anteriorment, l'inflamasoma NLRP3 té un paper crucial en la resposta immune innata en la gota, activant la caspasa-1 i la secreció de les citocines proinflamatòries IL-1 β / IL-18 com a resposta al dany cel·lular induït pels cristalls d'MSU (Chen *et al.*, 2017).

1.4.2.1. Inflamasoma NLRP3

L'inflamasoma NLRP3 està constituït principalment per tres parts (figura 10):

- L'NLRP3, amb el receptor de reconeixement NLR, amb un domini piridina.
- La proteïna adaptadora d'apoptosi ASC (*Apoptosis-Associated Speck-Like Protein Containing a CARD*) on CARD (*caspase recruitment domain*) és un domini d'activació i reclutament de la caspasa per l'extrem N-terminal.
- La proteasa (procaspasa-1).

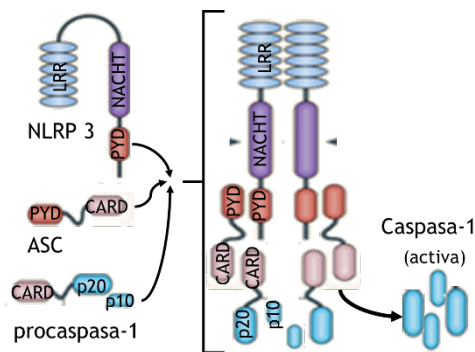


Figura 10: Model simplificat de l'estructura i activació de l'inflamasoma NLRP3 (Modificada d'Anders i Muruve, 2011)

El receptor citosòlic NLR roman en una conformació inactiva fins que el senyal extern o intern desencadena el seu canvi i muntatge conformacional. És la bastida sobre la que es conforma l'inflamasoma NLRP3.

L'NLR està constituït per tres dominis característics: el domini de repetició ric en leucina (LRR), que és una regió implicada en la detecció

de lligands; el domini central vinculant als nucleòtids (NACHT), que genera l'oligomerització; i un domini implicat en la captació de la caspasa. Aquest darrer domini pot ser piridina (PYD), domini que interactua amb una altra PYD del nucleòtid ASC formant un complex. Al seu torn, per l'altre extrem l'ASC té un domini CARD, el qual s'uneix al domini CARD de la caspasa-1.

L'inflamasoma de l'NLRP3 s'activa en resposta a moltes toxines formadores de porus bacterians així com per una àmplia gamma d'estímuls DAMP, inclosos cristalls d'àcid úric, ATP (adenosina trifosfat) extracel·lular, sílice, adjuvants d'alumini i amiant (Yang *et al.*, 2018; Lee *et al.*, 2016; Winkler i Rösen-Wolff, 2015).

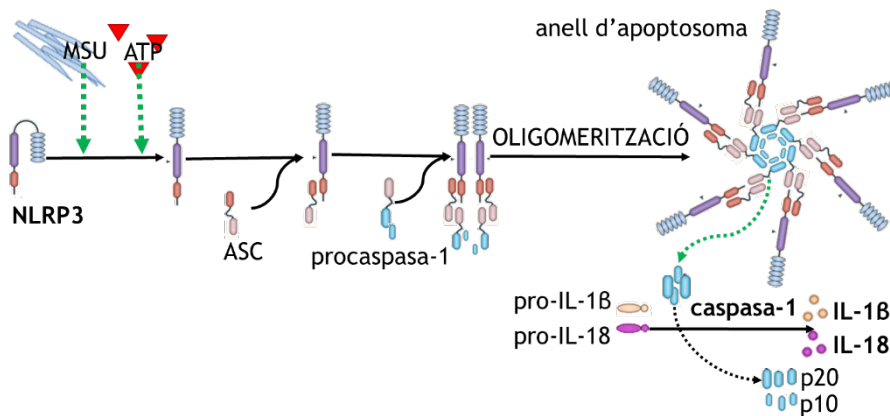


Figura 11: Canvi conformacional, oligomerització i activació de l'inflamasoma NLRP3. (Modificada d'Anders i Muruve, 2011)

L'activació d'NLRP3 s'inicia per un canvi conformacional, que promou l'oligomerització dels seus PYDs individuals (figura 11). Primer el senyal és detectat pel domini LRR de l'NLRP3, després s'activa trencant les interaccions del domini PYD de la resta de l'NLRP3. Una vegada el

domini PYD ja està lliure, pot reclutar l'ASC per interaccions PYD-PYD, formant un grup helicoïdal. Aquest procés requereix de molta energia, la qual forma una gran barrera energètica, que ajuda a evitar que el procés es produïska de forma espontània. En el receptor NLR està el factor activador Apaf-1 (*Apoptotic proteases, activin factor*) que conferirà l'estructura quaternària d'anell d'apoptosoma on ja es podran reclutar la procaspasa-1 inactiva mitjançant la unió CARD-CARD, apropant-les a les proximitats per induir la seua dimerització i activació (Bolívar *et al.*, 2019; Mankan *et al.*, 2012).

1.4.2.2. Caspasa-1

Les caspases són una família de proteases implicades en la inflamació i l'apoptosi. Es poden dividir en dos grups amb capacitat principalment apoptòtica o inflamatòria. La subfamília "inflamatòria" inclou les caspases humanes 1, 4, 5 i 12 i caspases murines 1, 11 i 12. L'agrupació gènica de les caspases inflamatòries es localitza al mateix locus cromosòmic (humà 11q22.1, ratolí 9A1) (Winkler i Rösen-Wolff, 2015).

o Components de la caspasa-1

La caspasa-1 està sintetitzada de forma inactiva com a un zimogen (procaspasa-1) en el citosol cel·lular. La procaspasa-1 alberga :

- Un domini d'activació i reclutament de la caspasa N-terminal (CARD) que és necessari per al reclutament i oligomerització per part de l'inflamasoma.
- Un domini gran intern (p20) que conté la subunitat catalítica amb el residu cisteïna (lloc actiu).
- Un domini C-terminal curt (p10) que alberga la subunitat catalítica.

Els tres dominis d'aquest precursor catalític estan separats per seqüències d'enllaç. Així mateix, l'activitat catalítica completa requereix el processament autoproteolític de la procaspasa-1 i posterior formació de l'heterotetràmer de la caspasa-1. Tal com revela l'anàlisi de l'estructura, la caspasa-1 activa es presenta com un tetràmer de dos dímers p20/p10 disposats simètricament. Els dímers p20/p10 es comuniquen a través d'un conjunt d'enllaços d'hidrogen mediat per interaccions hidrofòbiques. L'activació de la caspasa-1 s'inicia mitjançant l'autoprotòlisi induïda de les molècules precursors, que és orquestrada per l'inflamasoma (Bolívar *et al.*, 2019; Winkler i Rösen-Wolff, 2015).

○ Funció inflamatòria caspasa-1

La caspasa-1 és coneguda per la divisió proteolítica dels precursors pro-IL-1 β i pro-IL-18 en les seues formes actives:

- L'IL-1 β és un pirogen endogen que dona lloc a febre, migració de leucòcits i expressió de quimiocines. És produïda com a precursor inactiu proIL-1 β en el citoplasma.
- L'IL-18 és una endotoxina que estimula la producció de l'interferó γ (IFN γ). Endemés té la funció d'induir altres citocines proinflamatòries i activar les cèl·lules NK.

Curiosament, aquestes citocines no tenen un pèptid de senyalització i la seua secreció es realitza a través d'una via anomenada "secreció de proteïnes no convencional", que és independent de la via clàssica reticle endoplasmàtic (ER)/Golgi i requereix normalment l'expressió i l'activació enzimàtica de la caspasa-1.

La caspasa-1 contribueix també a la senyalització proinflamatòria mitjançant l'activació d'NF- κ B a través de diverses vies (Winkler i Rösen-Wolff, 2015):

- a) La secreció d'IL-1 β mediada per la caspasa-1 condueix a l'activació del receptor IL-1 i posterior activació de l'NF κ B (figura 12a).
- b) L'activació de la caspasa-1 dependent de l'adaptador tipus MyD88 (*Myeloid differentiation primary response 88*) indueix l'activació d'NF- κ B mediada pels *Toll-like receptors* (TLR) TLR2 i TLR4 (figura 12b).
- c) Les interaccions del domini CARD-CARD entre la procaspasa-1 i el receptor d'interacció protein cinasa 2 (RIP2) condueixen a l'activació d'NF- κ B independent de l'activitat enzimàtica de la caspasa-1 (figura 12c).
- d) La caspasa-1 activa proteolíticament a la caspasa-7, que al seu torn activa l'alliberament de la poli (ADP-ribosa) polimerasa 1 (PARP1) des de la cromatina i l'expressió dels gens dependents d'NF- κ B (figura 12d).

L'activació de la caspasa-1 també indueix un procés de mort cel·lular anomenat piroptosi (figura 12e). Es tracta d'una mort cel·lular programada i proinflamatòria dependent de caspasa-1 però independent de les caspases apoptòtiques. Es caracteritza per un augment de la mida cel·lular a causa de l'inflament osmòtic i la posterior ruptura de la membrana citoplasmàtica, amb el flux de DAMP endògens com ATP, IL-1 α o HMGB1 (*High mobility group box 1*), a l'espai extracel·lular (Winkler i Rösen-Wolff, 2015). A més, altres proteïnes citosòliques com la lactat deshidrogenasa (LDH) són alliberades (Rayamajhi *et al.*, 2014).

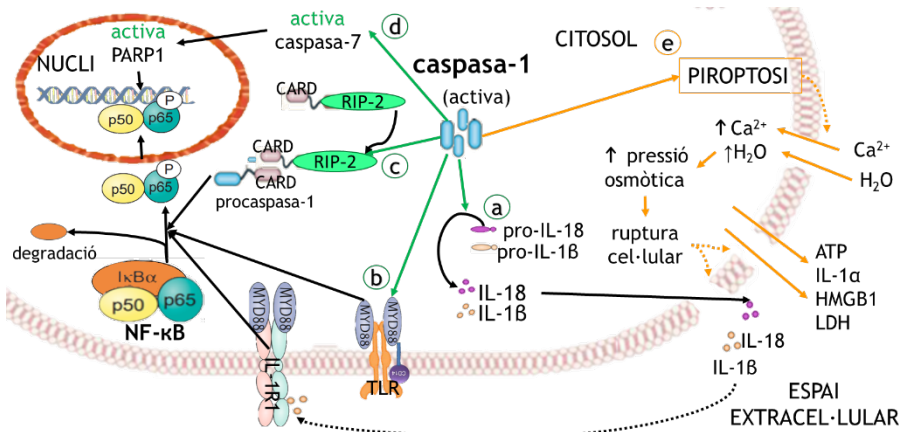


Figura 12: Efectes de l'activació de la caspasa-1. a) activació de les citocines proinflamatòries IL-1B i IL-18. L'IL-1B secretada activa al seu torn el receptor IL-1R que posteriorment activa l'NF-κB. b) La caspasa-1 activa els TLR (mitjançant l'adaptador MyD88 que indueix l'activació de l'NF-κB. c) Interacció domini CARD de la caspasa-1 amb el CARD de RIP2 que dona lloc a l'activació de l'NF-κB. d) Caspasa-1 activa la caspasa-7, la qual activa la PARP1 que potencia l'expressió dels gens dependents d'NF-κB. e) Procés de piroptosi (Modificada Conforti-Andreoni *et al.*, 2011)

○ **Funció antiinflamatòria**

L'activació de la caspasa-1 també pot participar en la reparació de teixits i la citoprotecció mitjançant l'activació del factor de creixement del fibroblast 2 (FGF-2), peroxiredoxina-1 i tioredoxina. A més, s'ha descrit que l'activació de la via NLRP3/caspasa-1 en les cèl·lules fagocítiques condueix al processament de la pro-IL-37 a l'IL-37, potent inhibidora de la immunitat innata, que redueix l'expressió de quimiocines i citocines proinflamatòries, inclosa la IL-6, podent formar part d'un bucle de retroalimentació negativa afectant el conjunt inflamàsoma NLRP3 (Winkler i Rösen-Wolff, 2015).

1.4.2.3. Senyalització NLRP3-caspasa-1 pels cristalls d'MSU

La senyalització per l'IL-1 β juga un paper molt important en la hiperalgèsia i en la inflamació induïda per cristalls d'MSU i de CPPD (*calcium pyrophosphate dihydrate*) (Lee *et al.*, 2016; Torres *et al.*, 2009).

En ratolins deficients en components de l'inflamasoma, com la caspasa-1, l'NLRP3 o l'ASC, es veu reduïda la capacitat dels cristalls per a induir la producció de l'IL-1 β . De la mateixa manera, la deficiència d'algun dels components d'NLRP3 perjudica el reclutament de neutròfils després de la injecció de cristalls d'àcid úric, demostrant que l'inflamasoma NLRP3 contribueix a la inflamació *in vivo* (Martinon, 2010).

La participació de l'inflamasoma en la resposta a l'MSU es pot dividir en dues fases o senyals (Yang *et al.*, 2018):

- Senyal 1 o de preactivació: transcripció de tots els elements i muntatge de l'inflamasoma.
- Senyal 2: Activació de l'NLRP3 i de la caspasa-1 donant lloc a la maduració de l'IL-1 β i IL-18.

La interacció entre els dos senyals és una característica clau per a la majoria dels inflasomes que contribueix a l'especificitat de la resposta evitant vies inapropiades (So i Martinon, 2017) (figura 13).

Senyal 1: Transcripció i muntatge de l'inflamasoma

Les vies de senyalització mediades per receptors de superfície cel·lular, coordinen la resposta immune innata. Els receptors més implicats en la inflamació de l'artritis gotosa són els TLR2 i TLR4, unitats transmembrana situats en la superfície cel·lular que reconeixen PAMPs o

DAMPs extracel·lulars (So i Martinon, 2017). Concretament, en el cas de la gota s'ha suggerit que el reconeixement de l'MSU es du a terme per part dels TLR2 i TLR4. Aquests regulen la inflamació mitjançant el reconeixement de lligands en monòcits i macròfags per a produir pro-IL-1B, a més a més de donar lloc a la producció de CXCL-1 (*C-X-C motif chemokine ligand 1*) (So i Martinon, 2017; Ghaemi-Oskouie i Shi, 2011). Endemés, alguns estudis indiquen que els macròfags juguen un paper clau en el reconeixement de cristalls d'MSU per part de la família dels TLR2 i TLR4 a través de MyD88, implicada en l'atac de gota agut (Dinesh i Rasool, 2017).

Els TLRs activen també l'NF- κ B via MyD88. L'activació d'aquest factor de transcripció controla la inducció de citocines i quimiocines proinflamatòries, l'activació transcripcional de l'inflamasoma (So i Martinon, 2017) i modificacions posttranslacionals (Kawai i Akira, 2007). En l'atac agut de gota, aquest primer pas és necessari per a la producció de la pro-IL-1B i la seua maduració regulada per l'NLRP3 (Wang, Y. *et al.*, 2019, Winkler i Rösen-Wolff, 2015).

D'altra banda, a partir d'aquesta activació pels patrons de reconeixement TLR, el senyal d'activació de l'inflamasoma arriba al citosol cel·lular i és reconegut pel receptor citosòlic de reconeixement de patrons. En els macròfags, el sensor de l'MSU es troba possiblement en el domini dels fragments de repeticions rics en leucina de l'inflamasoma NLRP3. L'LRR se situa en el C-terminal de l'inflamasoma, aleshores s'inicia l'acoblament de l'inflamasoma NLRP3 (Ghaemi-Oskouie i Shi, 2011).

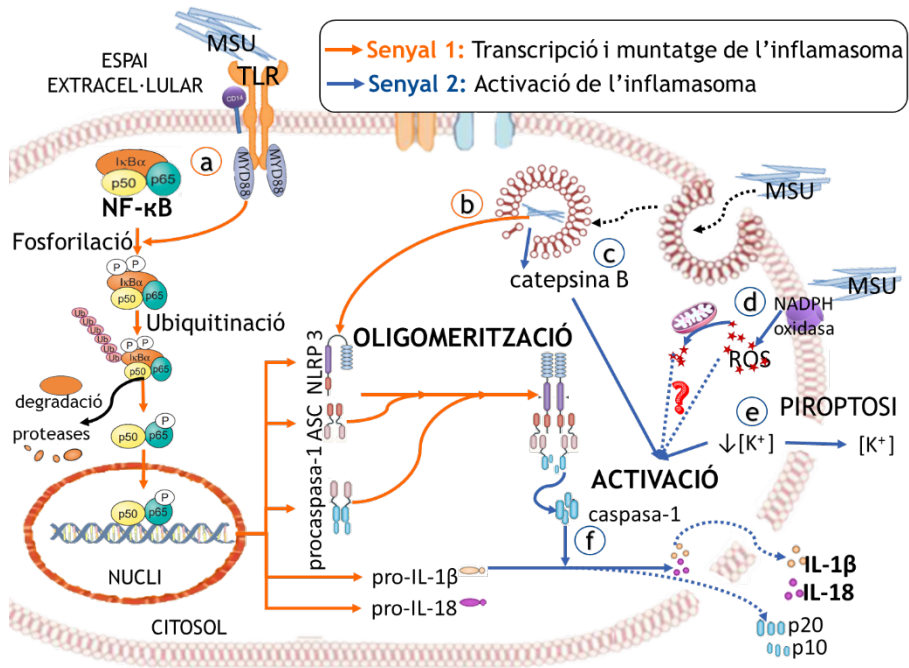


Figura 13: Senyalització NLRP3-caspasa-1 pels cristalls d'MSU. Senyal 1: transcripció i muntatge de l'inflammasoma; a) activació dels TLR per l'MSU, activació i translocació al nucli de l'NF-κB, transcripció dels components de l'inflammasoma NLRP3 i les citocines inactives pro-IL-1β i pro-IL-18. b) reconeixement de l'MSU pel domini LRR de l'NLRP3. Senyal 2: Activació de l'inflammasoma; c) per l'alliberament de la cathepsina B al citosol cel·lular; d) per la producció de ROS i e) per l'eflux del potassi a l'espai extracel·lular; f) activació de les citocines IL-1β i IL-18 per la caspasa-1 activa. (Modificada Conforti-Andreoni *et al.*, 2011)

Senyal 2: activació de l'inflammasoma

Es necessita un segon senyal per a l'activació de l'inflammasoma en l'atac agut de gota causat pels cristalls d'MSU i així donar lloc a l'activació de la caspasa-1 per alliberar IL-1β i IL-18 (Yang *et al.*, 2018; Winkler i

Rösen-Wolff, 2015). Aquest senyal és més específic que el senyal 1 i condueix directament a l'agregació i la polimerització posttranscripcional i translacional dels components dels inflamosomes. Els mecanismes mitjançant els quals els cristalls MSU desencadenen el senyal 2 per promoure l'activació NLRP3 són encara poc coneguts. Tanmateix, hi ha diversos passos previs a l'activació d'NLRP3, que s'ha vist que són sempre els mateixos.

Un aspecte de l'activació directa de l'inflamasma pels cristalls d'MSU és com els cristalls, que estan principalment en l'espai extracel·lular, arriben a entrar en contacte amb l'inflamasma intracel·lular. S'ha proposat que els fagolisosomes creats en els macròfags per a digerir l'MSU, al ser inestables, permeten l'alliberació a l'espai intracel·lular dels cristalls fagocitats. L'alliberació d'aquests sòlids al citosol produeixen, al mateix temps, l'alliberament del contingut lisosòmic, incloent la catepsina B, la qual per si mateixa pot dirigir l'activació de l'NLRP3 (Hari *et al.*, 2014; Ghaemi-Oskouie i Shi, 2011). No obstant això, diversos informes recents han suggerit que la ruptura lisosòmica i alliberament de catepsina B no són essencials per a l'activació inflammatòria d'NLRP3 mediada pels cristalls (Hari *et al.*, 2014).

La majoria dels activadors identificats d'NLRP3, inclosos els MSU, desencadenen diverses reaccions. A part de la mencionada ruptura lisosòmica, s'ha proposat que l'NLRP3 pugui detectar un conjunt de canvis cel·lulars que desencadenen l'inici de la inflamació. Fins al moment, s'ha identificat l'obertura de membrana plasmàtica en la formació de porus del canal iònic, que donen lloc a l'eflux de potassi a l'espai extracel·lular. Per tant, la piroptosi pot amplificar la resposta inflammatòria per part de l'activació de l'NLRP3, a més de facilitar l'alliberament de citocines, inclosa l'IL-1 β . Així, aquesta via contribueix a instaurar la inflamació en la gota (So i Martinon, 2017; Martinon, 2010).

Uns altres possibles intermediaris per a l'activació de l'NLRP3 són la pertorbació mitocondrial i les ROS. Curiosament, l'ús d'antioxidants inhibeix l'activació de l'NLRP3, fet que indica que la senyalització redox o l'estrès oxidatiu estan implicats en aquest procés (Martinon, 2010).

Aquest segon senyal, per tant, dona lloc a que la caspasa-1 active les citocines proinflamàtores IL-1 β i IL-18 descomponent els seus respectius precursors proteics, pro-IL-1 β i pro-IL-18 (So i Martinon, 2017).

1.4.2.4. IL-1 β com a mediador de la resposta inflamatòria

L'IL-1 β és una citocina clau en la gota que actua sobre diversos tipus de cèl·lules per obtenir respostes inflamàtores. La producció d'IL-1 β condueix al reclutament de monòcits i neutròfils als llocs del dany produït pels cristalls. Es tracta d'una resposta crucial per a combatre la infecció i restaurar l'homeòstasi dels teixits. No obstant això, la secreció sostinguda d'IL-1 β pot produir enzims que degraden la matriu i que acaben descomponent el cartílag i l'os. A nivell sistèmic, l'IL-1 β produeix febre com a resposta actuant directament en el centre de regulació de la temperatura a l'hipotàlem (Kelley *et al.*, 2019).

L'IL-1 β és produïda principalment per cèl·lules immunes innates i la seua senyalització en les cèl·lules diana es du a terme mitjançant la unió al IL-1R1. Una vegada activat, IL-1R1 i el seu coreceptor IL-1, proteïna accessòria del receptor (IL-1RAcP), recluten un complex de senyalització que comparteixen components amb les vies de senyalització dels TLR, la qual cosa comporta l'activació del factor de transcripció NF- κ B així com p38 i c-Jun N-terminal cinasa (JNK). Aquesta activació promou la regulació transcripcional de quimiocines i mediadors proinflamatoris que dirigeixen la resposta inflamatòria mediada per IL-1 (Kelley *et al.*, 2019).

Tot i que l'activació de l'inflamasoma és el mecanisme més caracteritzat que dona lloc a la maduració de l'IL-1 β en gota, sent l'NLRP3 el responsable de la producció de les citocines IL-1 β i IL-18 per l'MSU, cal dir que, a més de les caspases inflamatòries, altres proteases poden contribuir a la maduració d'IL-1 β (Ghaemi-Oskouie i Shi, 2011). Així, en absència de l'inflamasoma, els neutròfils poden processar pro-IL-1 β mitjançant l'activitat de proteases derivades de neutròfils com la proteïna-3 (PR3), també coneguda com mieloblastina, a més de l'elastasa i la catepsina G. Altres serina proteases, a més a més poden processar IL-1 β . Algunes metal·loproteïnases i granzim A també han estat proposats per desencadenar l'activació proteolítica d'IL-1 β .

La rellevància clínica de la inhibició d'IL-1 per al tractament de l'artritis gotosa es basa en dades de diversos estudis centrats en l'anticòs monoclonal anti-IL-1 β canakinumab o l'antagonista del receptor IL-1 (IL-1Ra) anakinra, que s'ha detallat en la secció anterior (So i Martinon, 2017).

1.4.3. Estrès oxidatiu en gota

La pertorbació del balanç iònic cel·lular, en particular la sortida de potassi a l'espai extracel·lular i l'entrada del calci al citoplasma cel·lular, és un tret característic dels inductors d'NLRP3. Aquesta pertorbació iònica produeix la generació d'espècies reactives d'oxigen mitocondrials (mtROS), pas previ a l'assemblatge del conjunt inflamasoma NLRP3 (figura 14).

A causa dels cristalls d'MSU, s'incrementa la producció de ROS i també la presència del leucotriè B₄ (LTB₄), el qual pot contribuir a l'augment de NEK7 (*NIMA-Related Kinase 7*), un membre de la família Serina/Treonina proteïna-cinasa. NEK7 s'uneix directament a l'NLRP3 i

podria ser un lligand comú activador d'aquest inflamàsoma (Chen *et al.*, 2019; So i Martinon, 2017).

Tot i això, el requisit de generació de ROS per a l'activació d'NLRP3 està sotmès a debat. La majoria dels estímuls que activen l'inflamàsoma augmenten els mtROS, i l'ús d'inhibidors de ROS, bloqueja l'activació de caspasa-1 dependent de l'NLRP3. Un estudi va demostrar que la generació de mtROS induïda pel tractament amb rotenona, inhibidor del complex I de la cadena d'electrons mitocondrials, era suficient per a activar NLRP3. No obstant això, els estudis que han utilitzat cèl·lules de pacients amb mutacions en subunitats de NOX, essencials per a la generació de mtROS, no presenten defectes en la senyalització d'NLRP3 (Bolívar *et al.*, 2019).

En altres experiments s'ha tractat amb lipopolisacàrid bacterià (LPS) per a induir l'expressió de NLRP3, observant que la inhibició de ROS impedeix que l'activació de l'inflamàsoma es duga a terme. Per tant, pot ser que la generació de ROS mitocondrials induïska una expressió d'NLRP3 suficient per permetre que l'inflamàsoma s'oligomeritze, però siga necessària un segon senyal per a produir l'activació. Per tant, la producció de mtROS i el dany mitocondrial juguen un paper important, a pesar de que siga de manera indirecta, en el muntatge de l'inflamàsoma NLRP3, proporcionant el senyal primari per a l'expressió NLRP3 i la producció del lligand intracel·lular NLRP3 (Bolívar *et al.*, 2019).

Pel que fa a la segona senyal, s'ha demostrat que l'ADN mitocondrial (mtDNA) oxidat s'uneix i activa l'inflamàsoma NLRP3. La producció del mtDNA oxidat resulta de l'expressió del gen Citidina/Uridina Monofosfat Cinasa 2 (CMPK2) dependent de TLR, que és necessària per a la síntesi *de novo* de l'mtDNA. mtDNA és altament susceptible a l'oxidació i fragmentació, i l'alliberament d'aquests fragments de mtDNA dels mitocondris condueix a l'activació d'NLRP3 (Bolívar *et al.*, 2019).

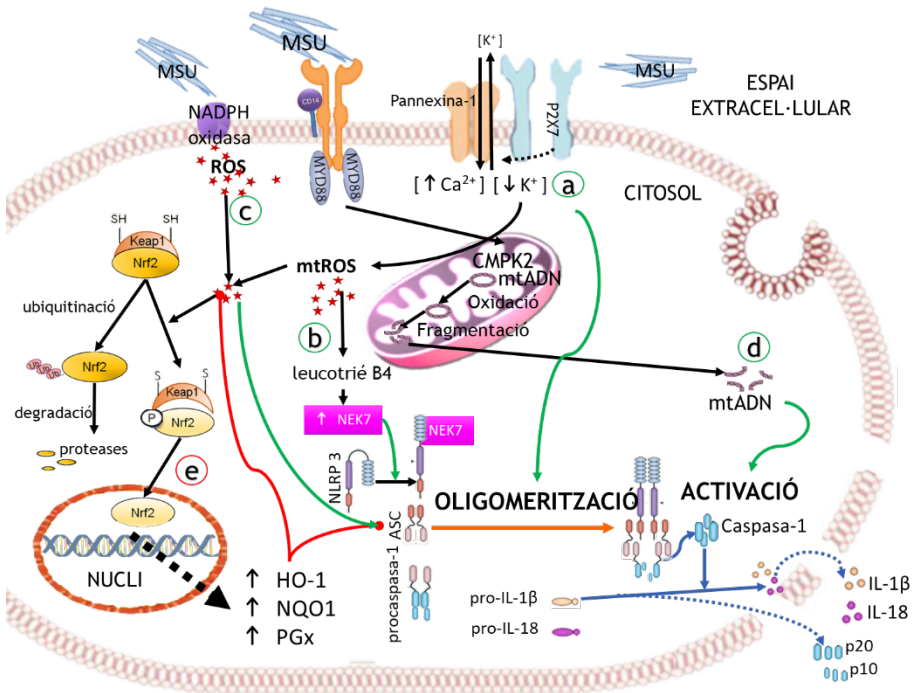


Figura 14: Estrès oxidatiu en gota. Activació de l'NLRP3, per la producció de ROS pels cristalls d'MSU. a) pertorbació del balanç iònic, sortida del potassi i entrada del calci al citoplasma cel·lular. b) activació dels ROS pels cristalls d'MSU, augment del LTB₄, que contribueix al augment de NEK7. NEK7 s'uneix al domini LRR per activa l'NLRP3. c) ROS indueixen l'expressió de l'NLRP3. d) l'mtADN fragmentat en el citosol, condueix a l'activació de l'NLRP3. e) l'Nrf2, es tranloca al núcli per a promoure la transcripció d'enzims citoprotectors com HO-1, NQO1 i GPx. (Modificada Conforti-Andreoni *et al.*, 2011)

Com hem vist, els cristalls d'MSU i molècules de senyalització de perill endògens condueixen a la generació de ROS intracel·lulars (Dinesh i Rasool, 2017). La generació de ROS està controlada per l'activació de de l'Nrf2 (*Nuclear factor erythroid 2-related factor 2*), una cremallera bàsica de leucina (bZIP) localitzada al citosol (Canning *et al.*, 2015). En les cèl·lules normals, Nrf2 es manté en un nivell basal mitjançant la

interacció directa amb la proteïna Keap1 (*Kelch-like ECH-associated protein 1*). Durant la generació intracel·lular de ROS, l'homeòstasi redox de les cèl·lules està controlada per la dissociació del complex Nrf2-Keap1 al citosol i la translocació d'Nrf2 al nucli seqüències de consens d'ADN anomenades ARE (*antioxidant responsive element*). Aquest enllaç condueix a controlar el potencial redox, ajuda a neutralitzar els radicals lliures que es generen, ja que regula la transcripció d'enzims citoprotectors com ara: HO-1 (*heme oxygenase 1*), NQO1 (*NADPH quinone oxidoreductase*), GPx (*glutathione peroxidase*) i SOD1 (*superoxide dismutase*). Diversos estudis han descrit que l'activació d'Nrf2 condueix a la supressió de factors clau implicats en la patogènesi de malalties inflamatòries.

S'ha demostrat que l'activació d'Nrf2 té un efecte regulador negatiu en el procés de preparació de l'inflamasoma NLRP3. D'altra banda, també s'han comprovat els efectes reguladors negatius sobre l'alliberament de la forma madura de l'IL-1 β per part de la caspasa-1 i el procés de transcripció de l'inflamasoma NLRP3 (Dinesh i Rasool, 2017).

Fins al moment, el paper del factor de transcripció d'Nrf2 en la inflamació per cristall MSU no s'ha estudiat en un aspecte terapèutic. Les discrepàncies en la regulació de l'inflamasoma NLRP3 i les evidències experimentals entre ROS i l'estat antioxidant són encara objecte de debat (Dinesh i Rasool, 2017). D'aquesta manera, s'obté el camí per entendre noves visions sobre la patogènesi de l'artritis gotosa i la teràpia dirigida mitjançant compostos a partir de derivats naturals que posseeixen propietats antiinflamatòries i antioxidants (Dinesh i Rasool, 2017).

Per a finalitzar aquest apartat, en la figura 15 es resumeixen les principals vies d'activació de la caspasa-1 comentades fins al moment, i el possible paper regulador de la resposta antioxidant.

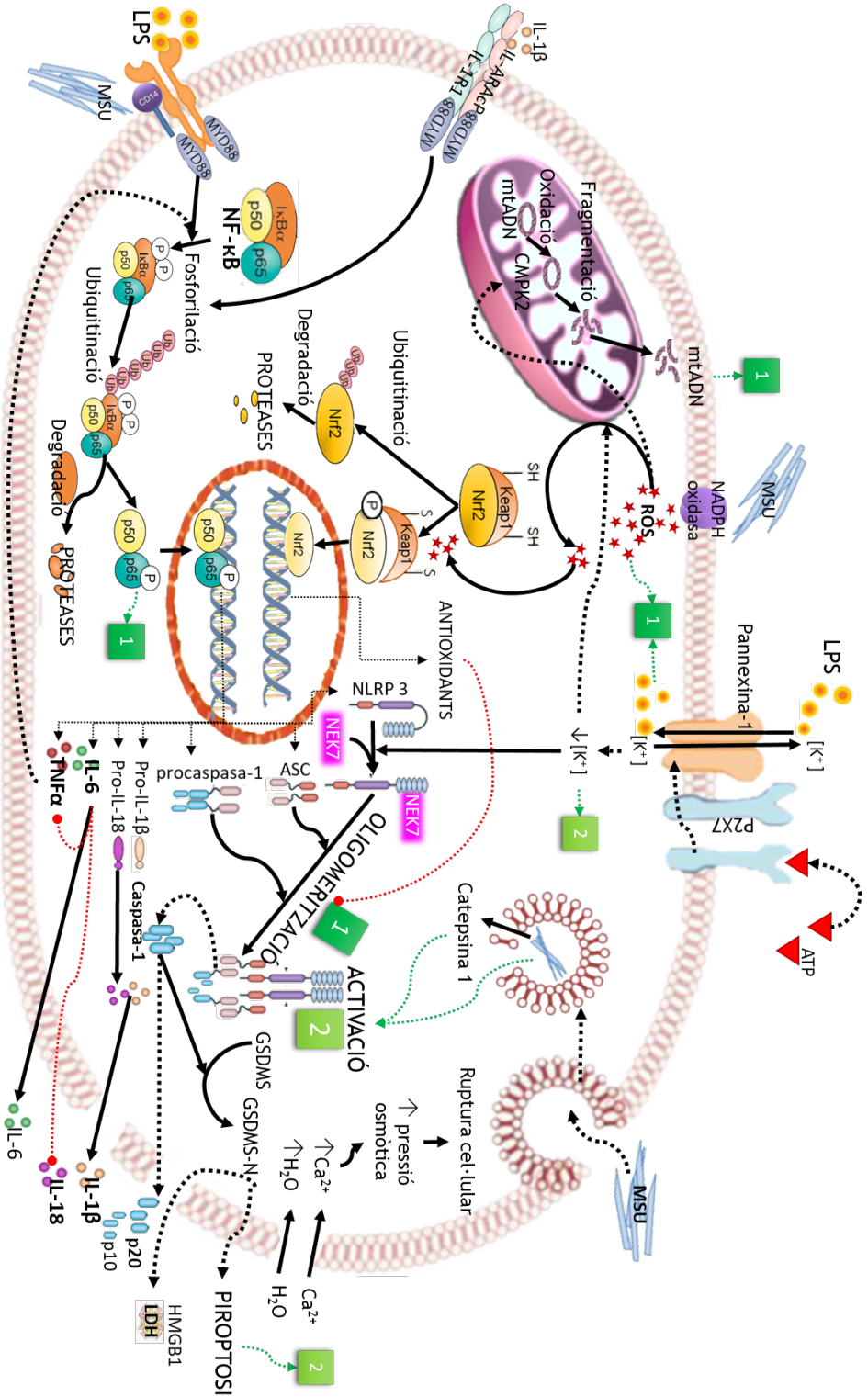


Figura 15: Vies d'activació de l'inflammasoma NLRP3. GSDMS, Gasdermin. (Modificada de Conforti-Andreoni et al., 2011)

1.4.4. Resolució de la inflamació

Una de les característiques de l'atac de gota és la seua capacitat autolimitant (Martinon, 2010). Si no es contraregula, el creixement de la inflamació aguda pot acabar en una tempesta de citocines, coagulació sistèmica, fallada d'òrgans i mort. L'augment de la necroinflamació induïda pels cristalls implica l'activació posterior de nombrosos immunoreguladors, que afavoreixen la resolució de la resposta inflamatòria aguda (Desai *et al.*, 2017).

En part, aquesta autoregulació ve promoguda per la dissolució dels cristalls a causa de la fagocitosi o per la unió dels cristalls a proteïnes amortidores.

Algunes d'estes proteïnes són la proteïna annexina A1, un potencial inhibidor de la fosfolipasa A₂, que disminueix la inflamació i afavoreix la resolució en models de gota en ratolí (So i Martinon, 2017).

Altres estudis han demostrat que la variació estacional de la concentració d' α_1 -antitripsina afecta la producció de citocines en pacients amb gota. L' α_1 -antitripsina, un membre de la superfamília de serpina que inhibeix moltes proteases del sèrum, es va trobar que inhibia la producció d'IL-1 β després del tractament amb cristalls d'MSU en ratolins (So i Martinon, 2017).

Altres factors que contribueixen a la resolució de la inflamació és la proteïna cinasa activada per AMP (AMPK) la qual contribueix al control de la gota mitjançant els seus efectes moduladors sobre l'IL-1 β i el control de la producció de CXCL1 regulada per macròfags. S'ha vist com l'adició d'un activador farmacològic d'AMPK va inhibir la inflamació mediada pels cristalls MSU en macròfags de ratolins (So i Martinon, 2017).

També en macròfags estimulats, els lligands dels receptors activats per proliferadors de peroxisomes (PPAR) són capaços de reduir l'expressió dels gens de citocines com TNF α , IL-1 β i IL-6, perquè actuen produint una repressió de la transcripció de nombrosos gens diana de l'NF- κ B (Terkeltaub, 2017).

Altres causes que contribueixen a l'autoregulació són l'apoptosi dels neutròfils i l'alliberament de citocines antiinflamatòries com el TGF- β durant la diferenciació dels monòcits (So i Martinon, 2017). És més, en pacients amb artritis gotosa, TGF- β 1, IL-10 i IL-1Ra es van associar amb la resolució espontània de l'artritis gotosa aguda.

Com s'ha comentat abans, l'IL-37 té un paper immunosupressiu potent en la patogènesi de models experimentals de gota, regulant l'alliberament de citocines i quimiocines proinflamatòries, reduint notablement el reclutament de neutròfils i monòcits, i mitigant la inflamació patològica de les articulacions. (Liu *et al.*, 2016).

Altres cèl·lules com els neutròfils tenen un doble paper en la inflamació produïda per la gota. En la fase inicial amplifiquen el senyal de la inflamació pel reclutament de més neutròfils; en la fase següent contribueixen a la resolució de la inflamació. En aquest sentit, la inhibició de la formació de NETs està relacionada amb la gota persistent o severa (Desai *et al.*, 2017).

1.5. MODELS EXPERIMENTALS D'ARTRITIS GOTOSA

Entre els diferents models animals d'artritis gotosa que existeixen, el més habitual, i el que se'emprarà en el present estudi consisteix en la inducció del procés inflamatori mitjançant la injecció de cristalls d'MSU en una de les potes posteriors dels ratolins. Aquest model permet simular les condicions d'un atac de gota aguda, podent mesurar tant canvis

morfològics com biomarcadors i mediadors proinflamatoris d'una forma ràpida i senzilla, així com estudiar nous principis actius per a la prevenció o el tractament de la malaltia (Lin *et al.*, 2018; Yang *et al.*, 2018; Lee *et al.*, 2016; 2017; Jiang *et al.*, 2017).

En la bibliografia es descriuen altres models experimentals per a l'estudi de la gota, en els quals es provoca la hiperuricèmia en els animals (Rasool i Varalakshmi, 2006). El més freqüent és produir la hiperuricèmia donant un inhibidor de la uricasa als animals de l'estudi (Lin *et al.*, 2018; Jiang *et al.*, 2017). Aquest tipus de model és molt útil per a l'estudi del tractament i/o prevenció de la fase d'hiperuricèmia asimptomàtica.

També hi ha estudis *in vivo* que no produeixen la gota com a tal, però es poden donar condicions similars, com en el cas del model de la bossa d'aire en ratolí (MAP, *mouse air pouch*) va en el qual es pot produir la inflamació per cristalls d'MSU (Yang *et al.*, 2018) o amb cristalls de CPPD per a assemblar-se a un quadre simptomatològic de la pseudogota (Kumagai *et al.*, 2001). De manera similar, es pot realitzar també l'estudi de la inflamació gotosa per injecció intraperitoneal de cristalls tant d'MSU com de CPPD (Martinon *et al.*, 2006).

Alguns autors també utilitzen la injecció de cristalls d'MSU en altres animals d'experimentació. En aquests casos també és habitual la via d'administració intraarticular en el genolls dels animals, com per exemple el conill (Singh *et al.*, 2017), en rates (Li *et al.*, 2019; Marcotti *et al.*, 2018) i en ratolins (Wang, J. *et al.*, 2019), on obtindrem les mateixes evidències al simular un atac agut de gota en humà. A més a més, hi ha alguns que a part d'injectar els cristalls d'MSU intraarticular també ho fan amb zimosan, com a desencadenant de la inflamació (Marchetti *et al.*, 2018).

D'altra banda, i per a aprofundir en l'estudi *in vitro* dels mecanismes involucrats en la gota, és habitual realitzar estudis en cèl·lules involucrades en les fases inicials de la gota, com ara els neutròfils o els macròfags. Així, són molt utilitzats els cultius primaris de macròfags peritoneals de ratolí o derivats de la medul·la òssia activats amb LPS i ATP, CPPD o MSU (Wang, J. *et al.*, 2019; Yang *et al.*, 2018; Martinon *et al.*, 2006). També són habituals els estudis en cèl·lules mononuclears de sang perifèrica o del fluid sinovial tractades amb MSU (Jin *et al.*, 2014). Curiosament, no es poden utilitzar línies cel·lulars de macròfags com les RAW 264.7 per a l'estudi de l'activació de l'inflamasoma, ja que en aquestes cèl·lules manca l'expressió del domini ASC (Pelegrin *et al.*, 2008).

2. MOLÈCULES AMB POTENCIAL INTERÈS EN EL TRACTAMENT DE L'ARTRITIS GOTOSA

2.1 DERIVATS CALCONA

Les calcones són un grup de compostos naturals fenòlics que pertanyen a la família dels flavonoides (figura 16). Aquests compostos amb estructura derivada d'1,3-difenil-2-propen-1-ona són de gran distribució a la naturalesa, encara que un gran nombre de derivats també s'han sintetitzat al laboratori.

Nombroses calcones han demostrat interessants propietats antiinflamatòries actuant sobre diverses dianes terapèutiques, com són les ROS, els enzims de la cascada de l'àcid araquidònic ciclooxigenasa (COX) i lipooxigenasa (LO), molècules d'adhesió, citocines proinflamatòries, i factors de transcripció, entre altres (Mahapatra *et al.*, 2017; Kontogiorgis *et al.*, 2008).

Concretament, estudis previs al nostre laboratori van demostrar l'efecte antioxidant i antiinflamatori de una sèrie de cloroquinolinil-calcons i dimetilamino-metoxicalcons, com a inhibidores de la migració neutrofílica i l'alliberament de LTB_4 , prostaglandina E_2 (PGE_2) i $TNF\alpha$ en la bossa d'aire de ratolí estimulada amb zimosan (Herencia *et al.*, 1998). L'estudi en profunditat d'alguns d'aquest derivats va posar també de manifest el seu efecte inhibidor de la inducció dels enzims òxid nítric sintasa induïble (iNOS), i COX-2, mitjançant la inhibició de l'activació de l' $NF-\kappa B$ (De León *et al.*, 2003; Herencia *et al.*, 2001).

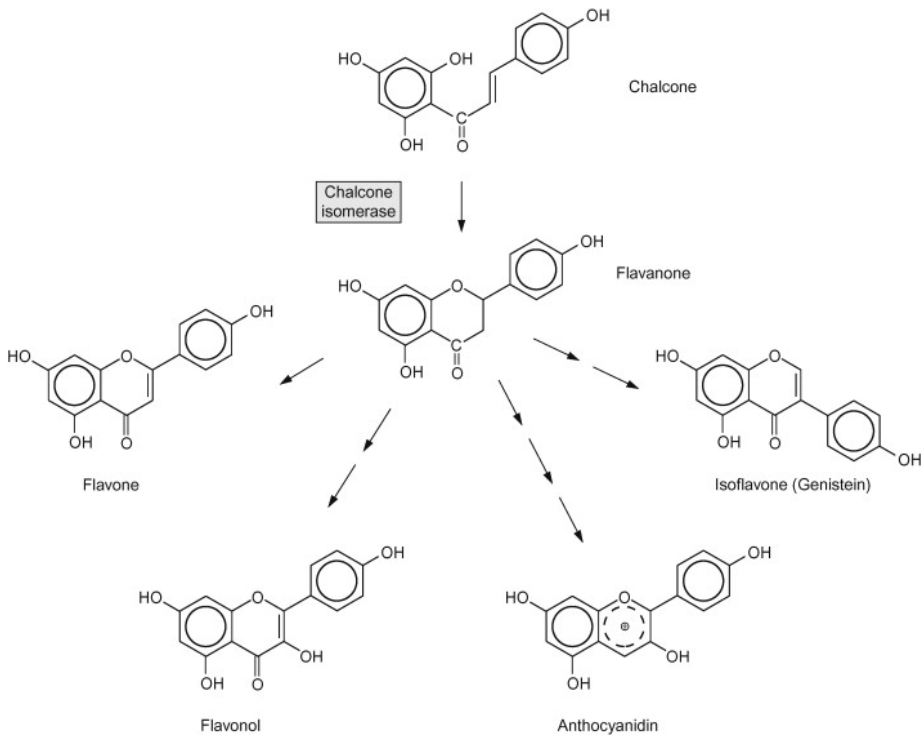


Figura 16: La calcona com precursor de diversos flavonoides.
(Heldt i Piechulla, 2011)

Paralelament, durant l'avaluació d'altres derivats dimetoxi i trimetoxicalcona amb diferents patrons de fluorització, es va demostrar l'interessant perfil antiinflamatori de 3,4,5-trimetoxi-4'-fluorocalcona en un model d'artritis crònica per inhibició de la inducció d'iNOS i de l'activació de l'NF- κ B (Rojas *et al.*, 2003; Rojas *et al.*, 2002). A més, cal destacar els resultats de l'estudi del mecanisme d'acció del derivat 3',4',5',3,4,5-hexametoxi-calcona, potent inhibidor de l'inducció d'iNOS i de l'activació de l'NF- κ B en macròfags estimulats amb LPS, que també dona lloc al augment de la expressió de l'enzim HO-1 i de l'activació d'Nrf-2 per un mecanisme independent de l'efecte antioxidant (Alcaraz *et al.*, 2004).

Com podem observar, derivats calcona amb diferents patrons de substitució, presenten característiques comunes respecte a la inhibició de l'expressió d'iNOS i de l'activació de l'NF- κ B. D'altra banda, es sabut que la producció d'NO en macròfags també està relacionada amb l'activació de l'inflamasoma i la caspasa, ja que l'alliberament d'IL-1 β i IL-18 condueix a l'activació de vies de senyalització cel·lular mediades per l'NF- κ B i per MAPK que donen lloc a la inducció d'iNOS (Ramachandran *et al.*, 2018).

En base a les premisses anteriors, en la present Tesi Doctoral hem decidit dur a terme l'estudi en profunditat del derivat 2,4,5-trimetoxi-2'-trifluorometilcalcona (CH) (figura 17), derivat fluorocalcona que va demostrar en els estudis de Rojas *et al.*, 2002 una potent inhibició de l'alliberament d'NO i de la inducció d'iNOS en macròfags.

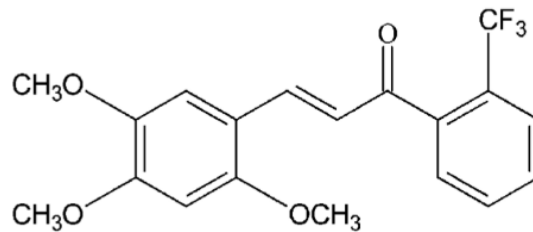


Figura 17: Estructura química de 2,4,5-trimetoxi-2'-trifluorometilcalcona (CH). (Rojas, *et al.*, 2002)

Així, el objectiu principal serà analitzar el possible efecte de CH sobre l'activació de la caspasa-1, l'alliberament de citocines proinflamatòries i l'activació de l'NF- κ B tant en macròfags com en models animals d'inflamació relacionats amb l'artritis gotosa. Paral·lelament, se determinarà el possible efecte de CH sobre la producció de ROS i l'activació d'Nrf2.

2.2 OSTEOSTATINA

En l'any 1941 es va observar com hi havia pacients oncològics que tenien nivells de calcèmia molt elevats, i per contra la fosfatèmia la tenien reduïda. Això era degut a que aquests tumors produïen l'hormona paratiroide (PTH), ja que a més presentaven símptomes d'hiperparatiroidisme. En contra, amb els avanços de les tècniques de detecció es va veure com aquests nivells eren normals i, així mateix, es va observar mitjançant tècniques immunohistoquímiques, que aquests tumors eren negatius a PTH, però afavorien la resorció òssia. Més

endavant, es va veure que l'activitat dels tumors *in vitro* estava antagonitzada per antagonistes de PTH, de tal forma que es tractava d'un pèptid amb capacitat per activar els receptors PTH, però no era la PTH.

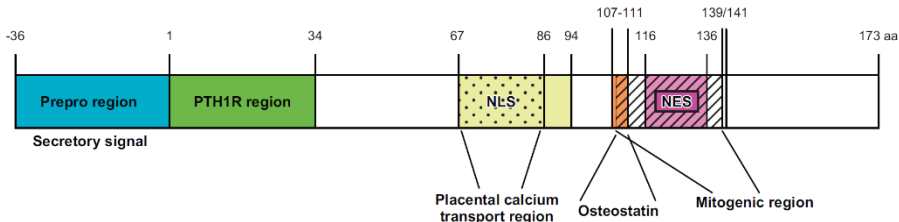


Figura 18: Dominis funcionals de la PTHrP. La regió Prepro (blava) inclou la senyal de la seqüència (-36 - 1 aa). La regió PTH-like PTH1R (verda) que s'uneix al receptor PTH1R (1 - 34 aa). La regió responsable del transport calci a la placenta és la regió puntejada (67 - 86 aa). La localització de la seqüència (NLS) (grogua) (67 - 94 aa), i la regió (NES) (rosa) (116 - 136 aa). La regió de l'osteostatina (taronja) (107 - 111 aa). La regió mitogènica en l'osteoblast i cèl·lules vasculares de la musculatura llisa (108 - 139 aa) (Martin, 2016)

Amb el pas dels anys es va seqüenciar la PTH i el pèptid relacionat amb la PTH (PTHrP) i es va poder observar que en els dos casos hi havia una homologia en la regió N-terminal corresponent als aa 1 - 34. Després d'aquest descobriment, es va continuar estudiant i es va veure que la regió d'aa 1 - 13 era la que es relacionava amb l'activació del receptor PTH tipus 1 (PTH1R) i que la regió amb els aminoàcid (aa) 29 - 34 era imprescindible per a la unió PTH-receptor. Per tot això, la PTH i la PTHrP tenen efectes homòlegs. A més, es va observar que aquesta proteïna estava present en molts teixits, la qual cosa feia sospitar que podia tenir altres funcions a part de la seua participació en el metabolisme ossi. Es va continuar investigant aquesta proteïna i es va revelar que en la regió C-terminal, més concretament els aa 107 - 139, va aconseguir reduir l'activitat dels osteoclastos i augmentava l'activitat dels osteoblastos.

Finalment, es va observar que aquest efecte estava provocat pel fragment C-terminal, concretament de l'aa 107 al 111. A aquesta regió se li va atorgar el nom d'osteostatina (figura 18) (Martin, 2016).

En les malalties en les quals hi ha un catabolisme ossi, s'ha estudiat el possible efecte terapèutic dels pèptids derivats de PTHrP. Així és que la PTHrP humana (1 - 34), ha donat resultats molt positius disminuint el risc de fractura (Leder *et al.*, 2015). Tot i això, podria ser que les propietats del PTHrP no sols resideixen en el fragment N-terminal, sinó també en el C-terminal. Tant és així, que en estudis amb ratolins s'ha vist que l'administració subcutània de PTHrP (107 - 111) (C-terminal) (figura 19) durant 2 o 4 setmanes és capaç de reduir la pèrdua de massa òssia en animals amb ooforectomia o amb tractaments amb glucocorticoides (de Castro *et al.*, 2012).

La PTHrP s'expressa abundantment en l'os, on exerceix un paper important en la formació i la remodelació òssia, de manera similar al PTH. De fet, la regió N-terminal de PTHrP mostra homologia amb la mateixa regió de PTH i interacciona amb el receptor comú de PTH tipus 1 (PTHr1). D'altra banda, la cua C-terminal relacionada amb PTHrP presenta diversos fragments que també poden actuar com a reguladors del metabolisme ossi mitjançant mecanismes independents a l'activació del receptor PTHr1 (Esbrit i Alcaraz, 2013). Entre aquests fragments, l'epítop PTHrP C-terminal 107-111 (anomenat osteostatina, OT) pot promoure la funció osteoblàstica mitjançant l'obertura de canals de calci dependents de voltatge, l'activació de proteïna cinasa C (PKC) i d'altres cinases (García-Martín *et al.*, 2013).

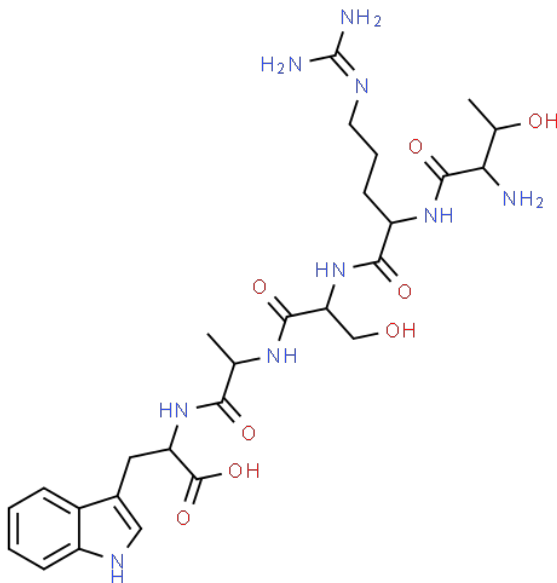


Figura 19: Estructura molecular de l'osteostatina [PTHrP (107-111)] (Royal Society of Chemistry, 2015)

L'osteostatina ha sigut estudiada en implants carregats amb el pèptid i ha demostrat tindre propietats osteogèniques (Ardura *et al.*, 2016). A més, recentment, s'ha observat *in vitro* com en ambients proinflamatoris és capaç de reduir la senescència de les cèl·lules i reduir els metabòlits proinflamatoris com l'IL-6, PGE₂, COX-2 i TNF α , així com d'inhibir l'activació de la via de l'NF- κ B (Platas *et al.*, 2017).

Aquestes propietats antiinflamatòries han estat demostrades *in vivo* en un model d'artritis en ratolí, on l'administració d'osteostatina, a més d'inhibir l'osteoclastogènesi, redueix el dany del cartílag, la resposta immunològica i l'alliberament de citocines proinflamatòries (Nácher-Juan *et al.*, 2019).

Totes estes característiques fan interessant aprofundir amb l'estudi de les propietats antiinflamatòries d'osteostatina tant a nivell de

l'activació dels macròfags com d'altres models d'inflamació aguda que permeten confirmar els mecanismes d'acció implicats en les seues propietats antiinflamatòries, ja que l'osteostatina pot ser una bona opció per a prevenir i tractar patologies articulars cròniques com son l'artritis gotosa, l'artritis reumatoide o l'artrosi, en la que existeix un component inflamatori i de degradació del cartílag i de l'os.

Objectius

En el capítol anterior s'han descrit els principals mecanismes fisiopatològics implicats en el desenvolupament de l'artritis gotosa. Paral·lelament, s'han posat de manifest diverses evidències que recolzen l'interès dels derivats calcona en el tractament de patologies inflamatòries. Endemés, investigacions recents han demostrat el possible efecte beneficiós del pèptid osteostatina en patologies articulars, encara que és necessari profunditzar en els mecanismes implicats. En vista d'aquests antecedents, plantejem l'estudi del derivat 2,4,5-trimetoxi-2'-trifluorometilcalcona i d'osteostatina com a potencials agents terapèutics en el tractament de l'artritis gotosa.

Per tot això, els principals objectius d'aquest treball han estat:

1. Estudiar en cultius *ex vivo* de macròfags peritoneals de ratolí, l'efecte d'ambdues molècules sobre l'estrès oxidatiu i diversos paràmetres inflamatoris involucrats en l'atac agut de gota, com ara citocines proinflamatòries, caspasa-1 i NF- κ B.
2. Aprofundir en l'estudi del mecanisme d'acció d'aquestes molècules i confirmar els resultats obtinguts en l'estudi *ex vivo*, mitjançant el model *in vivo* de bossa d'aire en ratolí induït amb cristalls CPPD.
3. Confirmar l'efecte beneficiós del tractament amb la calcona i l'osteostatina en el model *in vivo* d'artritis gotosa induïda per cristalls d'MSU.

Material i mètodes

1. PRODUCTES I ANIMALS D'EXPERIMENTACIÓ

1.1. PRODUCTES I REACTIUS

La fluorometilcalcona en estudi (composició = $C_{19}H_{17}O_4F_3$, pes molecular = 366,3304 g/mol) va ser proporcionada pel Professor José Domínguez del Laboratori de Síntesi Orgànica de la Facultat de Farmàcia de la Universidad Central de Venezuela. Per als estudis *ex vivo* en macròfags peritoneals, CH és preparada a una dilució $10^{-2}M$ amb MeOH a partir de la qual s'obtenen les concentracions finals $1 \mu M$ i $10 \mu M$ en medi de cultiu. Per als estudis *in vivo*, CH és dissolta en sèrum fisiològic a la concentració de $100 \mu g$ /bossa per al model de bossa d'aire i de $30 mg/kg$ per a la seua administració oral en el cas de l'artritis gotosa.

El pèptid osteostatina (Bachem, Bubendorf, *Switzerland*) és dissolt en sèrum fisiològic a una concentració de $10 \mu M$ a partir de la qual s'han fet les dilucions $100 nM$ i $500 nM$ en el medi de cultiu per als estudis en macròfags. En els estudis *in vivo* les dilucions d'osteostatina s'han realitzat sempre en sèrum fisiològic a les dosis de 3 o $6 \mu g$ /bossa per al model de bossa d'aire i de 80 o $120 \mu g/kg$ per a l'estudi de l'artritis gotosa.

La resta de materials i reactius emprats en la present Tesi Doctoral que no estan especificats en el corresponent apartat han estat adquirits de Sigma-Aldrich (Sant Louis, Missouri, USA).

1.2. ANIMALS D'EXPERIMENTACIÓ

Tots els estudis *in vivo* van ser realitzats d'acord amb la normativa de la Unió Europea sobre el maneig i ús d'animals de laboratori. Els protocols van ser aprovats pel Comitè Ètic d'Experimentació i Benestar Animal de la Universitat de València (Annexos I, II i III), seguint la normativa del Reial Decret 53/2013.

Per a tots els estudis s'han fet servir ratolins mascles de 20 - 25 g de pes i d'entre 10 i 12 setmanes d'edat, pertanyents a la soca C57BLACK6 (abreujada com C57BL/6 o *black 6*), adquirits del Laboratori Charles River (Écully; France) (figura 20). Aquests ratolins tenen un pelatge fosc, gairebé negre. Es tracta de la soca endogàmica de ratolí de laboratori més àmpliament usada per ser manipulada genèticament en l'estudi de les malalties humanes (Tur i Belozertseva, 2018).

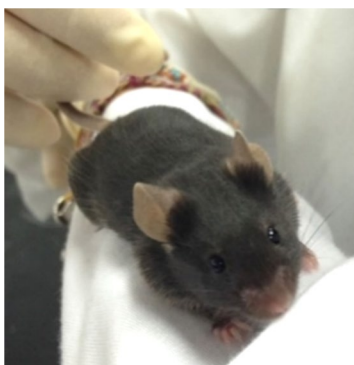


Figura 20: Ratolí de la soca C57BL/6 utilitzat per a l'estudi

Després del transport dels animals a les instal·lacions del Servei Central de Suport a la Investigació Experimental (SCSIE) en la Facultat de Farmàcia (Campus de Burjassot), els animals van estar un període d'adaptació d'una setmana, temps necessari per a l'estabilització de les seues funcions i paràmetre biològics. Els animals van ser convenientment

allotjats en gàbies de plàstic amb un llit adsorbent. En tot moment els animals es van mantenir en un ambient controlat en condicions estandarditzades de temperatura/humitat (22 ± 3 °C / 60 % humitat relativa constant) i cicles de llum/obscuritat de 12 hores. Els animals van ser cuidats i rutinàriament avaluats pels veterinaris i el personal acreditat de l'estabulari. Tots els ratolins van ser proveïts d'una dieta estàndard de pinso i aigua *ad libitum*.

2. MÈTODES D'ESTUDI *EX VIVO*

2.1. AÏLLAMENT I CULTIU DE MACRÒFAGS PERITONEALS

Per extraure les cèl·lules de la cavitat peritoneal es va injectar als ratolins C57BL/6 1 ml de tioglicolat estèril (al 3 % en aigua) per via intraperitoneal. Aquesta solució actua atraient cèl·lules del sistema immune, augmentant la població en aquesta cavitat. Depenent del temps al que es sacrifique a l'animal després de la seua administració, la població cel·lular majoritària pot variar. D'aquesta manera, a les 3 - 4 hores d'injectar el tioglicolat, la major part de cèl·lules que extraurem de la cavitat peritoneal seran neutròfils, mentre que si ho fem a les 72 - 96 hores, les cèl·lules més nombroses seran els macròfags (Martinon *et al.*, 2006).

2.1.1. Extracció

Per obtindre els macròfags, 96 hores després de l'administració del tioglicolat es sacrifiquen els animals. Es treballa en cabina de flux laminar (Telstar® Bio-II-A V6.03, Terrassa, *Spain*) en condicions estèrils

per evitar la contaminació dels cultius primaris. S'injecten 5 ml de tampó fosfat (PBS) estèril (Gibco™, Paisley, UK) en la cavitat peritoneal del ratolí, i es fa un massatge en la regió abdominal durant 2 minuts. A continuació, es realitza una petita incisió suficient per introduir una pipeta Pasteur de 3 ml i obtenir el fluid peritoneal. Una vegada recollida la major quantitat de fluid peritoneal, es realitzen nous rentats amb aproximadament 2,5 ml de PBS per extraure el major nombre de macròfags, evitant en tot moment la presència de sang. La suspensió recollida es centrifuga a 400xg durant 6 minuts a temperatura ambient, recollint el pellet, on estarà la població de cèl·lules.

2.1.2. Cultiu dels macròfags peritoneals i tractaments

Les cèl·lules es resuspenen en medi RPMI (*Roswell Park Memorial Institute Medium*) a 37 °C. Aquest medi RPMI té la característica de mantindre una àmplia gamma de cèl·lules de mamífers, en especial les hematopoètiques. A més, aquest medi es suplementa amb un 10 % de Sèrum Boví Fetal (SBF) i amb un 1 % d'antibiòtics (penicil·lina 100 U/ml i estreptomicina 100 µg/ml). Els macròfags es distribueixen a una concentració de 2×10^6 cèl·lules/ml en diferents tipus de plaques de cultiu (figura 21), en funció del protocol a realitzar, i es deixen durant 18 hores sota condicions controlades a l'incubador cel·lular (Galaxy RS Biotech, Samson Scientific, Ayrshire, UK) a una temperatura de 37 °C i atmosfera constant d'aire humidificat amb un contingut del 5 % en CO₂.

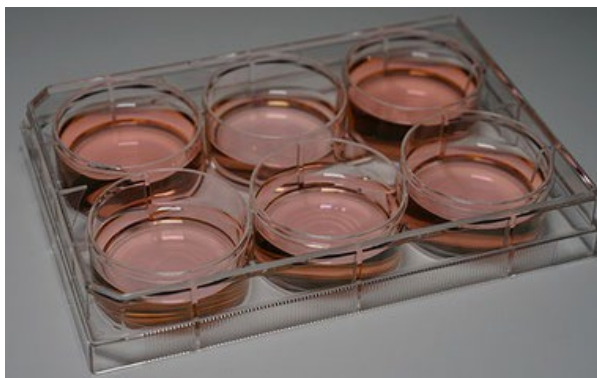


Figura 21: Placa de 6 pouets per als cultius de macròfags peritoneals

Passades les 18 hores en l'incubador, es canvia el medi per eliminar les possibles cèl·lules mortes que quedaran en suspensió i altres residus. Seguidament es realitza el pretractament amb CH (1 - 10 μM) o amb OT (100 - 500 nM) durant 30 minuts abans d'estimular amb LPS 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ durant 4 hores. Posteriorment, es realitza un canvi de medi amb RPMI sense SBF i s'estimula amb ATP 5 mM, durant 10 o 30 minuts. Aquest protocol, amb petites variacions, s'ha utilitzat per dur a terme les diferents proves *ex vivo*, com ara la determinació de citocines proinflamatòries, l'activació de caspasa-1, la generació de radicals lliures de l'oxigen i l'activació dels factors de transcripció NF- κB i Nrf2. En la figura 22 es resumeix l'esquema general del protocol.

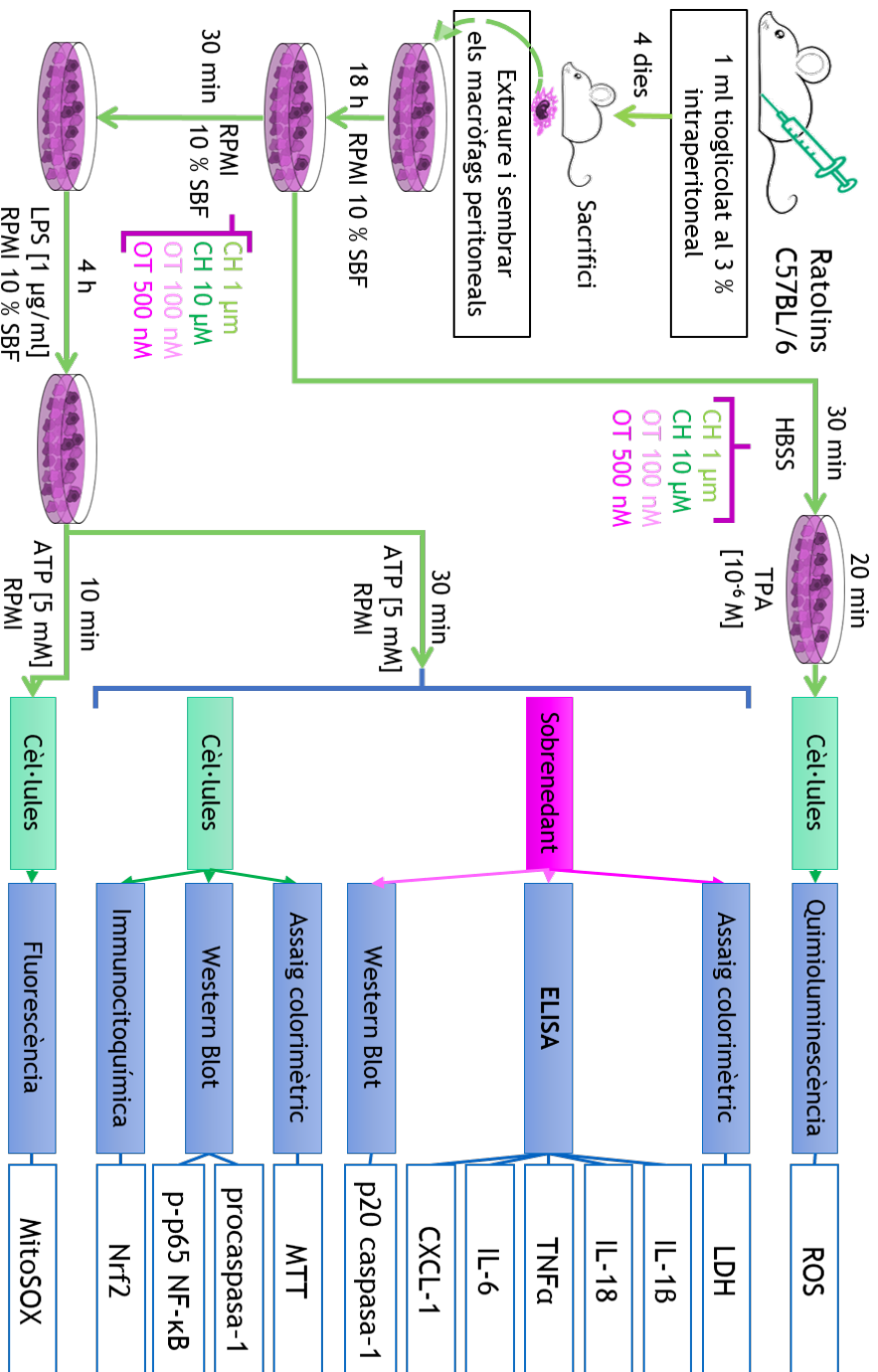


Figura 22: Esquema d'extracció, cultiu i activació dels macrofags peritoneals per a la realització de les diferents determinacions *ex vivo*

2.2. AVALUACIÓ DE LA CITOTOXICITAT DELS PRODUCTES PER L'ASSAIG D'MTT

Aquest assaig colorimètric consisteix en l'addició a les cèl·lules en cultiu d'una solució de la sal groga de tetrazole, el bromur de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difenil tetrazole (MTT), que és metabolitzada gràcies a l'activitat succinat-deshidrogenasa de les cèl·lules en proliferació per produir un producte insoluble de color violeta anomenat formazan (figura 23). L'assaig va ser originalment concebut per mesurar la proliferació cel·lular, tot i que posteriorment va ser modificat i adaptat per mesurar la citotoxicitat de determinats productes (van de Loosdrecht *et al.*, 1991; Jiao *et al.*, 1992). La intensitat colorimètrica resultant és directament proporcional a la viabilitat cel·lular. Per tant, la disminució d'aquesta intensitat en les cèl·lules exposades als productes avaluats respecte de les cèl·lules Control ens donarà el percentatge de toxicitat d'aquests productes.

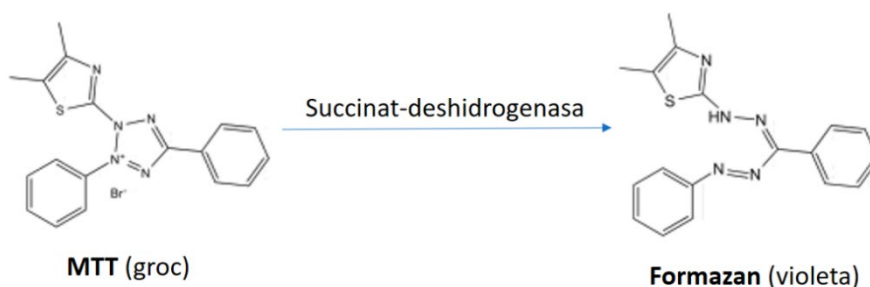


Figura 23: Reducció de l'MTT a formazan

2.2.1. Protocol assaig MTT

Els experiments es duen a terme en els macròfags peritoneals sembrats en plaques de 96 pouets (*T^C Platte 96 Well*, Sarstedt, Nümbrecht, *Germany*) a la concentració de 10^6 cèl·lules/ml (volum final 200 μ l). Transcorregut el temps de tractament i estímul corresponent amb LPS i ATP (apartat 2.1.2), es substitueix el medi dels pouets per una dilució d'MTT (200 μ g/ml) en medi de cultiu, incubant durant 1 hora en les condicions habituals. Posteriorment, es retira el medi i s'afegeix 100 ml de dimetilsulfòxid per solubilitzar el formazan (Borenfreund *et al.*, 1988) i quantificar amb l'ajuda d'un espectrofotòmetre VICTOR3™ V1420 (PerkinElmer, Finland), mesurant a una longitud d'ona de 531 nm. En aquest assaig es considera com el 100 % de viabilitat (o 0 % de toxicitat) l'absorbància obtinguda a partir de les cèl·lules no estimulades, establint-se els diferents percentatges de viabilitat per comparació amb els diversos tractaments.

2.3. AVALUACIÓ DE LA PIROPTOSI PER L'ASSAIG D'LDH

La lactat deshidrogenasa és un enzim citoplasmàtic estable present en totes les cèl·lules. És ràpidament alliberada al sobrenedant del cultiu cel·lular quan la membrana plasmàtica està danyada. En concret, l'activació de caspasa-1 provoca en els macròfags el fenomen de mort cel·lular anomenat piroptosi, caracteritzat per una ràpida formació de porus de membrana i alliberament de contingut intracel·lular a l'espai extracel·lular, incloent proteïnes citosòliques com l'LDH (Rayamajhi *et al.*, 2013). Per tant, aquest protocol ens permet determinar la piroptosi induïda per l'activació de la caspasa-1 després del tractament amb LPS i ATP, així com el possible efecte beneficiós dels productes en estudi.

Paral·lelament, els resultats serviran per completar l'estudi de citotoxicitat realitzat anteriorment amb el protocol d'MTT.

Per realitzar l'assaig enzimàtic, en primer lloc la forma oxidada de nicotinamida adenina dinucleòtid (NAD^+) és reduïda a NADH / H^+ per la conversió catalitzada per LDH de lactat a piruvat. En un segon pas un catalitzador transfereix H / H^+ de NADH / H^+ a la sal de tetrazole, la qual és reduïda a formazan (figura 24). La intensitat de color de la reacció és directament proporcional a l'activitat de l'LDH. Per tant, a major activitat major mort cel·lular.

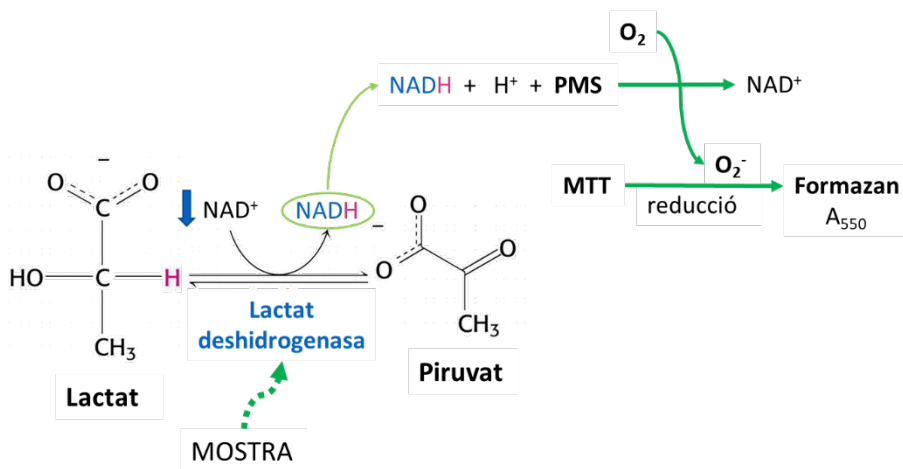


Figura 24: Reacció catalitzada per l'LDH (PMS: metasulfat de fenazina)

2.3.1. Protocol assaig LDH

En una placa transparent de 96 pouets s'afegeixen 50 μl dels sobrenedants dels macròfags peritoneals tractats amb LPS i ATP (apartat 2.1.2). Seguidament s'afegeixen 50 μl d'una solució de tampó Tris 0,2 M (pH 7,2) que conté 250 μg $\beta\text{-NAD}$, 1,2 mg d'àcid làctic, 130 μg MTT, i 30 μg de metasulfat de fenazina (PMS).

La placa és incubada a temperatura ambient i foscor, mesurant l'absorbància a 550 nm als 90 minuts. Es va mesurar l'absorbància amb l'ajuda d'un espectrofotòmetre VICTOR3™ V1420 (PerkinElmer, Finland).

2.4. DETERMINACIÓ DE CITOCINES PER ELISA

Per a aquest protocol, les cèl·lules són sembrades en plaques de 6 pouets (*T^C Platte 6 Well*, Sarstedt, Nümbrecht, Germany) (figura 21) a una concentració de 2×10^6 cèl·lules/ml/pouet. Una vegada les cèl·lules adherides són tractades amb els productes i estimulades amb LPS (apartat 2.1.2), es realitza el canvi de medi sense SBF (volum final 500 μ l) i s'estimula amb ATP 5 mM, durant 30 minuts. Finalment, els sobrenedants cel·lulars s'utilitzaran per determinar els nivells de diverses citocines per ELISA (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*).

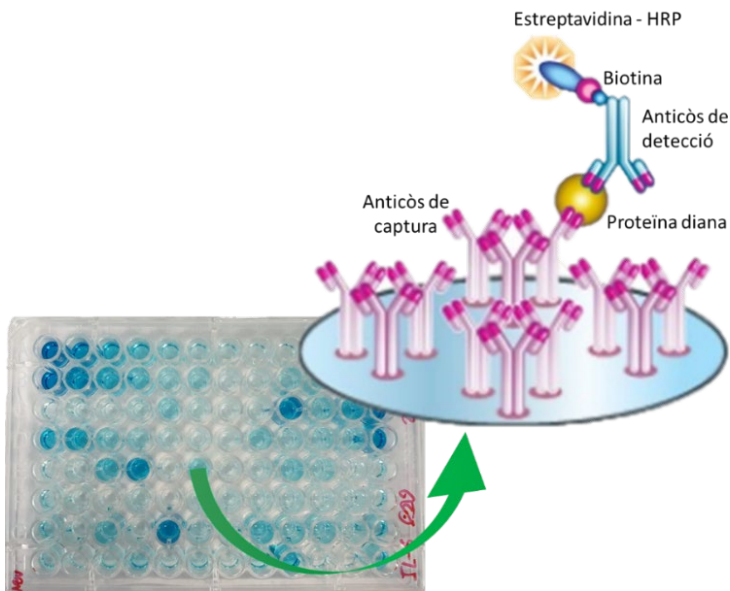


Figura 25: Esquema ELISA. HRP, *Horseradish peroxidase*.
(Modificada d'Abcam, 2019)

La tècnica d'ELISA és un assaig que es basa en la detecció d'antígens mitjançant l'ús d'anticossos marcats amb un enzim, de manera que els conjugats resultants tinguen activitat tant immunològica com enzimàtica (figura 25). Per a la detecció colorimètrica s'utilitza un anticòs secundari o de detecció biotinitat i el sistema conjugat estreptavidina-peroxidasa, que actuarà sobre un determinat substrat.

2.4.1. Protocol ELISA

En la present Tesi Doctoral s'han realitzat diversos protocols ELISA comercials seguint estrictament les recomanacions del fabricant (Taula 1). En general el protocol es basa en cobrir inicialment una placa de 96 pouets amb l'anticòs primari o de captura i deixar-ho incubar tota la nit a 4 °C. L'endemà es renta la placa amb el tampó de rentat corresponent i es realitza la fase de bloqueig. Després del posterior rentat, s'afegeixen les mostres a analitzar i la corresponent corba patró. A continuació, s'incuba amb l'anticòs secundari biotinitat durant el període de temps indicat. Després d'una sèrie de rentats, s'afegeix la solució del conjugat estreptavidina-peroxidasa, incubant protegit de la llum el temps adequat. Finalment, després de successius rentats, s'afegeix la solució de substrat tetrametilbenzidina (TMB). Aquest substrat cromogènic és oxidat per l'enzim, donant lloc a l'aparició de coloració blava. L'addició de la solució d'àcid sulfúric 2 N deté la reacció i vira el color a groc. L'absorbància és quantificada mitjançant un espectrofotòmetre Wallac 1420 VICTOR3™ (PerkinElmer, Finland) a 450 nm.

Taula 1: ELISA comercials emprats en la present Tesi Doctoral

Proteïna	Sensibilitat	Fabricant
TNFα	31,3 pg/ml	R&D Systems®, Minneapolis, USA.
IL-1β	15,6 pg/ml	R&D Systems®, Minneapolis, USA.
IL-18	19,0 pg/ml	Fisher Scientific, Göteborg, <i>Sweden</i> .
IL-6	4,0 pg/ml	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA.
CXCL-1	4,0 pg/ml	PromoKine, Heidelberg, <i>Germany</i> .

Els diferents assajos s'han executat sobre les mostres de: sobrenedant dels cultius dels macròfags peritoneals, exsudats del model de bossa d'aire en ratolí (MAP) i homogeneïtzats de les potes de l'artritis gotosa

2.5. DETERMINACIÓ DE L'ACTIVACIÓ DE CASPASA-1 I NF- κ B PER WESTERN BLOT

Els sobrenedants cel·lulars (apartat 2.1.2.) s'han utilitzat també per determinar la fracció activa p20 de caspasa-1 per Western Blot. D'altra banda, els macròfags que queden adherits als pouets es renten amb 500 μ l de PBS fred (pH 7,4) i es recullen amb 500 μ l de tampó de lisi cel·lular (taula 2). Després de centrifugar a 10.000 xg durant 10 minuts, el sobrenedant (lisat cel·lular) s'utilitzarà per determinar l'expressió proteica de procaspasa-1 (p48) i la subunitat p65 fosforilada (Ser536) d'NF- κ B.

2.5.1. Fonament i protocol experimental del Western Blot

La tècnica del Western Blot o “immunoblotting” permet visualitzar proteïnes que han estat transferides a una membrana sintètica, utilitzant un sistema de detecció quimioluminescent. Aquesta tècnica permet separar les proteïnes en funció del seu pes molecular. Les proteïnes desnaturalitzades se separen electroforèticament sobre un gel de poliacrilamida després d'establir una diferència de potencial. Es pot identificar una sola proteïna en funció del seu pes molecular a partir d'una mescla proteica utilitzant un anticòs primari que reconeix específicament epítops de l'antigen a estudi adherit a un suport sòlid. Després d'incubar amb l'anticòs secundari marcat amb un enzim i afegir el substrat, es pot correlacionar la intensitat del senyal obtingut en revelar amb la major o menor expressió de la proteïna que s'està estudiant (figura 26).

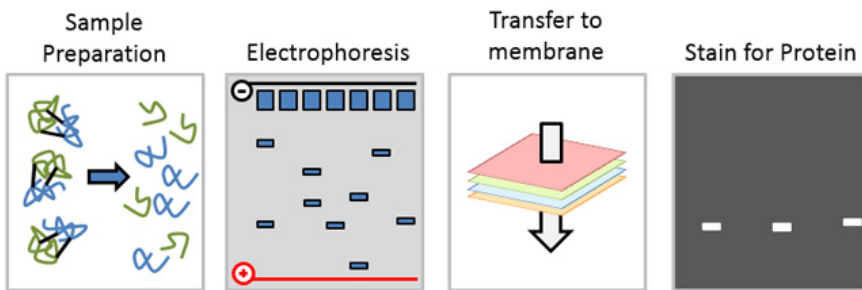


Figura 26: Procés Western Blot (GenScript, 2019)

2.5.2. Preparació de les mostres

Primerament, es determina la concentració proteica de totes les mostres a analitzar mitjançant el reactiu DC Bio-Rad Protein (Bio-Rad,

California, USA). S'ha utilitzat albúmina de sèrum boví (BSA) com a corba patró de quantificació.

Tots els tampons emprats per a la realització del Western Blot es recullen en la taula 2. Les mostres són diluïdes amb tampó de càrrega desnaturalitzant de Laemmli (1:5) fins a aconseguir una quantitat equivalent de proteïna. A continuació s'escalfen a 99 °C durant 5 minuts per facilitar la desnaturalització de les proteïnes fins a la seua estructura secundària, perdent així la seua forma tridimensional.

2.5.3. Electroforesi

Les proteïnes contingudes en cada mostra (10-20 µg de proteïna) són separades mitjançant electroforesi en gel d'acrilamida/bisacrilamida-dodecilsulfat sòdic (SDS), utilitzant un equip d'electroforesi (Bio-Rad, Madrid, *Spain*) i el tampó d'electroforesi (taula 2).

Aquest tipus d'electroforesi es coneix com desnaturalitzant, ja que el tampó de Laemmli conté l'agent reductor ditiotreitòl (DTT), agent que trenca els ponts disulfur i el detergent aniònic SDS, que desnaturalitza les proteïnes. A més, el SDS recobreix la proteïna de forma proporcional al seu pes molecular i bloqueja la càrrega pròpia de la molècula, conferint al complex una càrrega neta negativa proporcional a la seua massa. El SDS confereix a les proteïnes de la mostra masses moleculars diferents i així cada proteïna migrarà a diferent velocitat a causa de la proporció càrrega/massa, ja que cada proteïna té un punt isoelèctric diferent. D'aquesta manera, les proteïnes migren cap a l'ànode degut a la seua càrrega negativa, separant-se únicament en funció de la seua grandària. Així doncs, les proteïnes més lleugeres travessaran el gel a més velocitat que les de major pes molecular, aconseguint-se la separació per pes molecular. Les propietats del gel de poliacrilamida

venen determinades per la grandària del porus pel qual han de passar les proteïnes.

La grandària del porus està determinada per la proporció d'acrilamida i bisacrilamida (índex T o grau d'entrecreuant). El percentatge utilitzat per a caspasa-1 va ser del 12,5 % i per a la p-p65 de l'NF- κ B del 10 %, ja que permet l'adequada separació de les proteïnes.

Una vegada es tenen els pouets del gel carregats amb les mostres i el marcador, es sotmet al voltatge de 110 mV durant aproximadament 15 minuts -fins que totes les mostres travessen la banda superior del gel (*stacking*). Seguidament, s'augmenta el voltatge a 140 mV aproximadament 45 minuts en la fase d'electroforesi per a què se separen les proteïnes pel seu pes molecular.

2.5.4. Transferència

Finalitzada l'electroforesi, es du a terme la transferència del gel durant 50 minuts a 125 mA constants a una membrana de difluorur de polivinilidè (GE Healthcare Life Sciences, Barcelona, *Spain*), activada prèviament amb metanol. Aquesta membrana té una gran capacitat d'unió a proteïnes i gran resistència mecànica.

El sistema de transferència utilitzat ha estat el semisec, en el qual els gels són sotmesos a una intensitat de corrent entre dos elèctrodes plans entre els quals es col·loca el gel i la membrana coberts a banda i banda per paper de filtre banyat en tampó de transferència. D'aquesta manera, les proteïnes migren del gel i queden adherides a la superfície de la membrana. Aquest sistema de transferència semisec té avantatges respecte a altres procediments com són l'economia de reactius, la reducció de temps de transferència i la facilitat de muntatge. Una vegada

en la membrana, les proteïnes estan accessibles per interaccionar amb altres molècules que permeten la seua identificació.

Taula 2: Solucions, tampons i gels emprats per al Western Blot

TAMPÓ	ELECTROFORESI	TRANSFERÈNCIA	TAMPÓ PBS pH 7,4	
Glicina	15,00 g	2,88 g	KH ₂ PO ₄	1,09 g
Trizma base	3,00 g	0,60 g	Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O	1,09 g
SDS 20 %	5,00 ml	0,50 ml	NaCl	9,00 g
H ₂ O miliQ	qsp 1 l	qsp 1 l	H ₂ O miliQ	qsp 1 l

TAMPÓ DE CÀRREGA - LAEMMLI	
DTT	30,80 mg
SDS 20 %	200,00 µl
Tris 1M pH 6,8	160,00 µl
Glicerol 100 %	200,00 µl
Blau de bromofenol	40,00 µl
H ₂ O miliQ	qsp 1 ml

TAMPÓ LISI CEL·LULAR pH 7,5	
Tritó X-100	10,00 µl
Deoxicolat	10,00 mg
NaCl	1,17 mg
Trizma base	3,03 mg
H ₂ O	qsp 1 ml

	FRACCIÓ RUNNING	
	Gel al 10 %	Gel al 12,5 %
H ₂ O mili Q	4,90 ml	4,15 ml
Tris HCl 3M pH 8,7	1,12 ml	1,12 ml
Acril-Bisacrilamida	3,00 ml	3,75 ml
SDS 20 %	50,00 µl	50,00 µl
TEMED*	5,00 µl	5,00 µl
APS* 10 %	50,00 µl	50,00 µl

FRACCIÓ STACKING	
H ₂ O mili Q	3,68 ml
Tris HCl 1M pH 6,8	0,63 ml
Acril-Bisacrilamida	0,65 ml
SDS 20 %	25,00 µl
TEMED	5,00 µl
APS 10 %	25,00 µl

BLAU DE COOMASSIE	
Blau de Coomassie	2,50 g
MeOH	450,00 ml
Àcid Acètic Glacial	100,00 ml
H ₂ O mili Q	qsp 1 l

SOLUCIÓ DECOLORANT DEL COOMASSIE	
MeOH	20,00 ml
Àcid Acètic Glacial	10,00 ml
H ₂ O mili Q	qsp 1 l

*TEMED: N,N,N',N'-tetrametiletlenodiamina

*APS: Persulfat Amònic (Laboratoris Bio-Rad, California, USA)

qsp = quantitat suficient per

Per comprovar que la transferència s'ha realitzat correctament, la membrana es tenyeix amb la solució de Roig Ponceau durant 5 minuts en agitació. Després es destenyeix amb aigua bi-destil·lada i és sotmesa a 3

rentats de 5 minuts amb PBS Tween 20 al 0,1 %, també en agitació. Així mateix, tenim els gels amb Blau de Coomassie durant 90 minuts en agitació i seguidament tractem amb la solució per al destenyit del Coomassie durant 12 hores, per corroborar que la transferència de proteïnes del gel a la membrana ha sigut completa. Tots aquests processos són realitzats a temperatura ambient.

2.5.5. Incubació de la membrana

A continuació, les membranes són bloquejades amb llet desnatada al 3 % (p/v) en tampó PBS-Tween 20 (0,1 %) durant 60 minuts, en agitació a temperatura ambient. Les proteïnes de la llet o el BSA bloquegen els llocs inespecífics als quals podria unir-se l'anticòs utilitzat, prevenint així la unió no específica dels anticossos a la membrana, evitant falsos positius i inespecificitat. Seguidament, les membranes són incubades amb l'anticòs primari específic per a la fracció p20 o p48 de caspasa-1 o per a la fracció fosforilada p65 de l'NF- κ B (taula 3) a les dilucions adients en tampó PBS-Tween 20 (0,1 %) amb 2 % de BSA durant tota la nit a 4 °C. Després de tres rentats amb PBS-Tween 20 al 0,1 %, les membranes són incubades per a la detecció de la p20 i p48 de la caspasa-1 amb l'anticòs secundari Anti-IgG (immunoglobulina G) de ratolí conjugat amb peroxidasa (1/4000) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) i per a la detecció de la p-p65 de l'NF- κ B amb el anticòs secundari anti-IgG de conill conjugat amb peroxidasa (1/5000) (Dako, Glostrup, Denmark), en els dos casos durant 1 h, en agitació a temperatura ambient. Les bandes immunorreactives són visualitzades mitjançant el sistema de quimioluminescència (ECL) intensificat (GE Healthcare Life Sciences, Barcelona, Spain). La reacció quimioluminescent es produeix després del tractament de la membrana durant 2 minuts aproximadament amb una solució de luminol i peròxid d'hidrogen a parts iguals. Així, la peroxidasa

conjugada amb l'anticòs secundari catalitza l'oxidació del luminol en presència de peròxid d'hidrogen.

En aquest procés, el luminol (Amersham^{MT} ECL^{MT} Prime Healthcare Life Sciences, Barcelona, *Spain*) passa al seu estat basal reduït emetent quimioluminescència, i aquest senyal pot ser detectada per un sistema automatitzat de revelat AutochemiTM System (UPV Inc., Upland, CA, USA). Aquest aparell està acoblat a una càmera fotogràfica capaç de capturar imatges seqüencialment i està dotat del programa LabWorksTM 4.6 per a l'adquisició d'imatges que són analitzades amb el programa Image J.

Taula 3: Anticossos primaris utilitzats per al Western Blot

Anticòs primari	Pes molecular	Dilució	Fabricant
Caspasa-1	48 kDa procaspasa-1 20 kDa subunitat p20	1:2000	AdipoGen Life Science Liestal, <i>Switzerland</i>
p-p65 NF-κB	65 kDa subunitat p65	1:100	Proteintech Group Rosemont, USA
β-Actina	42 kDa	1:500	Sima-Aldrich St. Louis, MO, USA
GAPDH*	34 kDa	1:2500	Sigma Aldrich St. Louis, MO, USA

*GAPDH: *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*.

Posteriorment, les membranes són incubades durant 2 hores a temperatura ambient amb l'anticòs anti β-Actina o l'anticòs anti-GAPDH (*glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*) (taula 3) i, posteriorment, durant 1 hora amb l'anticòs secundari anti-IgG de conill conjugat amb peroxidasa (1/5000) (Dako, Glostrup, *Denmark*).

El pes molecular de la proteïna ve senyalitzat pel marcador (Precision Plus Protein^{MT} Standards, BIO-RAD Laboratoris, Madrid, *Spain*). A més, per visualitzar les proteïnes totals i així poder comprovar que la càrrega proteica de cada mostra és comparable, l'expressió de cada proteïna es normalitza amb la de la proteïna control revelada en la mateixa membrana, mitjançant l'anàlisi de la densitometria amb el programa Image J.

2.6. DETECCIÓ D'ESPÈCIES REACTIVES D'OXIGEN

2.6.1 Determinació de ROS mitocondrials amb MitoSOXTM

La producció de superòxid per part dels mitocondris pot visualitzar-se en microscòpia de fluorescència mitjançant el reactiu MitoSOXTM (*Red Mitochondrial Superoxide Indicator*). Aquest penetra les cèl·lules vives en les que selecciona les mitocondries, oxidant-se ràpidament pels radicals superòxid.

En aquest protocol, els macròfags peritoneals són sembrats en portaobjectes de 8 pouets tipus *Chamber Slide*TM (Nunc -Thermo Fisher, Rochester, NY, USA) a la concentració de $0,5 \times 10^6$ cèl·lules/pouet (Vf 500 μ l). Després del procés general d'adherència, tractament i estímul amb LPS i ATP s'elimina el medi de cultiu i s'afegeix una solució de 5 μ M de MitoSOXTM (Molecular ProbesTM, Invitrogen, Paisley, UK) en 500 μ l de solució salina de Hank's (HBSS) amb Ca^{2+} i Mg^{2+} . Després d'incubar a 37 °C durant 10 minuts, es realitzen 3 rentats amb PBS (37 °C) i es fixen les cèl·lules amb 250 μ l/pouet de paraformaldehid al 4 % durant 15 minuts. Posteriorment, es torna a rentar 3 vegades per eliminar les possibles restes de partícules i es desmunta el portaobjectes. S'afegeix una gota de medi de muntatge ProLongTM Gold Antifade Mountant amb DAPI

(Molecular Probes TM Invitrogen, Paisley, UK) i es cobreix amb un cobreobjectes, deixant assecar 18 h. Les cèl·lules són observades en el microscopi confocal Olympus FV1000 (Waltham, MA, USA) amb l'objectiu de 40X en oli d'immersió.

2.6.2. Determinació de ROS extracel·lulars per quimioluminescència

En aquest protocol, els macròfags peritoneals són sembrats en plaques negres de 96 pouets (Nunc-Thermo Fisher, Rochester, NY, USA) a una concentració de 10^6 cèl·lules/ml (Vf 200 μ l). Després del període d'adherència, el medi de cultiu és canviat per 200 μ l de HBSS amb Ca^{2+} i Mg^{2+} i les cèl·lules són tractades amb els productes a estudi, 30 minuts després són estimulades amb 13-acetat de 12-O-tetradecanoilforbol (TPA) (10^{-6} M) durant 20 minuts en presència de luminol (40 μ M). La quimioluminescència produïda es mesura en un Wallac 1420 VICTOR3 TM (PerkinElmer, Finland).

2.7. DETERMINACIÓ DE LA TRANSLOCACIÓ D'Nrf2 AL NUCLI PER IMMUNOFLUORESCÈNCIA

Els macròfags peritoneals són també sembrats en portaobjectes de 8 pouets tipus *Chamber Slide*TM a la concentració de $0,5 \times 10^6$ cèl·lules/pouet (Vf 500 μ l). Després del corresponent estímul amb LPS i ATP (apartat 2.1.2), es realitzen dos rentats amb 250 μ l de PBS sobre gel. A continuació, es fixen les cèl·lules amb metanol a 4 °C durant 15 minuts, es torna a rentar amb PBS, i s'incuba amb 250 μ l/pouet de l'anticòs primari anti-Nrf2 (Abcam, Cambridge, UK) a una dilució 1:800 en PBS/BSA 1 % (durant 18 hores a 4 °C). Després de dos rentats amb PBS, s'incuba amb l'anticòs secundari *Alexa Fluor*[®] 488 *goat anti-rabbit* (Molecular

Probes™ Invitrogen, Paisley, UK) a la dilució 1:500 en PBS/BSA 1 %, durant 1 hora a temperatura ambient. Finalment, es renten de nou els pouets i es desmunta el portaobjectes, afegint una gota del líquid de muntatge ProLong™ Gold Antifade Mountant amb DAPI (Molecular Probes™ Invitrogen, Paisley, UK) i deixant fixar durant 18 hores abans d'observar en el microscopi confocal Olympus FV1000 (Waltham, MA, USA) amb l'objectiu de 20X i oli d'immersió.

3. MÈTODES D'ESTUDI *IN VIVO*

3.1. BOSSA D'AIRE EN RATOLÍ ESTIMULADA AMB CRISTALLS CPPD

Aquest model experimental constitueix un mètode molt útil i senzill per a l'estudi de mediadors implicats en la fase aguda de la inflamació.

El model de bossa d'aire en ratolí va ser descrit inicialment per Edwards *et al.* (1981) utilitzant com a animal d'experimentació la rata. Posteriorment, es va adaptar per desenvolupar-ho en ratolí (Dawson *et al.*, 1991). Està basat en la formació d'una cavitat subcutània en el dors de l'animal després de la injecció d'aire estèril. La bossa generada pot utilitzar-se com una càmera de cultiu cel·lular en la qual es poden injectar diferents agents proinflamatoris i estudiar els seus efectes en la morfologia cel·lular, activitat enzimàtica, producció de mediadors de la inflamació, etc.

La cavitat formada és molt similar a la membrana sinovial i es caracteritza per la formació d'una superfície cel·lular ben organitzada on es troben cèl·lules tipus A semblants a macròfags i cèl·lules tipus B (fibroblasts), així com una barrera mecànica que reté tant l'agent irritant

com els productes alliberats característics de la resposta inflamatòria (Edwards *et al*, 1981).

En la literatura s'han descrit diferents agents proinflamatoris que poden ser emprats. Entre ells, els cristalls de dihidrat de pirofosfat càlcic (CPPD) (figura 27) es caracteritzen per induir citocines proinflamatòries així com l'activació de l'inflamasoma i del factor de transcripció NF- κ B (Campillo-Gimenez *et al.*, 2018). A més, el CPPD és capaç d'activar el complement i induir la secreció d'enzims lisosomals i la producció de prostaglandines i leucotriens en el fluid de la bossa (Watanabe *et al.*, 1992).

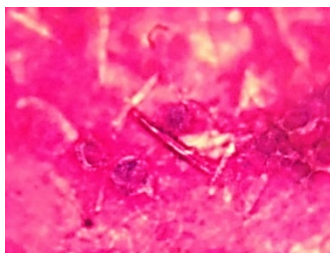


Figura 27: Cristalls CPPD en l'exsudat extret de la bossa d'aire.
Tinció amb colorant panòptic

3.1.1. Protocol experimental

S'han utilitzat ratolins mascle C57BL/6 de 20-25g de pes i 10-12 setmanes d'edat, emprant com a agent desencadenant del procés inflamatori el CPPD (InvivoGen, Toulouse, *France*) a la concentració 1 mg/ml suspès en PBS estèril.

Inicialment injectem en el dors dels animals un volum de 10 ml d'aire estèril, que ha de romandre en la capa subcutània de la pell per

produir la bossa. Tres dies després reinflem la bossa injectant 5 ml d'aire estèril (figura 28).



Figura 28: Fotografia d'un ratolí C57BL/6
amb la bossa d'aire a l'espai subcutani de la zona dorsal

Al sisè dia de la injecció inicial d'aire, s'administra via intrabossa en els grups del tractament la calcona o l'osteostatina a les dosis d'estudi pertinents. Vint minuts després s'injecta 1 ml del CPPD (1 mg/ml en PBS estèril) al grup Control i als grups amb tractament. Al grup Blanc se li administra únicament 1 ml de PBS estèril. Transcorregudes 6 hores després d'injectar el CPPD, es sacrifiquen els ratolins per dislocació cervical. En la figura 29 es recull l'esquema del protocol.

Una vegada sacrificats els animals, s'extrau l'exsudat de la bossa d'aire amb ajuda d'una xeringa prèvia injecció d'1 ml de sèrum fisiològic i lleuger massatge. En l'exsudat es quantifica la migració cel·lular amb ajuda d'un aparell de comptatge cel·lular (Beckman Coulter™ Z2 Coulter®, Indianapolis, USA).

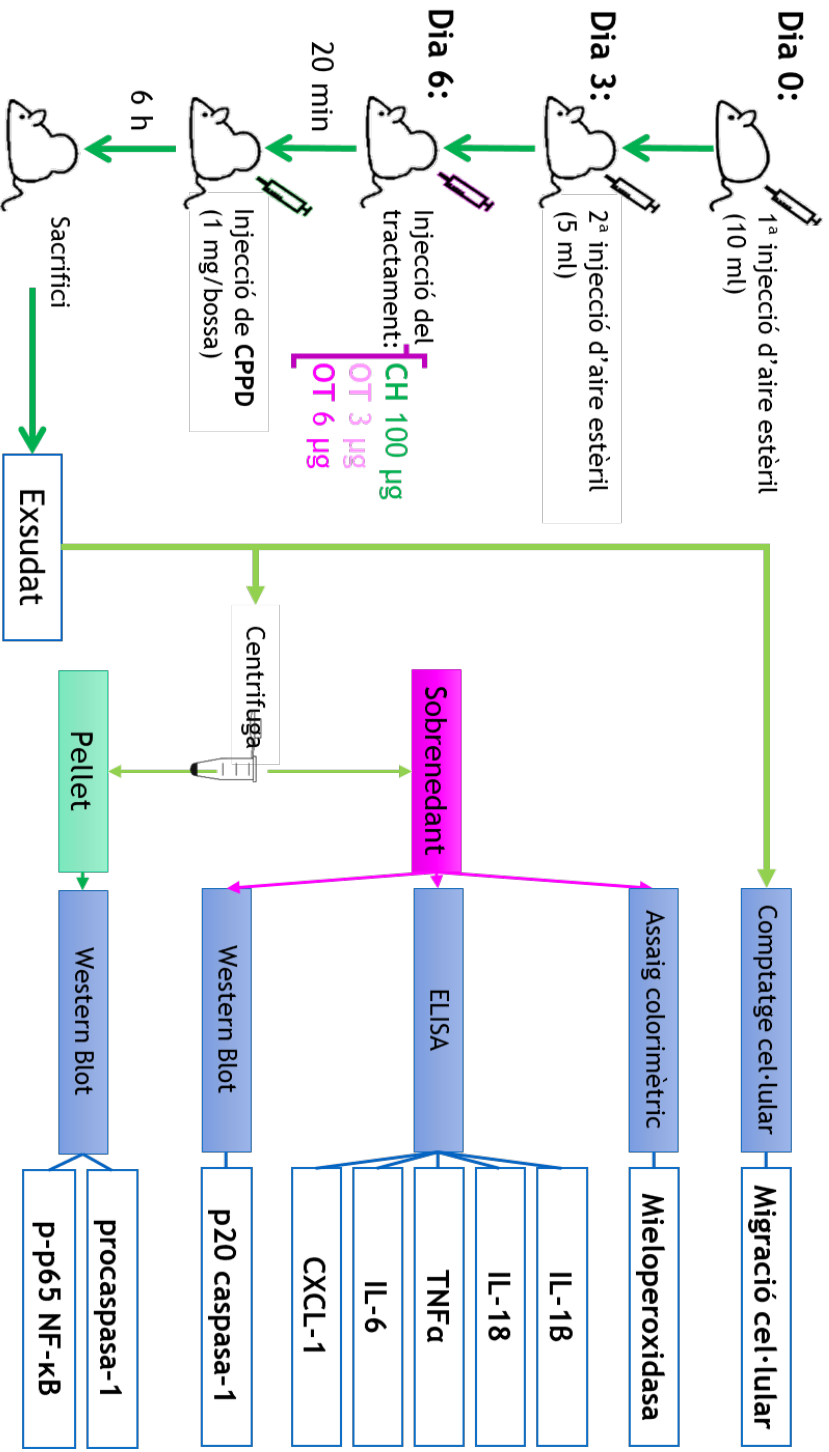


Figura 29: Esquema del protocol seguit per al desenvolupament de la bossa d'aire en el dors de l'animal

Després es centrifuga a 1200xg (10 minuts a 4 °C), separant el sobrenedant de les cèl·lules per determinar els següents paràmetres inflamatoris:

- a) Al sobrenedant es determinen:
 - Els nivells de les citocines IL-1 β , IL-18, TNF α , CXCL-1 i IL-6 mitjançant tècniques d'ELISA (apartat 2.4)
 - L'expressió de la subunitat proteica p20 de la caspasa-1 per Western Blot (apartat 2.5.)
 - L'activitat mieloperoxidasa (MPO) (apartat 3.1.2.).
- b) En les cèl·lules del *pellet* es determina:
 - L'expressió de la subunitat proteica p48 de la caspasa-1 i la subunitat p-p65 d'NF- κ B per Western Blot.

3.1.2. Determinació de l'activitat mieloperoxidasa

Part dels efectes inflamatoris provocats per la presència de neutròfils en els teixits s'atribueix a l'alliberament del contingut dels seus grànuls. Aquests leucòcits posseeixen dos tipus de grànuls: els primaris o atzuròfils, que contenen MPO, elastasa i altres enzims hidrolítics, i els secundaris o específics, que contenen lisozima i colagenasa (Schettler *et al.*, 1991). Així doncs, els nivells de l'enzim MPO són indicadors del procés de desgranulació leucocitària. Aquest enzim utilitza el peròxid d'hidrogen, generat després de l'activació del neutròfil, per oxidar els ions Cl⁻ presents en el medi i donar lloc a l'àcid hipoclorós un potent agent oxidant al qual s'atribueix la capacitat bactericida del neutròfil.

El protocol, adaptat per al treball en microplaca, es basa en el mètode descrit per De Young i col·laboradors (De Young *et al.*, 1989). Els sobrenedants de l'exsudat de la bossa són incubats amb PBS (pH 7,4) i tampó fosfat pH 5,4 (Na_2HPO_4 0,09 %, NaH_2PO_4 1,15 %) en presència de peròxid d'hidrogen (0,05 %) durant 5 minuts. Seguidament, s'afegeix el substrat de la reacció TMB a 18 mM dissolt en dimetilformamida (preparada al 8 % en aigua destil·lada). S'incuba la placa durant 3 minuts a 37 °C, detenint la reacció amb àcid sulfúric 2 N. L'absorbància és quantificada mitjançant un espectrofotòmetre VICTOR 3™ Wallac 1420 (PerkinElmer, Finland) a 450 nm de longitud d'ona.

3.2. ARTRITIS GOTOSA EN RATOLÍ INDUÏDA PER CRISTALLS MSU

El model de l'artritis gotosa produïda per cristalls d'MSU va ser descrita per Rassol i Varalakshmi (2006) utilitzant com a animal d'experimentació la rata. Posteriorment va ser modificada per Sabina *et al.*, (2008) i de Souza *et al.*, (2012), per desenvolupar-ho per al ratolí. Aquest model reproduïx la resposta inflamatòria provocada en humans pel metabolisme anormal de l'àcid úric i la deposició de cristalls d'urat monosòdic en les articulacions, desencadenant una resposta inflamatòria caracteritzada per l'activació neutrofílica, l'alliberament de citocines proinflamatòries i l'activació de l'inflamasoma (Yu *et al.*, 2019). Per tant, en aquest model s'injecten els cristalls d'MSU subcutàniament per simular aquestes condicions (figura 30).



Figura 30: Fotografia de la injecció subcutània dels cristalls d'MSU en la pota dreta d'un ratolí C57BL/6

3.2.1. Protocol experimental

Per a l'estudi de l'artritis gotosa produïda per cristalls d'MSU se seleccionen ratolins mascles de la soca C57BL/6 de 20-25 grams de pes i d'entre 10 i 12 setmanes d'edat.

Als ratolins se'ls administra la calcona via oral i l'osteostatina via subcutània en el dors. Una hora després de l'administració del tractament, es realitza la injecció subcutània de 2 mg d'MSU en l'aponeurosi plantar de la pota dreta del ratolí (InvivoGen, Toulouse, France) resuspès en 50 μ l de PBS. Seguidament, durant 1, 3, 6 i 24 hores després de la injecció dels cristalls d'MSU, es mesura l'edema produït mitjançant un pletismòmetre digital (*Digital Water Plethysmometer*, Panlab S.L.U., Barcelona, Spain). A les 24 hores es procedeix al sacrifici dels animals i l'amputació de les seues potes, que són congelades a -80°C per a la seua posterior homogeneïtzació en N_2 líquid (figura 31).

3.2.1. Obtenció i processament de les mostres

Les potes, prèviament congelades a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, són traspassades a un recipient amb N_2 líquid. Seguidament, s'introdueixen en un cilindre congelat a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ i són polvoritzades i compactades amb l'ajuda d'un pistó i un martell. El polvoritzat obtingut és introduït en un *ependorf* amb 1 ml de tampó de lisi A (10 mM Hepes pH 8,0, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 10 mM KCl i un còctel d'inhibidors de proteases: 1 mM DTT, 5 mM NaF, 1 mM Na_3VO_4 , 10 mM Na_2MoO_4 , 1 mg/ml leupeptina, 0,1 mg/ml aprotinina, 0,5 mM fluorur de fenilmetilsulfonil (PMSF)).

Després de sotmetre-les a un vòrtex, les mostres es soniquen en gel (3 cicles de 10 segons) i s'incuben durant 10 minuts a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. A continuació, se centrifuguen els homogeneïtzats (1.500xg, 5 minuts, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$), es recullen els sobrenedants i es tornen a centrifugar (10.000xg, 5 minuts, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$). Finalment, es guarden els sobrenedants que seran utilitzats per a la determinació de citocines mitjançant ELISA i de l'activitat MPO, així com per a l'anàlisi de l'expressió proteica per Western Blot .

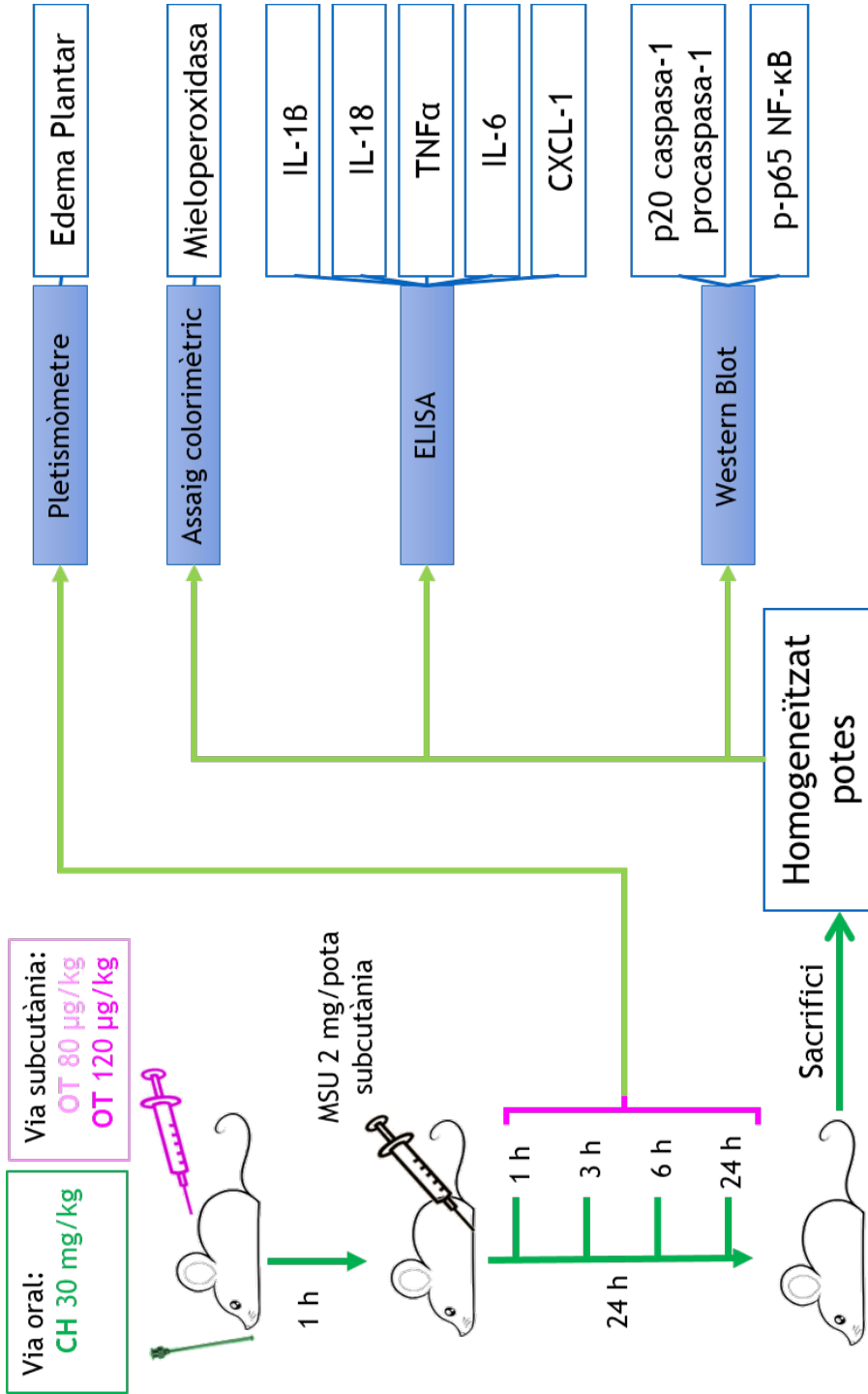


Figura 31: Esquema del model *in vivo* d'artritis gotosa

4. ANÀLISI ESTADÍSTIC I EXPRESSIÓ DE RESULTATS

Els resultats s'expressen com a la mitjana aritmètica dels valors \pm error estàndard de la mitjana (SEM), on n fa referència al número d'animal o d'experiències d'un experiment.

Els resultats obtinguts en els experiments han sigut sotmesos a tractament estadístic, s'ha utilitzat el mètode ANOVA d'una via seguit del mètode de Tukey, el qual crea intervals de confiança entre les mitjanes dels nivells dels factors i s'utilitza per a fer una comparació múltiple, on es destaquen les diferenciacions que ens donen els grups problema respecte d'un grup Control o Blanc. També s'ha emprat el mètode ANOVA de dos vies seguit del mètode Bonferroni, aquest controla el nivell de confiança simultani per a un conjunt complet d'intervals de confiança, el qual permet comparar els valors mitjans dels grups problema respecte d'un grup Control o Blanc, tenint en compte la repetició a diferents temps.

Per a l'anàlisi s'utilitza el programa GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). Es considera que hi ha diferència significativa entre els grups amb un valor de p menor de 0,05 quan el valor t obtingut és major que el tabulat per a un nivell de confiança del 95 %. A més, aquesta diferència pot ser molt significativa per a p menor de 0,01 (nivell de confiança del 99 %) o per a p menor de 0,001 (nivells de confiança del 99,9 %).

S'ha utilitzat el símbol (*) o (+) per representar la significativitat estadística respecte dels diferents grups, sent el símbol (*) per a comparar front el grup Control i (+) per a quan es compara front al grup Blanc.

Resultats

1. ESTUDI DE L'EFECTE FARMACOLÒGIC DEL DERIVAT CALCONA

1.1. ESTUDIS *EX VIVO* EN MACRÒFAGS PERITONEALS

Després de la corresponent revisió bibliogràfica de les propietats conegudes fins al moment del derivat CH, s'ha començat l'estudi d'aquest derivat amb el model *ex vivo* de cultiu de macròfags peritoneals de la soca de ratolí C57BL/6. Una vegada realitzada l'extracció i sembra dels macròfags segons el corresponent apartat de material i mètodes, les cèl·lules es mantenen en cultiu durant 18 hores. Després del canvi de medi, s'aplica el tractament de la CH a les concentracions d'1 μM o 10 μM . Als 30 minuts s'estimulen les cèl·lules amb LPS (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 4 hores) i finalment, després d'un nou canvi de medi, s'afegeix ATP (5 mM, 30 minuts). Arribats a aquest punt, ja es poden dur a terme les avaluacions pertinents tant en el sobrenedant del cultiu com en els macròfags.

1.1.1. Determinació de la citotoxicitat per l'assaig MTT

L'absència de citotoxicitat del derivat calcona ja va ser demostrada prèviament en l'estudi realitzat per Rojas *et al.* (2002), en macròfags RAW 264.7 estimulats amb LPS. No obstant, vam considerar interessant confirmar aquests resultats en les noves condicions experimentals aplicades als macròfags peritoneals, ja que el tractament amb LPS i ATP produeix certa toxicitat cel·lular relacionada amb el fenomen de piroptosi.

Tal i com s'observa en la figura 32, el tractament amb la calcona en absència d'estímul no presenta citotoxicitat, ja que dona valors similars als del grup Blanc. D'altra banda, es produeix una reducció molt

acusada de la viabilitat cel·lular en les cèl·lules Control (estimulades amb LPS i ATP) respecte al grup Blanc. En aquestes condicions, el tractament amb calcona es pot dir que té un caràcter protector sobre la citotoxicitat que produeix l'estímul, augmentant fins al 54 % i al 61 % la viabilitat cel·lular quan es tracta amb la CH 1 μM i CH 10 μM respectivament, comparat amb el 41 % del grup Control.

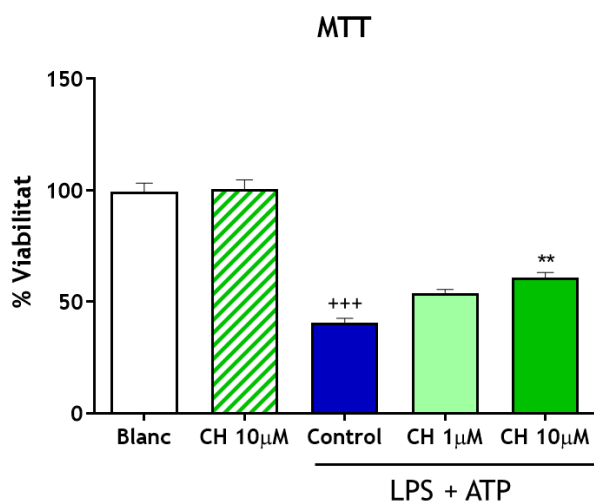


Figura 32: Efecte de CH sobre la citotoxicitat cel·lular en macròfags peritoneals estimulats amb LPS i ATP. Els resultats s'expressen assignant el 100 % de viabilitat a la mitjana de les absorbàncies del grup Blanc. Els resultats són expressats amb les seues mitjanes \pm SEM ($n = 6$). +++ $p < 0,001$ respecte al grup Blanc; ** $p < 0,01$ respecte al grup Control (ANOVA d'una via seguida del test de Tukey)

1.1.2. Determinació de citocines proinflamatòries

Una vegada descartada la possible citotoxicitat del derivat calcona en les nostres condicions experimentals, es va estudiar el seu efecte sobre la producció de citocines proinflamatòries mitjançant la tècnica d'ELISA aplicada als sobrenedants cel·lulars (Material i mètodes apartat

2.4.1.). En este sentit, s'han seleccionat algunes de les citocines implicades en les primeres fases de la inflamació, com són TNF α i IL-6, així com IL-1 β i IL-18, ambdues relacionades amb l'activació de la caspasa-1 (Shen *et al.*, 2018; Dinarello *et al.*, 2013).

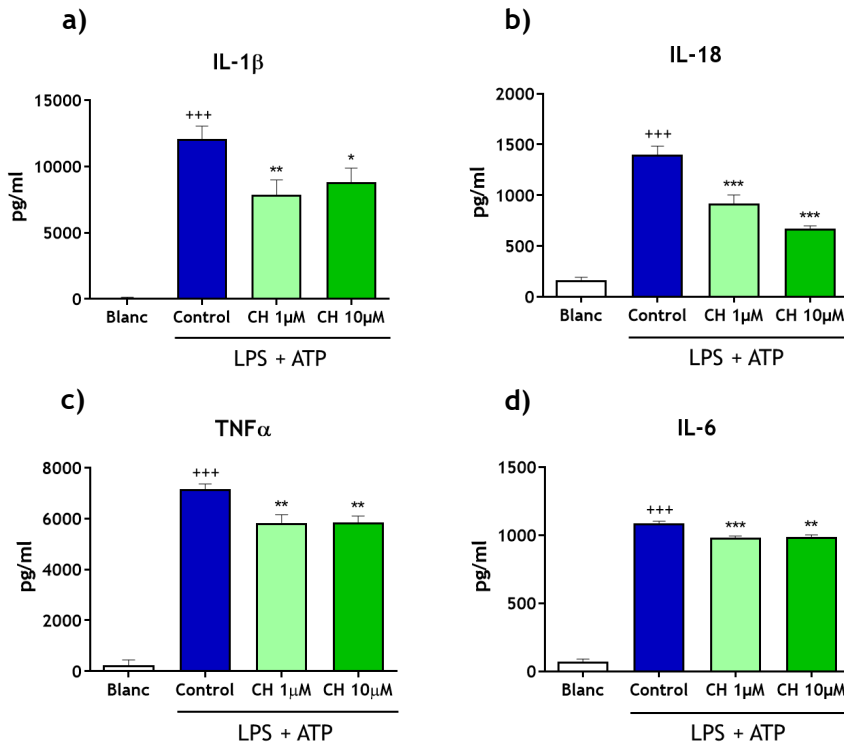


Figura 33: Efecte de CH sobre l'alliberament de citocines proinflamatòries en macròfags peritoneals estimulats amb LPS i ATP. a) IL-1 β ; b) IL-18; c) TNF α ; d) IL-6. Els resultats són expressats amb les seues mitjanes \pm SEM (n = 6). +++ $p < 0,001$ respecte al grup Blanc; ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, respecte al grup Control (ANOVA d'una via seguida del test de Tukey)

Tal i com s'observa en la figura 33, el tractament dels macròfags amb CH produeix una reducció significativa de totes les citocines a les dues concentracions assajades. Destaca l'efecte de CH 10 μ M sobre l'IL-1 β (35 % d'inhibició) i l'IL-18 (59 % d'inhibició). Aquest resultat fa interessant l'estudi del possible efecte de CH sobre l'activació de caspasa-1, implicada en l'alliberament d'ambdues citocines.

1.1.3. Activació de caspasa-1

L'activació de la caspasa-1 està relacionada amb la conversió de les citocines proinflamatòries proIL-1 β i proIL-18 en les seues formes actives, mitjançant l'autoproteòlisi i alliberament de les subunitats actives p10 i p20 a l'espai extracel·lular (Kim i Jo, 2013).

En el present estudi, s'ha determinat mitjançant la tècnica de Western Blot, l'alliberament de la subunitat activa p20 a l'espai extracel·lular en comparació a la procaspasa-1 (p48) determinada en el *pellet* cel·lular.

En la figura 34a es veu com la subunitat activa p20 es troba augmentada en el sobrenedant cel·lular de les cèl·lules Control en comparació amb les cèl·lules Blanc. El tractament amb el derivat calcona produeix una reducció d'aquesta senyal p20 en els sobrenedants, suggerint l'efecte inhibidor de l'activació de la caspasa-1. L'anàlisi de la relació p20 (alliberada en el sobrenedant)/p48 (romanent en les cèl·lules) confirma la inhibició significativa d'aquesta activació (figura 34b).

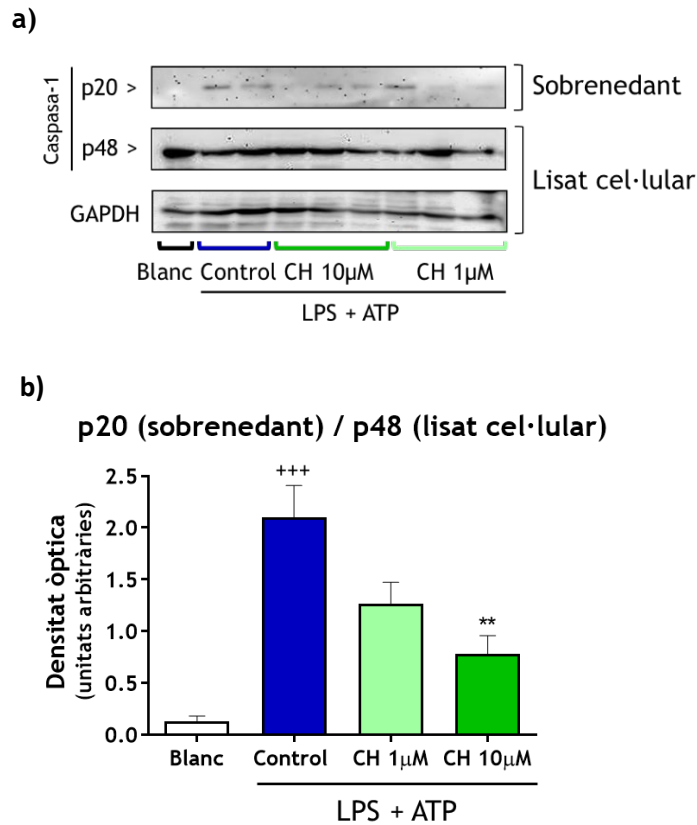


Figura 34: Inhibició de l'activació de la caspasa-1 en macròfags peritoneals estimulats amb LPS i ATP. a) Imatge representativa de l'estudi per Western Blot de les subunitats p20 i p48 determinades en el sobredant i el lisat cel·lular respectivament. GAPDH ha estat utilitzat com a Control de càrrega (10 µg de proteïna). b) Anàlisi densitomètric de les imatges obtingudes expressat per la relació subunitat p20/procaspasa-1 p48. Els resultats són expressats amb les seues mitjanes \pm SEM (n= 4 - 5). +++ $p < 0,001$ respecte al grup Blanc; ** $p < 0,01$ respecte al grup Control (ANOVA d'una via seguida del test de Tukey)

1.1.4. Avaluació de la piroptosi per l'assaig d'LDH

Com s'ha comentat anteriorment, l'activació de la caspasa-1 pot provocar en els macròfags el fenomen de piroptosi, amb l'alliberament a

l'espai extracel·lular de proteïnes citosòliques com la LDH (Raymajhi *et. al.*, 2013). Així, en la figura 35 s'observa un augment de l'activitat LDH en els sobrenedants dels macròfags estimulats amb LPS + ATP (Control), la qual és inhibida de manera significativa pel tractament amb CH 10 μ M. Aquest resultat suggereix un efecte protector de CH sobre la piroptosi cel·lular, en concordança amb la inhibició de l'activació de la caspasa-1 observada en l'estudi anterior.

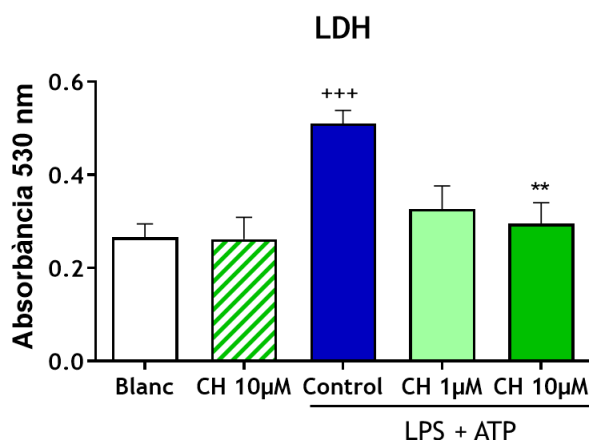


Figura 35: Efecte de CH sobre l'alliberament d'LDH en macròfags peritoneals estimulats amb LPS i ATP. Els nivells d'activitat LDH s'expressen en unitats d'absorbància a 530 nm. Els resultats són expressats amb les seues mitjanes \pm SEM ($n = 6$). +++ $p < 0,001$ respecte al grup Blanc; ** $p < 0,01$ respecte al grup Control (ANOVA d'una via seguida del test de Tukey)

D'altra banda, en la figura 35 també podem observar que el tractament amb CH en absència d'estímul, no augmenta l'activitat LDH respecte al grup Blanc, confirmant per tant la manca de citotoxicitat ja demostrada prèviament per l'estudi d'MTT.

1.1.5. Detecció de p-p65-NF- κ B

El factor de transcripció NF- κ B exerceix un paper important en la resposta inflamatòria a més de la possibilitat de ser una diana terapèutica en patologies relacionades (Rothschild *et al.*, 2018).

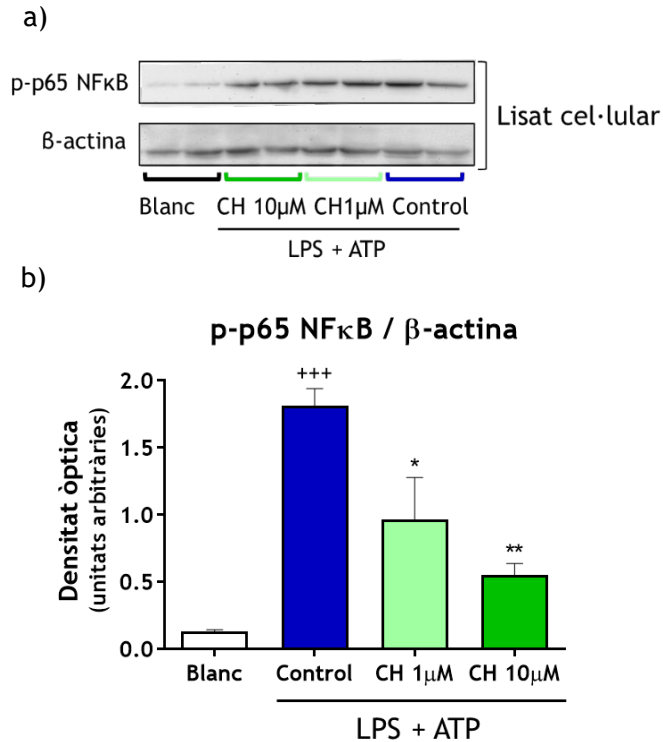


Figura 36: Efecte de la CH sobre la fosforilació de la subunitat p65 d'NF- κ B en macròfags peritoneals estimulats per LPS i ATP. a) Imatge representativa de l'estudi per Western Blot en el lisat cel·lular (10 μ g proteïna). b) Anàlisi densitomètric de totes les imatges obtingudes expressat per la relació subunitat fosforilada p65 de l'NF- κ B respecte a β -actina. Els resultats són expressats amb les seues mitjanes \pm SEM (n = 4 - 5). +++ $p < 0,001$ respecte al grup Blanc; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ respecte al grup Control (ANOVA d'una via seguida del test de Tukey)

Aquest factor de transcripció participa en el primer senyal que ocorre quan les cèl·lules són activades mitjançant un PRR, per induir l'expressió de NLPR3, proIL-1 β i proIL-18 abans del segon senyal que porta a l'acoblament d'aquest inflamàsoma (Bauernfeind *et al.*, 2009). Per tant, hem considerat interessant estudiar si l'efecte inhibidor del derivat calcona sobre l'activació de caspasa-1 podria estar relacionat amb la inhibició del factor de transcripció NF- κ B.

Per a aquest estudi, hem analitzat la subunitat fosforilada p-p65 de l'NF- κ B en el lisat cel·lular com indicatiu de l'activació d'aquest factor de transcripció susceptible de poder translocar-se al nucli, donant lloc a l'expressió d'NLPR3, proIL-1 β , proIL-18 i altres gens proinflamatoris (Liu, T. *et al.*, 2017; Lee *et al.*, 2016).

En la figura 36, s'observa un augment de la subunitat p-p65 en les cèl·lules Control, que es veu reduït pel tractament amb les dues concentracions de CH. Aquests resultats suggereixen que la inhibició de l'activació del NF- κ B possiblement té una correlació amb la inhibició de les citocines proinflamàtores i de l'activació de la caspasa-1 posades de manifest anteriorment.

1.1.6. Determinació de la generació de ROS

Les ROS són generades en diferents compartiments cel·lulars com el citoplasma, les membranes cel·lulars, reticle endoplasmàtic, mitocondries i peroxisomes, com a part del funcionament metabòlic basal, regulant per tant l'homeòstasi cel·lular. A més, depenent de l'origen, tipus cel·lular i l'ambient en el que es troben les cèl·lules, les ROS poden contribuir a la disfunció metabòlica i desencadenar la resposta inflamatòria present en moltes patologies (Forrester *et al.*, 2018). En este sentit, és coneguda la implicació del procés d'estrès oxidatiu en

l'activació del factor de transcripció NF- κ B, essent la producció de ROS una de les primeres respostes cel·lulars degudes al reconeixement d'un patògen (Torres *et al.*, 2006). Així, l'LPS s'uneix al receptor TLR4, el qual interacciona directament amb la NOX4, que promou la generació de ROS (Park *et al.*, 2004).

La mitocondria és considerada una de les principals fonts de ROS mitjançant les funcions respiratòries. Un dany produït en la cèl·lula pot desencadenar una excessiva producció de ROS i un estat d'estrès oxidatiu intracel·lular que activaria la resposta inflamatòria (Wojtala *et al.*, 2014). S'ha descrit que els ROS mitocondrials generats a partir de mitocondris disfuncionals estan involucrats en l'activació de l'inflamasoma NLRP3 en resposta a LPS i ATP (Kelley *et al.*, 2019).

Per comprovar el possible efecte del tractament amb CH sobre l'estrès oxidatiu en els macròfags, es va determinar tant la generació de ROS extracel·lulars per quimioluminescència amb luminol, com la formació de ROS específiques a nivell de la mitocondria per estudi amb MitoSOX™.

1.1.6.1. Determinació de ROS extracel·lulars per quimioluminescència

En aquest protocol es detecta la generació de ROS per reacció amb l'agent quimioluminescent luminol després de l'estímul cel·lular amb TPA, el qual produeix l'activació de la NOX via proteïncinasa C. En la figura 37 s'observa com l'estímul amb TPA produeix l'augment de la quimioluminescència en els macròfags peritoneals, que es veu reduït significativament amb el tractament amb CH, arribant amb la dosi de 10 μ M gairebé als nivells del grup Blanc.

A més a més, el tractament amb CH en absència d'estímul no afecta a la producció de ROS, ja que els valors obtinguts són similars als del grup Blanc.

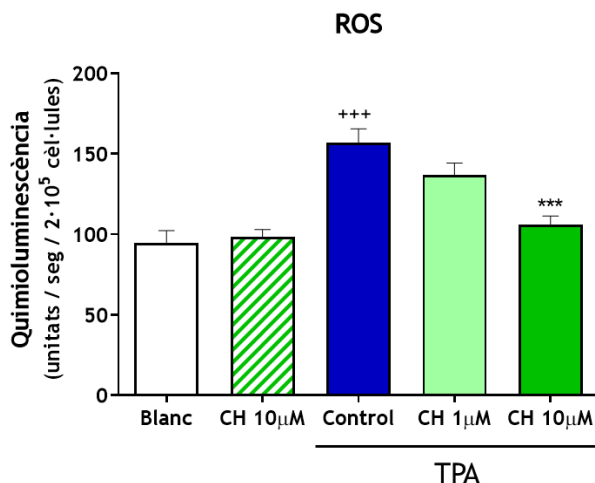


Figura 37: Efecte de la CH sobre l'estrès oxidatiu en macròfags peritoneals estimulats amb TPA. Els nivells de ROS s'expressen en unitats arbitràries de quimioluminescència. Els resultats són expressats amb les seues mitjanes \pm SEM ($n = 4 - 6$). +++ $p < 0,001$ respecte al grup Blanc; *** $p < 0,001$ respecte al grup Control (ANOVA d'una via seguida del test de Tukey)

1.1.6.2. ROS mitocondrials amb MitoSOX™

MitoSOX™ és un reactiu fluorogènic permeable que s'adreça específicament a les mitocondries de les cèl·lules vives, on s'oxida pel superòxid generat produint fluorescència roja. Aquest reactiu és específic del radical superòxid, i no s'oxida per altres ROS ni per espècies reactives del nitrogen (Wojtala *et al.*, 2014).

En aquest protocol, els cultius de macròfags es van tractar durant 4 hores amb LPS i posteriorment 15 minuts amb ATP.

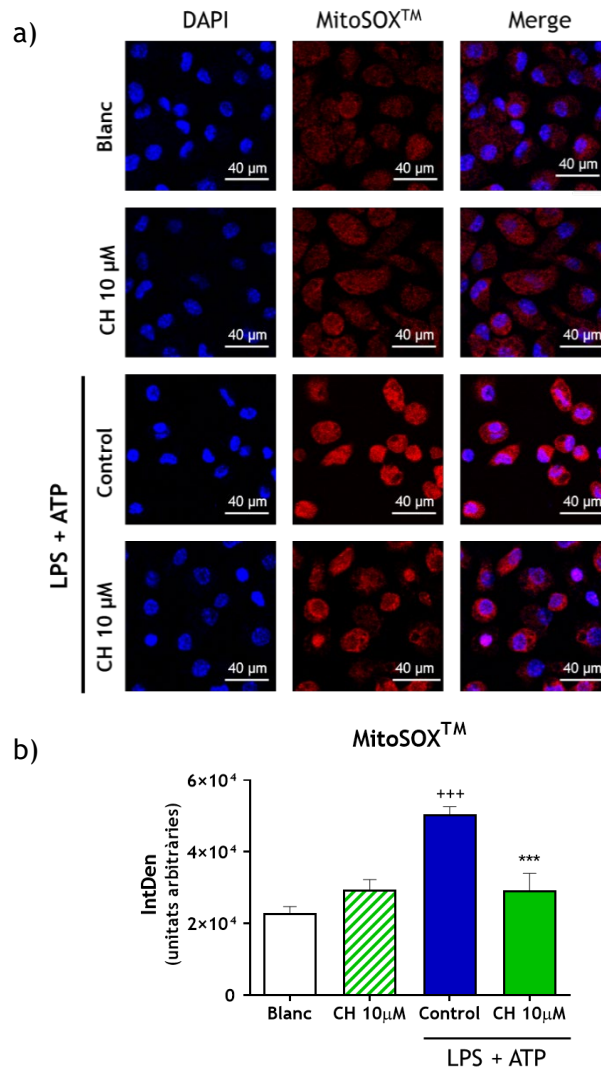


Figura 38: Efecte de la CH en la producció de ROS mitocondrials en macròfags peritoneals estimulats amb LPS i ATP. a) Imatge representativa de la fluorescència obtinguda per reacció amb MitoSOX™ mitjançant un microscopi confocal Olympus FV1000 (objectiu 40x en oli d'immersió), b) Representació de la intensitat integrada (IntDen) obtinguda de la relació entre fluorescència mitja emesa respecte a l'àrea cel·lular. L'anàlisi es du a terme amb el programa FIJI (ImageJ). Els resultats són expressats amb les seues mitjanes \pm SEM (n = 4). +++ $p < 0,001$ respecte al grup Blanc; *** $p < 0,001$ respecte al grup Control (ANOVA d'una via seguida del test de Tukey)

Tal com calia esperar, en les imatges obtingudes al microscopi confocal, es pot observar un augment de la fluorescència roja en els macròfags Control estimulats amb LPS i ATP com a conseqüència de la generació de ROS mitocondrials (figura 38). Aquest efecte es veu reduït de manera significativa pel tractament amb CH quan les cèl·lules estan estimulades. D'altra banda, no s'observen diferències significatives entre les cèl·lules no estimulades en presència o absència de CH.

1.1.6.3. Efecte sobre la translocació d'Nrf2

El factor nuclear Nrf2 està involucrat en la regulació de molts processos antioxidants, antiinflamatoris i de supervivència de la cèl·lula constituint per tant una possible diana terapèutica (Ferrándiz *et al.*, 2018).

El control de l'estrès oxidatiu per part d'Nrf2 pot tenir un paper important en la regulació de l'activació de l'inflamasoma. En aquest sentit, s'ha descrit que l'activació d'Nrf2 en cèl·lules THP1 estimulades amb LPS + ATP és capaç d'inhibir la inducció d'NLRP3 i la consegüent activació de caspasa-1 (Liu, X. *et al.*, 2017). Per tant, els resultats obtinguts fins al moment amb el derivat calcona, fan interessant l'estudi del seu possible efecte sobre l'activació d'Nrf2.

En aquest protocol s'ha determinat la translocació del factor Nrf2 al nucli mitjançant tècniques immunocitoquímiques i microscòpia confocal tal com es detalla en el corresponent apartat de material i mètodes.

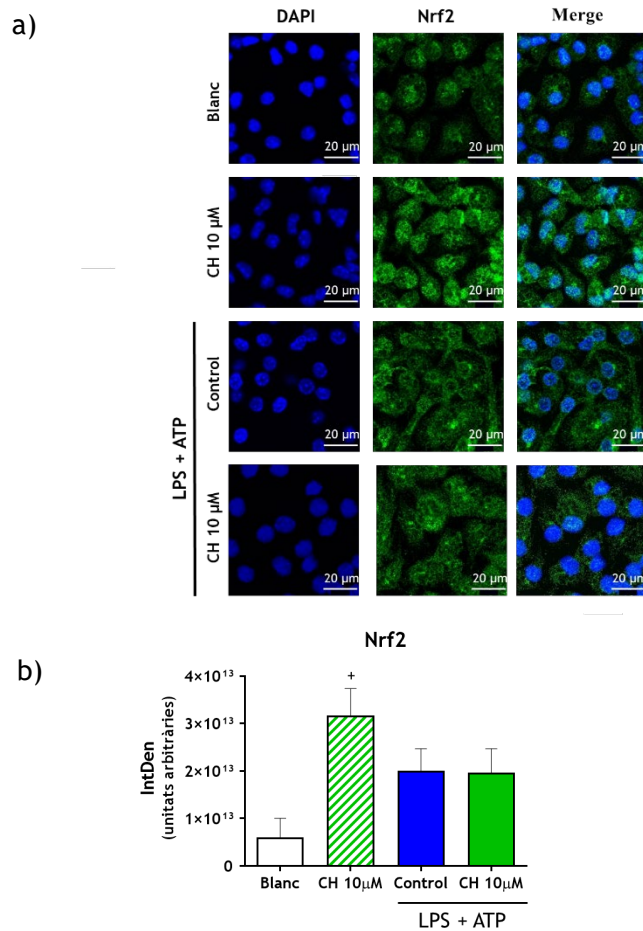


Figura 39: Efecte de la CH en la translocació de l’Nrf2 al nucli cel·lular de macròfags peritoneals estimulats amb LPS i ATP. a) Imatge representativa de la translocació d’Nrf2 al nucli determinada per immunofluorescència amb l’anticòs anti-Nrf2 (1:800) i el secundari *Alexa Fluor® 488*. Les imatges de la fluorescència verda van ser captades per un microscopi confocal Olympus FV1000 (objectiu 40x en oli d’immersió). b) Anàlisi de la intensitat integrada (IntDen) obtinguda a partir de la relació entre fluorescència mitjana i l’àrea del nucli cel·lular. L’anàlisi es du a terme amb el programa FIJI (ImageJ). Els resultats són expressats amb les seues mitjanes \pm SEM ($n = 4$) + $p < 0,05$ respecte al grup Blanc (ANOVA d’una via seguida del test de Tukey)

En la figura 39a, es pot observar com el tractament amb CH en absència d'estímul afavoreix la translocació al nucli del factor Nrf2, en comparació amb les cèl·lules Blanc. Aquest resultat suggereix que CH podria prevenir la resposta inflamatòria en els macròfags mitjançant l'activació d'Nrf2, que a més de controlar l'homeòstasi redox i la producció de ROS en la mitocondria, podria bloquejar la transcripció de citocines proinflamatòries i l'activació de caspasa-1 (Kobayashi *et al.*, 2016; Dinkova-Kostova i Abramov, 2015).

És d'assenyalar que, encara que les dades no són estadísticament significatives (Figura 39b), en els macròfags Control estimulats amb LPS+ATP també s'observa un cert increment de la translocació de l'Nrf2 al nucli, possiblement per a intentar controlar la resposta oxidativa derivada de l'activació cel·lular (Liu, X. *et al.*, 2017). No obstant, en aquestes condicions d'estímul, el tractament amb CH no intensifica la translocació respecte a les cèl·lules Control. En este sentit, podria ser que el potencial dany cel·lular que indueix LPS + ATP, no permetera una major resposta a aquest nivell per part dels macròfags.

Per tant, a pesar del clar perfil del derivat CH com a activador de l'Nrf2 en els macròfags basals, no podem assegurar que la inhibició que produeix sobre l'activació de caspasa-1 i l'alliberament de citocines en els macròfags estimulats estiga relacionat directament amb aquesta translocació de l'Nrf2 al nucli, sinó més bé amb altres mecanismes derivats del seu efecte antioxidant i de la inhibició de l'NF- κ B. No obstant, s'haurien de fer més estudis per a confirmar-ho.

Finalment, i atenent els resultats obtinguts amb les diferents proves dutes a terme amb els macròfags peritoneals, cal destacar l'efecte inhibitor de la CH sobre les citocines proinflamatòries, destacant IL-18 i IL-1 β com a conseqüència de la inhibició de l'activació de la caspasa-1 (Winkler i Rösen-Wolff, 2015). Paral·lelament, el clar perfil

antioxidant d'aquesta molècula i la inhibició de l'activació de factor de transcripció NF- κ B contribueixen al seu potencial antiinflamatori (Forrester *et al.*, 2018).

Així doncs, s'ha decidit continuar l'estudi del derivat calcona en models *in vivo* que ens donaran més informació del possible efecte antiinflamatori d'aquesta molècula i també ajudaran a esclarir el seu mecanisme d'acció.

1.2. ESTUDIS *IN VIVO*

S'han seleccionat dos models animals d'inflamació que permeten determinar els paràmetres abans mencionats. El primer és la bossa d'aire en ratolí estimulada amb cristalls de CPPD i el segon és el model d'artritis gotosa en ratolí induïda per cristalls d'MSU.

1.2.1. Bossa d'aire en ratolí estimulada amb cristalls de CPPD

El model conegut com a bossa d'aire en ratolí simula un procés inflamatori agut i localitzat, en el qual es veuen implicats principalment macròfags i neutròfils. Com s'ha comentat anteriorment, la formació de la bossa d'aire en la zona dorsal del ratolí forma una cambra de cultius en la qual es pot injectar l'agent inductor, com el CPPD, el qual activa la migració leucocitària, donant lloc a l'alliberament d'enzims i mediadors inflamatoris (Campillo-Gimenez *et al.*, 2018).

Per a dur a terme aquest model es va fer un estudi preliminar al nostre laboratori, comparant la resposta inflamatòria produïda per la injecció de CPPD en ratolins de la soca CD-1 i de la soca C75BL/6. Vam seleccionar aquesta última per ser la utilitzada als estudis *ex vivo* i per

presentar resultats més clars i homogenis respecte als mediadors inflamatoris relacionats amb l'activació de l'inflamasoma NLRP3 (Catalán L., 2016). Aquest estudi ens va servir també per a determinar i corroborar amb la bibliografia relacionada que el millor moment per a l'estudi de l'activació de la caspasa-1 era 6 hores després de la injecció de CPPD (Astone G., 2015).

Una vegada seleccionades les condicions idònies i formada la bossa d'aire, el derivat calcona va ser administrat intrabossa (100 µg/bossa), 20 minuts abans de la injecció dels cristalls de CPPD (1 mg/bossa). Finalment a les 6 hores es van sacrificar els animals per a extraure el corresponent exsudat (figura 29).

1.2.1.1. Migració cel·lular i activitat MPO

A l'injectar els cristalls de CPPD en la bossa d'aire, que està recoberta per cèl·lules com macròfags i fibroblasts, es produeix la resposta inflamatòria, caracteritzada per la producció de mediadors químics que creen un flux en els exsudats de la bossa, on s'inclouen entre altres els neutròfils.

- **Migració cel·lular**

L'efecte del derivat calcona sobre la infiltració leucocitària s'ha determinat amb un aparell de comptatge cel·lular a partir de 10 µl de l'exsudat.

En la figura 40 s'observa l'augment de la migració cel·lular a l'interior de la bossa dels ratolins Control estimulats amb CPPD, la qual és inhibida significativament en el grup pretractat amb CH.

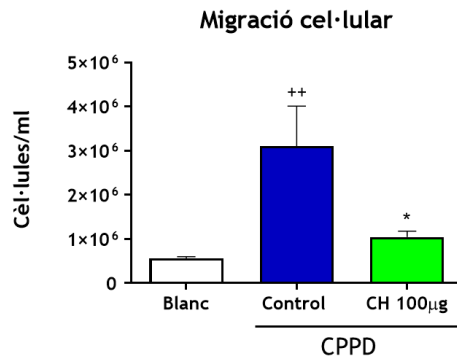


Figura 40: Efecte de la CH sobre la migració cel·lular en la bossa d'aire. Els grups Control i CH s'estimulen amb CPPD. Els resultats són expressats amb les seues mitjanes \pm SEM (n= 4 - 7). ++ $p < 0,01$ respecte al grup Blanc; * $p < 0,05$ respecte al grup Control (ANOVA d'una via seguida del test de Tukey)

- **Activitat MPO**

Una vegada centrifugats els exsudats, i amb la finalitat de confirmar l'efecte inhibidor de la CH sobre la infiltració leucocitària, s'ha determinat en el sobrenedant l'activitat MPO, enzim contingut en els grànuls atzuròfils dels neutròfils, principal tipus cel·lular present en l'exsudat de la bossa d'aire (Campillo-Gimenez *et al.*, 2018).

En la figura 41 podem observar com l'estímul amb CPPD indueix un augment de l'activitat MPO en els sobrenedants de l'exsudat, indicatiu d'un increment en la migració neutrofílica. El tractament amb el derivat CH produeix una inhibició significativa d'aquesta activitat MPO, en concordança amb els resultats obtinguts en el comptatge cel·lular.

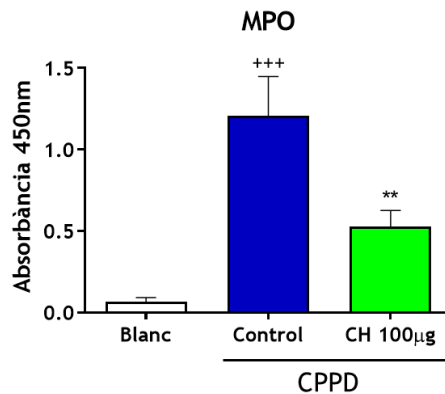


Figura 41: Efecte de la CH sobre l'activitat MPO en sobrenedant de l'exsudat de la bossa d'aire. Els grups Control i CH s'estimulen amb CPPD. Els resultats són expressats amb les seues mitjanes \pm SEM ($n = 4 - 7$). +++ $p < 0,001$ respecte al grup Blanc; ** $p < 0,01$ respecte al grup Control (ANOVA d'una via seguida del test de Tukey)

1.2.1.1. Citocines proinflamatòries

La resposta inflamatòria induïda en la bossa d'aire pels cristalls de CPPD desencadena l'alliberament de citocines proinflamatòries com TNF α i IL-6, així com IL-1 β i IL-18, relacionades en l'activació de l'inflamasoma NLRP3 (Martinon *et al.*, 2006). D'altra banda, també es produeix l'alliberament de CXCL-1 (quimiocina amb activitat quimiotàctica per als neutròfils) com a resultat de l'activació del factor nuclear NF- κ B (Campillo-Gimenez *et al.*, 2018).

Per a comprovar el possible efecte de CH sobre la producció d'aquestes citocines, s'ha utilitzat la tècnica d'ELISA aplicada als sobrenedants de l'exsudat, tal com es detalla en el corresponent apartat de material i mètodes.

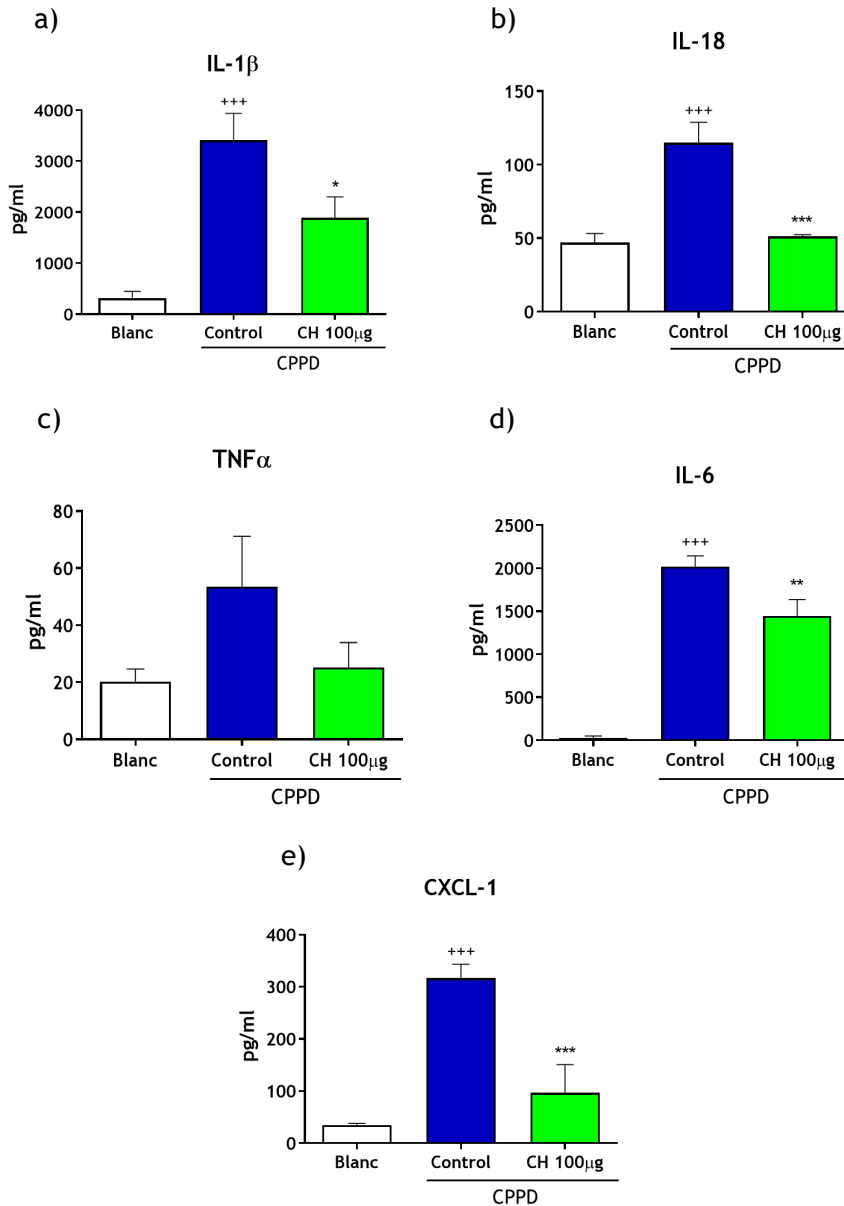


Figura 42: Efecte de la CH sobre l'alliberament de citocines proinflamàtories en el sobrenedant de l'exsudat de la bossa d'aire. a) IL-1 β , b) IL-18, c) TNF α , d) IL-6, e) CXCL-1. Els resultats són expressats amb les seues mitjanes \pm SEM (n = 4 - 7). +++ $p < 0,001$ respecte al grup Blanc; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, respecte al grup Control (ANOVA d'una via seguida del test de Tukey)

En la figura 42, es pot apreciar com el tractament amb el derivat calcona inhibeix de manera significativa tant la producció d'IL-1 β (49 % d'inhibició) com d'IL-18 (96 % d'inhibició), confirmant l'interès de l'estudi de CH sobre l'activació de la caspasa-1. Paral·lelament, també s'observa una reducció de l'alliberament d'IL-6 (23 % d'inhibició) i de TNF α (85 % d'inhibició), encara que aquesta última citocina no presenta resultats estadísticament significatius.

Per últim, és de ressaltar que els nivells de la quimiocina CXCL-1, es redueixen molt significativament en el grup de ratolins tractats amb el derivat calcona (78 % d'inhibició), resultats que estan en plena concordança amb la inhibició de la migració cel·lular i de l'activitat MPO observades en aquest grup.

La resposta inflamatòria induïda en la bossa d'aire pels cristalls de CPPD desencadena l'alliberament de citocines proinflamatòries com TNF α i IL-6, així com IL-1 β i IL-18, relacionades en l'activació de l'inflamasoma NLRP3 (Martinon *et al.*, 2006). D'altra banda, també es produeix l'alliberament de CXCL-1 (quimiocina amb activitat quimiotàctica per als neutròfils) com a resultat de l'activació del factor nuclear NF- κ B (Campillo-Gimenez *et al.*, 2018).

Per a comprovar el possible efecte de CH sobre la producció d'aquestes citocines, s'ha utilitzat la tècnica d'ELISA aplicada als sobrenedants de l'exsudat, tal com es detalla en el corresponent apartat de material i mètodes.

1.2.1.2. Activació de caspasa-1

A la vista de la reducció de l'alliberament de les citocines IL-1 β i IL-18 a l'exsudat de la bossa d'aire observada en el grup de ratolins tractat amb CH (figura 42a i 42b), hem considerat interessant verificar si

aquest efecte pot estar relacionat amb la inhibició de l'activació de la caspasa-1. Així, hem determinat per Western Blot la subunitat activa p20 de caspasa-1 en el sobrenedant de l'exsudat en relació a la subunitat p48 (procaspasa-1) determinada en el *pellet* cel·lular.

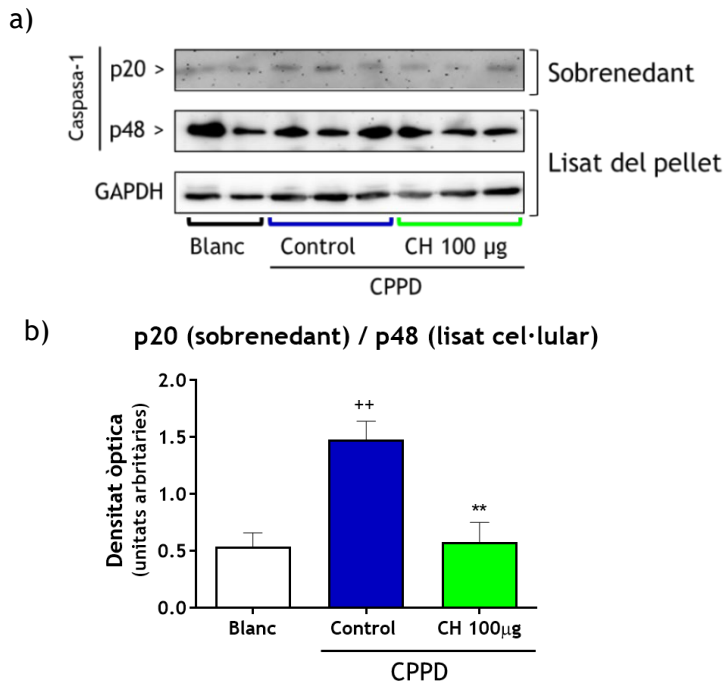


Figura 43: Efecte de CH sobre l'activació de la caspasa-1 en el model de bossa d'aire. a) Imatge representativa de l'estudi per Western Blot de les subunitats p20 i p48 determinades en el sobrenedant i el *pellet* de l'exsudat respectivament. GAPDH és el control de càrrega (10 µg de proteïna). b) Anàlisi densitomètric de les imatges obtingudes expressat per la relació subunitat p20/procaspasa-1 (p48). Els resultats són expressats amb les seues mitjanes \pm SEM (n = 4 - 5). ++ $p < 0,01$ respecte al grup Blanc; ** $p < 0,01$ respecte al grup Control (ANOVA d'una via seguida del test de Tukey)

Veient la figura 43a, s'aprecia un augment en la intensitat de la subunitat p20 determinada en el sobrenedant dels ratolins Control estimulats amb CPPD, respecte al grup de ratolins Blanc. Aquest efecte,

indicatiu de l'activació de la caspasa-1 i el seu alliberament a l'espai extracel·lular, és en part revertit en el grup de ratolins tractats amb CH. L'anàlisi que relaciona la subunitat p20/procaspasa-1 p48 per a cada grup de tractament confirma l'efecte inhibidor de l'activació de la caspasa-1 per part del derivat calcona (figura 43b).

1.2.1.3. Detecció de p-p65-NF- κ B

Els cristalls de pirofosfat càlcic en el model de bossa d'aire produeixen l'activació del factor de transcripció NF- κ B, (Campillo-Gimenez *et al.*, 2018) desencadenant la inducció d'algunes citocines com pro-IL-1 β , pro-IL-18, TNF α i IL-6, a més de promoure l'expressió de l'inflamasoma NLRP3. Aleshores l'NF- κ B pot ser clau en l'activació de la caspasa-1 i és interessant el seu estudi en aquest model (Campillo-Gimenez *et al.*, 2018; Bauernfeind *et al.*, 2009).

L'estudi s'ha realitzat analitzant la subunitat fosforilada activa p65-NF- κ B en els lisats del *pellet* cel·lular de l'exsudat de la bossa d'aire.

En la figura 44, s'observa com la subunitat fosforilada activa p65 es veu augmentada en el grup de ratolins Control respecte al Blanc, com a conseqüència de l'activació de l'NF- κ B pels cristalls de CPPD. El tractament amb CH redueix de manera significativa el senyal d'aquesta subunitat fosforilada en comparació al Control, tal com reflexa l'anàlisi i quantificació de les imatges respecte a la β -actina (figura 44b).

Aquests resultats guarden coherència amb la inhibició tant de les citocines proinflamatòries (figura 42) com de l'activació de la caspasa-1 (figura 43), observades en aquest model experimental, confirmant al mateix temps, els resultats obtinguts en l'estudi preliminar *ex vivo* en els macròfags peritoneals.

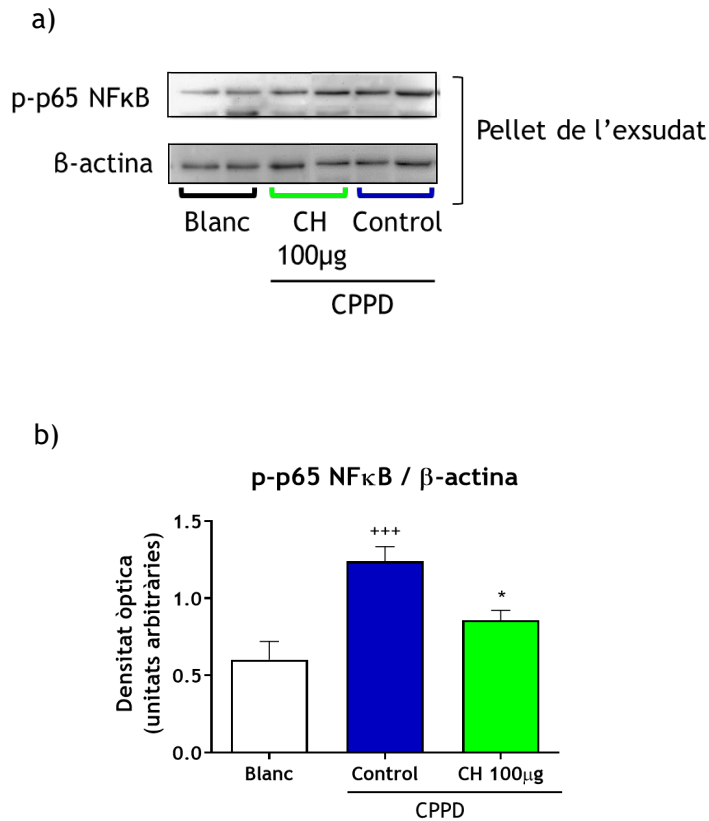


Figura 44: Efecte de inhibició de l'activació de l'NF-κB en la bossa d'aire. a) Imatge representativa de l'estudi per Western Blot de la subunitat p-p65-NF-κB en els lisats cel·lulars del *pellet*. b) Anàlisi densitomètric de totes les imatges obtingudes expressat com els valors de la subunitat p-p65 de l'NF-κB respecte a β-actina. Els resultats són expressats amb les seues mitjanes ± SEM (n= 4 - 5). +++ $p < 0,001$ respecte al grup Blanc; * $p < 0,05$ respecte al grup Control (ANOVA d'una via seguida del test de Tukey)

1.2.2. Artritis gotosa en ratolí induïda per cristalls d'MSU

Per continuar l'estudi de l'efecte antiinflamatori del derivat calcona, hem trobat interessant abordar la patologia de l'artritis gotosa,

caracteritzada per la precipitació dels cristalls d'MSU en les articulacions (So i Martinon, 2017). És sabut que en la reacció inflamatòria induïda per aquests cristalls tenen un paper important els neutròfils i macròfags així com l'activació de l'NF- κ B i del complex multiproteic NLRP3, que mitjançant caspasa-1 dona lloc a l'alliberament de les citocines proinflamatòries (Dalbeth *et al.*, 2016).

El model *in vivo* d'artritis gotosa consisteix en injectar subcutàniament cristalls d'MSU en la pota dreta dels ratolins, per aconseguir les condicions similars a les característiques de l'artritis gotosa (Ferrari *et al.*, 2016; Rasool i Varalakshmi, 2006). Per tant, aquest model ens permet comprovar l'efecte antiinflamatori de CH via oral, així com relacionar tots els paràmetres determinats en els protocols anteriors.

Estudis previs referencien que el millor moment per a l'estudi de l'activitat antiinflamatòria i la relació amb l'inflamasoma NLRP3 en aquest model és 24 hores després de la injecció de l'MSU (Lee *et al.*, 2016). Per tant, en el nostre protocol experimental, 30 minuts després d'haver administrat la calcona via oral (30 mg/kg) s'injecten subcutàniament els cristalls d'MSU (2 mg/pota) i a les 24 hores es sacrifiquen els animals després d'haver mesurat l'edema. Finalment, s'obtenen les potes dretes i s'homogeneïtzen per a determinar els diferents paràmetres.

1.2.2.1. Estudi tempsdependent de la formació de l'edema

La injecció dels cristalls d'MSU en la pota dels animals produeix una reacció inflamatòria que dona lloc al característic edema. Aquest edema és avaluat a diferents temps (1, 3, 6 i 24 hores després de la injecció dels cristalls), mitjançant la mesura volumètrica d'ambdues potes de darrere

amb un pletismòmetre, i el càlcul de la diferència entre la pota dreta (injectada amb MSU) i l'esquerra (sense MSU).

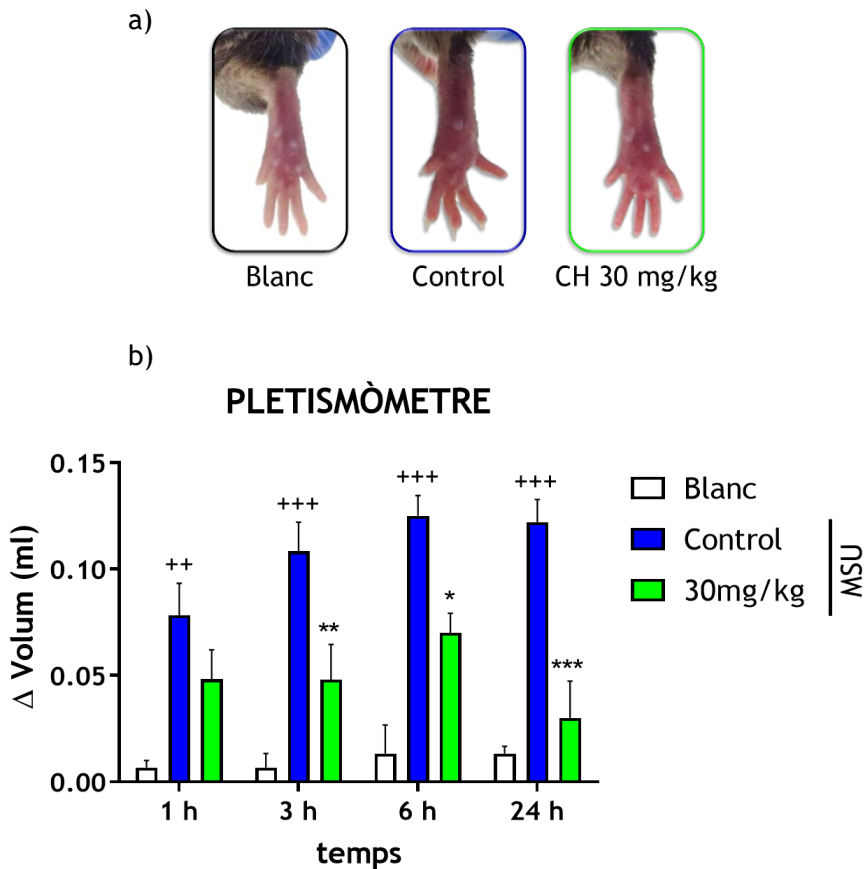


Figura 45: Estudi tempsdependent de l'efecte de CH sobre l'edema en el model d'artritis gotosa. a) Imatges de les potes dretes de darrere representatives de cadascun del grups experimentals. b) Determinació de l'edema induït pels cristalls d'MSU a diferents temps. Els resultats són expressats amb les seues mitjanes \pm SEM ($n=4-7$). ++ $p < 0,01$, +++ $p < 0,001$ respecte al grup Blanc de cada temps; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, respecte al grup Control per a cada temps (ANOVA de dos vies seguida del test de Bonferroni)

En la figura 45, s'observa un augment de l'edema en el grup Control que arriba al màxim a les 6 hores i pràcticament es manté fins a les 24 hores. El tractament amb CH a partir de les 3 hores redueix significativament la formació de l'edema, confirmant les propietats antiinflamatòries d'aquest derivat via oral.

1.2.2.2. Activitat MPO

S'ha demostrat que l'urat és un substrat fisiològic per a l'enzim neutrofílic MPO. Així, els neutròfils són reclutats en el punt afectat per l'artritis gotosa per a fagocitar els cristalls d'urat, els quals poden ser oxidats per l'MPO. És tal la seua presència en aquesta patologia que fins i tot l'MPO està present en la circulació sanguínia dels pacients amb gota (Stamp *et al.*, 2014). A causa d'aquesta relació, s'ha considerat interessant avaluar l'activitat MPO en els homogeneïtzats de la pota dels ratolins.

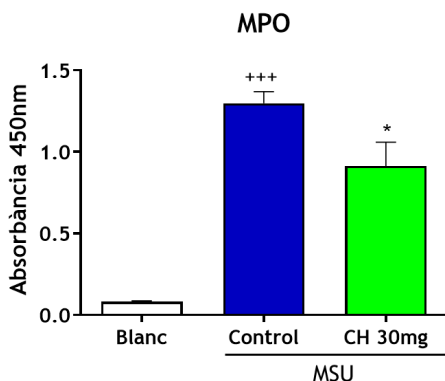


Figura 46: Efecte de la CH sobre l'activitat MPO en els homogeneïtzats de les potes en el model d'artritis gotosa. Els resultats són expressats amb les seues mitjanes \pm SEM ($n = 4 - 7$). +++ $p < 0,001$ respecte al grup Blanc; * $p < 0,05$ respecte al grup Control (ANOVA d'una via seguida del test de Tukey)

En la figura 46 s'observa com els homogenats de les potes del grup Control presenten una activitat MPO elevada com a conseqüència de la migració neutrofílica derivada de la injecció dels cristalls d'MSU. El tractament amb CH redueix significativament aquesta activitat MPO, efecte que confirmen els resultats previs obtinguts en el model de bossa d'aire en ratolí, on l'administració de la calcona ha reduït tant l'activitat MPO (figura 41) com la migració leucocitària (figura 40).

Per a confirmar la implicació de CH en la inhibició del reclutament de neutròfils també analitzarem la quimiocina CXCL-1 en el següent apartat.

1.2.2.3. Determinació de citocines proinflamatòries

Com s'ha comentat abans, l'MSU indueix una reacció inflamatòria que és dirigida per components del sistema immunitari innat. L'activació dels fagòcits pels cristalls MSU produeix la secreció de citocines proinflamatòries relacionades amb l'activació de caspasa-1 i del factor NF- κ B com són IL-1 β , IL-18, TNF α , IL-6 i CXCL-1, entre altres (Martin i Harper, 2009). En el següent apartat s'avalua l'efecte del derivat calcona sobre l'alliberament d'aquestes citocines mitjançant la tècnica ELISA aplicada als homogeneïtzats de la pota posterior dreta.

En la figura 47 s'observa com l'augment dels nivells de les citocines induït per la injecció dels cristalls d'MSU en les potes dels animals Control, és inhibit significativament amb l'administració oral del derivat calcona.

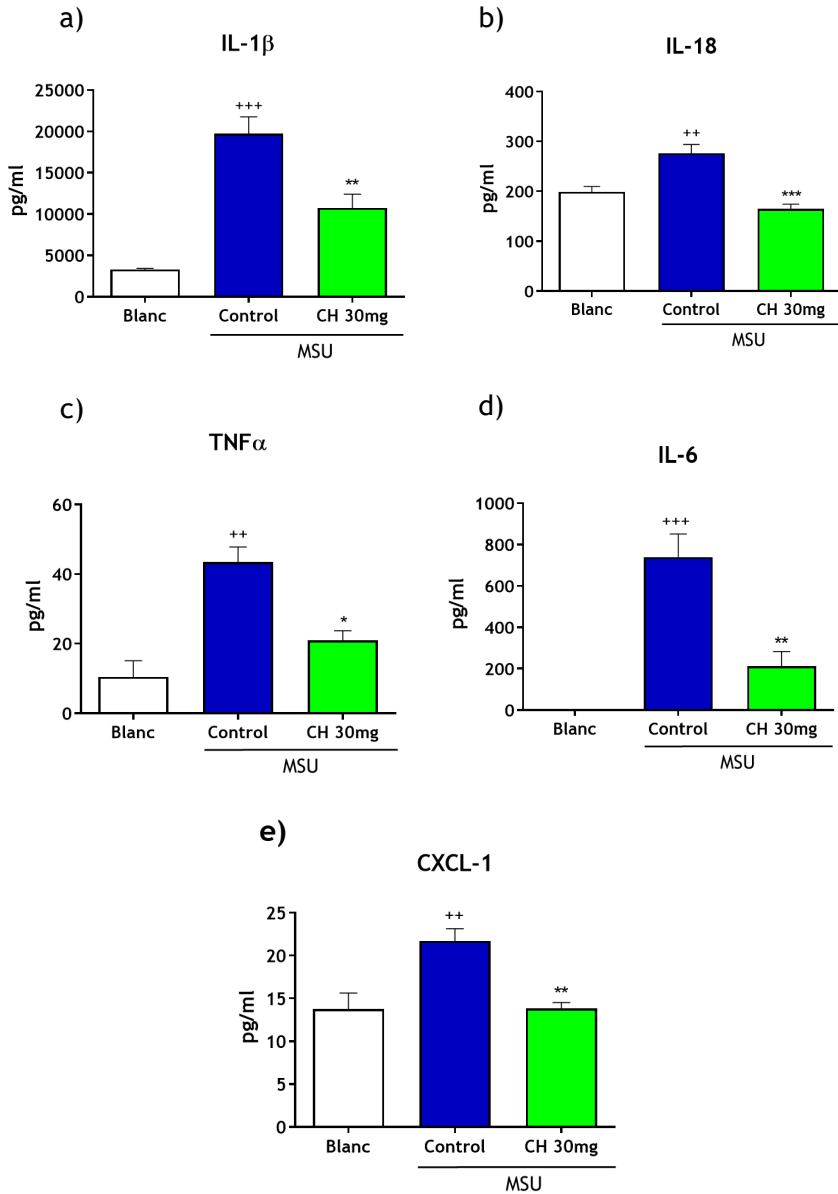


Figura 47: Efecte de la CH sobre l'alliberament de citocines proinflamàtòries en el model d'artritis gotosa. a) IL-1 β . b) IL-18. c) TNF α . d) IL-6. e) CXCL-1. Els resultats són expressats amb les seues mitjanes \pm SEM (n = 4 - 7). ++ p < 0,01, +++ p < 0,001 respecte al grup Blanc; * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001 respecte al grup Control (ANOVA d'una via seguida del test de Tukey)

També s'ha de valorar la reducció significativa dels nivells de la quimiocina CXCL-1 després del tractament amb CH, ja que concorda amb la inhibició de l'activitat MPO determinada com a índex de la migració neutrofílica induïda pels cristalls d'MSU (figura 46). Això pot indicar que la calcona és capaç d'inhibir el reclutament de neutròfils en les articulacions, característica de l'atac de gota.

1.2.2.4. Activació de caspasa-1

Les deposicions intraarticulars de cristalls d'MSU desencadenen la resposta inflamatòria, interactuen amb els macròfags residents i activen l'inflamasoma NLRP3, que al seu torn activa la caspasa-1 donant lloc a les formes actives de les citocines proinflamatòries IL-1 β i IL-18 (Kazazian, 2014).

Per tant, s'ha analitzat en aquest model l'activació de la caspasa-1 mitjançant la tècnica Western Blot, avaluant la subunitat activa p20 en relació a la procaspasa-1 (p48), ambdues determinades en els homogeneïtzats de les potes.

En la figura 48 s'aprecia la disminució del senyal de la subunitat activa p20 en els grups tractats amb calcona comparant-ho respecte al grup Control, la qual cosa pot significar una inhibició de l'activació de la caspasa-1 que justificaria la reducció dels nivells de les citocines IL-18 i IL-1 β en les potes dels animals tractats amb CH.

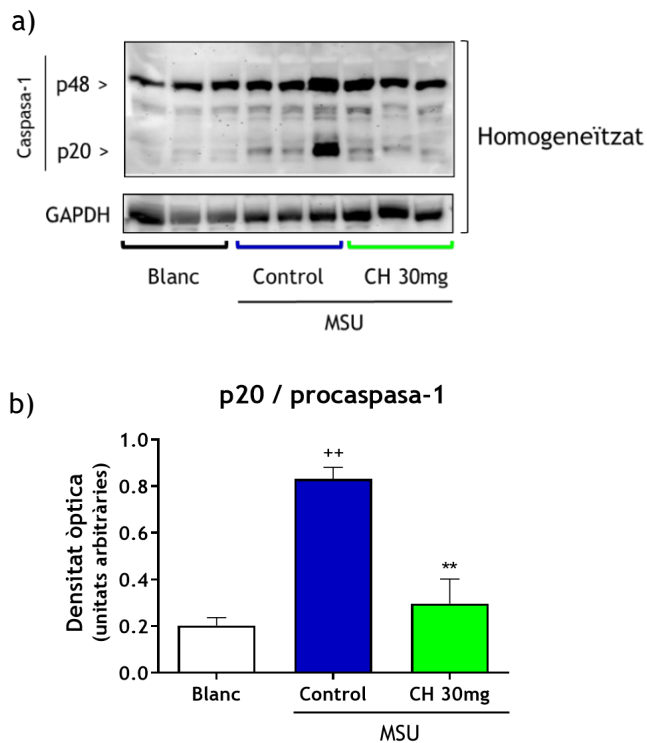


Figura 48: Efecte de CH sobre l'activació de la caspasa-1 en el model d'artritis gotosa. a) Imatge representativa de l'estudi per Western Blot de les subunitats p20 i p48 determinades en l'homogeneïtzat de les potes dels diferents grups. GAPDH utilitzada com a control de càrrega (10 µg de proteïna). b) Anàlisi densitomètric de les imatges obtingudes expressat per la relació subunitat p20/procaspasa-1 (p48). Els resultats són expressats amb les seues mitjanes ± SEM (n = 4 - 5). ++ p < 0,01 respecte al grup Blanc; ** p < 0,01 respecte al grup Control (ANOVA d'una via seguida del test de Tukey)

1.2.2.5. Detecció de p-p65-NF-κB

El factor de transcripció NF-κB es veu també involucrat en la resposta proinflamatòria induïda pels cristalls d'MSU. Quan la subunitat p-p65 alliberada es transloca al nucli dona lloc a l'expressió de diversos gens proinflamatoris (Liu, T. *et al.*, 2017; Lee *et al.*, 2016).

Diverses citocines com TNF α i IL-1 β activen l'NF- κ B, que al seu torn regula l'expressió dels gens que donen lloc de nou a citocines proinflamàtores com IL-1 β , TNF α i IL-6. A més l'NF- κ B activat promou l'expressió de l'inflamasoma NLPR3 (Bauernfeind *et al.*, 2009).

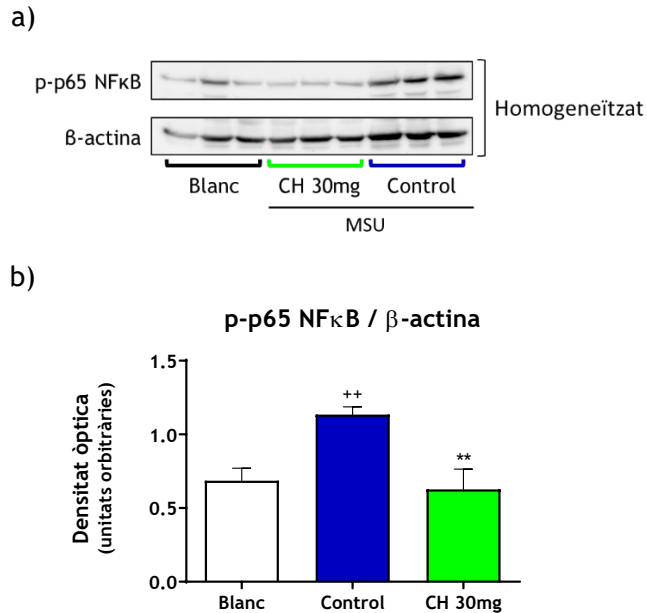


Figura 49: Efecte de CH sobre la fosforilació de la subunitat p-65 d'NF- κ B en el model d'artritis gotosa. a) Imatge representativa de l'estudi per Western Blot en homogeneïtzat de pota (10 μ g proteïna). b) Anàlisi densitomètric de totes les imatges obtingudes expressat per la relació entre la subunitat p-65 de l'NF- κ B respecte a la β -actina. Els resultats són expressats amb les seues mitjanes \pm SEM (n = 4 - 5). ++ p < 0,01 respecte al grup Blanc; ** p < 0,01 respecte al grup Control (ANOVA d'una via seguida del test de Tukey)

En l'actual estudi hem analitzat la subunitat activa p-p65 de l'NF- κ B en els homogeneïtzats de les potes mitjançant la tècnica de Western Blot.

En la figura 49 es pot observar com la subunitat p-p65 d'NF- κ B, augmentada en el grup Control respecte al Blanc, disminueix significativament amb el tractament amb CH. Aquesta disminució pot estar relacionada amb la reducció de les citocines proinflamatòries (figura 47). Per tant, la CH podria prevenir l'activació de l'NF- κ B.

2. ESTUDI DE L'EFECTE FARMACOLÒGIC D'OSTEOSTATINA

2.1. ESTUDIS *EX VIVO* EN MACRÒFAGS PERITONEALS

Com s'ha comentat en el corresponent apartat d'introducció, estudis previs han demostrat l'efecte inhibidor d'osteostatina sobre l'alliberament de citocines proinflamatòries i l'activació de l'NF- κ B en osteoblasts (Platas *et al.*, 2017). Per tant, és interessant aprofundir en l'estudi del potencial antiinflamatori de aquest pèptid en cèl·lules involucrades en la resposta immunitària innata com són els macròfags.

Una vegada aïllats els macròfags del peritoneu de la soca de ratolí C57BL/6, aquests són sembrats en plaques i cultivats durant 18 hores abans d'aplicar el tractament amb OT a les concentracions de 100 nM o 500 nM. Als 30 minuts s'afegeix l'agent estimulant LPS (1 μ g/ml, 4 hores) i finalment l'ATP (5 mM, 30 minuts).

2.1.1. Determinació de la citotoxicitat per l'assaig MTT

Encara que l'absència de citotoxicitat de l'osteostatina ja s'ha determinat en altres estudis (Platas *et al.*, 2017), hem considerat necessari verificar aquests resultats en les condicions actuals de treball, tal i com ja s'ha comentat en el capítol anterior. Per tant, s'ha realitzat l'assaig MTT després dels corresponents tractaments amb OT (100 nM i 500 nM).

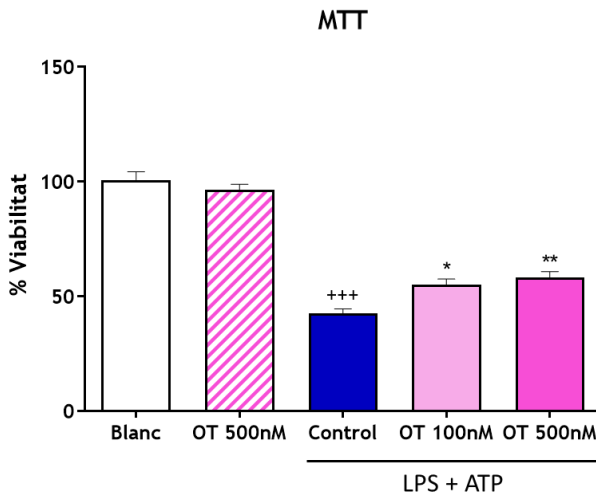


Figura 50: Efecte de l'OT sobre la viabilitat cel·lular de macròfags peritoneals estimulats amb LPS i ATP. Els resultats s'expressen assignant el 100 % de la viabilitat al valor de la mitjana de les absorbàncies del grup de cèl·lules no estimulades (grup Blanc) i en relació a aquest s'estableixen els diferents percentatges de viabilitat. Els resultats són expressats amb les seues mitjanes ± SEM (n = 6). +++ $p < 0,001$ respecte al grup Blanc; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ respecte al grup Control (ANOVA d'una via seguida del test de Tukey)

En la figura 50 es pot veure com hi ha una reducció molt acusada de la viabilitat en les cèl·lules estimulades amb LPS i ATP respecte a les cèl·lules Blanc. Aquest efecte ja s'havia posat de manifest en l'estudi anterior amb el derivat calcona, i confirma el dany cel·lular que produeix aquest estímul com a conseqüència del procés de piroptosi. Però tanmateix, es veu un augment significatiu del percentatge de viabilitat cel·lular en els macròfags tractats amb les dues concentracions d'osteostatina, comparat amb el grup Control. Per tant, OT podria actuar com a protector de la viabilitat cel·lular en aquestes condicions.

2.1.2. Determinació de citocines proinflamatòries

S'ha avaluat l'efecte d'OT sobre les citocines generades als macròfags peritoneals estimulats mitjançant la tècnica d'ELISA aplicada als sobrenedants cel·lulars.

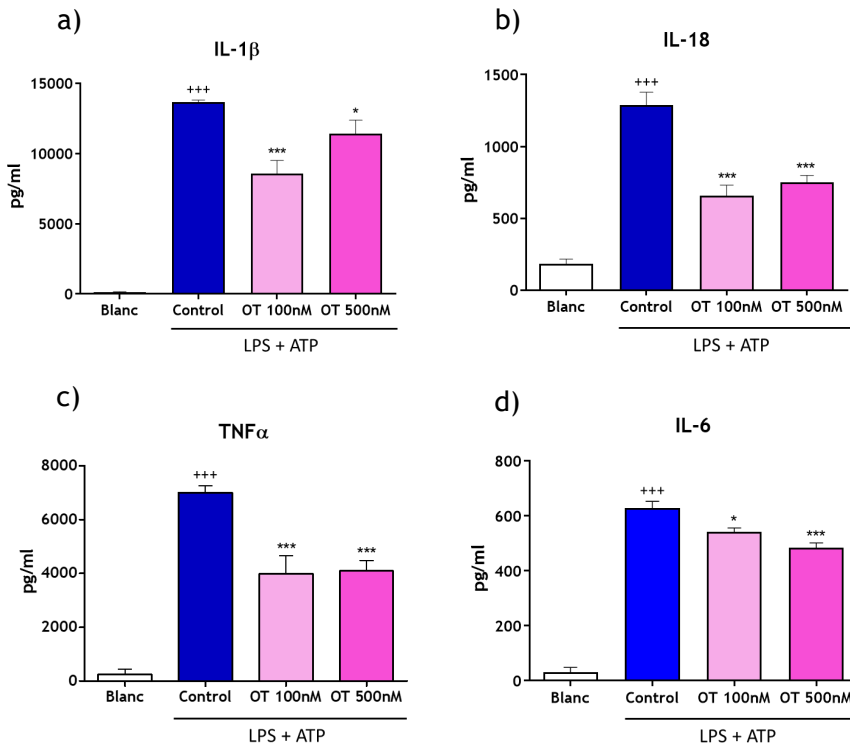


Figura 51: Efecte de l'OT sobre l'alliberament de citocines proinflamatòries en macròfags peritoneals estimulats amb LPS i ATP. a) IL-1 β . b) IL-18. c) TNF α . d) IL-6. Els resultats són expressats amb les seues mitjanes \pm SEM (n = 6). +++ $p < 0,001$ respecte al grup Blanc; * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ respecte al grup Control (ANOVA d'una via seguida del test de Tukey)

En la figura 51, s'observa que el tractament amb osteostatina produeix una inhibició significativa de totes les citocines proinflamatòries analitzades a les dues concentracions assajades. Encara que no hi ha una relació concentració-dependència clara, es pot destacar la inhibició d'IL-1B i IL-18 (38 % i 46 % d'inhibició respectivament a 100 nM), ja que ambdues citocines estan relacionades amb l'activació de la caspasa-1 (Dinarello *et al.*, 2013).

D'altra banda, les citocines TNF α i IL-6 també es veuen disminuïdes significativament pel tractament amb osteostatina.

2.1.3. Activació de caspasa-1

Per a la determinació de l'activació de la caspasa-1, hem analitzat per Western Blot la subunitat p20 alliberada al sobrenedant dels cultius dels macròfags peritoneals, respecte a la p48 (procaspasa-1) determinada en els lisats cel·lulars.

En la figura 52a es pot veure com l'alliberament de la subunitat p20 a l'espai extracel·lular és molt elevat en el grup Control i en canvi es veu reduït en les cèl·lules tractades amb OT a les dues concentracions estudiades. En l'anàlisi densitomètric de la figura 52b on comparem la subunitat p20 del sobrenedant respecte a la p48 del lisat cel·lular, s'evidencia aquesta reducció significativa produïda pel tractament amb l'osteostatina, encara que tampoc s'observa una relació concentració-dependència clara, al igual que amb els resultats anteriors.

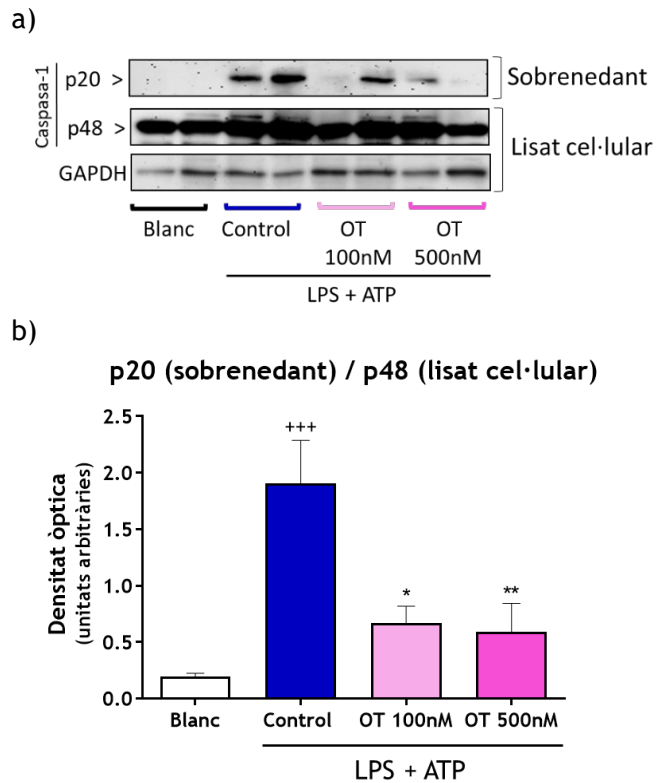


Figura 52: Inhibició de l'activació de caspasa-1 per l'osteostatina en macròfags peritoneals estimulats amb LPS i ATP. a) Imatge representativa de l'estudi per Western Blot de les subunitats p20 i p48 determinades en el sobrenedant i el lisat cel·lular respectivament. GAPDH ha estat utilitzada com a control de càrrega (10 μ g de proteïna). b) Anàlisi densitomètric de les imatges obtingudes expressat per la relació subunitat p20 / procaspasa-1 (p48). Els resultats són expressats amb les seues mitjanes \pm SEM (n = 4 - 5). +++ $p < 0,001$ respecte al grup Blanc; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ respecte al grup Control (ANOVA d'una via seguida del test de Tukey)

2.1.4. Avaluació de la piroptosi per l'assaig d'LDH

L'efecte inhibitor de l'osteostatina sobre l'activació de la caspasa-1 fa interessant l'estudi de l'efecte d'aquest pèptid sobre el fenomen de piroptosi mitjançant la determinació de l'alliberament d'LDH al sobrenedant dels macròfags (Rayamajhi *et al.*, 2014).

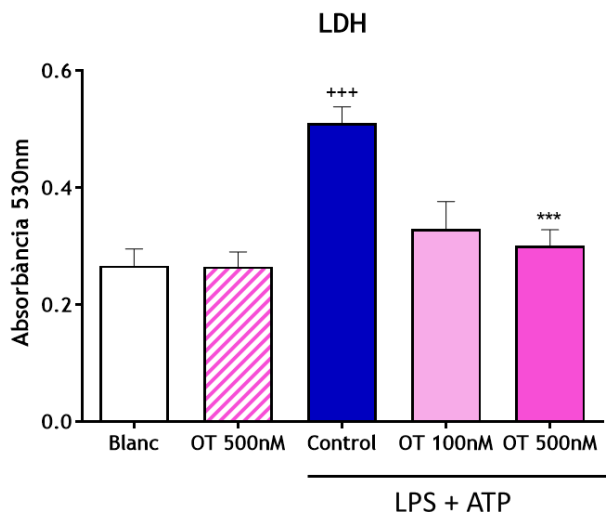


Figura 53: Efecte d'OT sobre l'alliberament d'LDH en macròfags peritoneals estimulats amb LPS i ATP. Els resultats són expressats amb les seues mitjanes \pm SEM ($n = 6$). +++ $p < 0.001$ respecte el Blanc; *** $p < 0,001$ respecte al Control (ANOVA d'una via seguida del test de Tukey)

En aquest assaig es pot veure com, en absència d'estímul, el tractament dels macròfags amb OT dona uns nivells d'absorbància similars als Blancs, confirmant l'absència de toxicitat d'aquest pèptid per si mateix. D'altra banda, el tractament amb OT (500 nM) en presència de LPS + ATP, aconsegueix reduir pràcticament un 100 % l'alliberament d'LDH produït en les cèl·lules Control. Per tant, OT podria tenir un efecte protector sobre la piroptosi cel·lular (figura 53).

2.1.5. Activació d'NF- κ B

La inhibició de l'alliberament de citocines proinflamatòries en els macròfags peritoneals per part d'osteostatina, fa interessant l'estudi del seu possible efecte sobre l'activació de l'NF- κ B com a factor de transcripció clau en l'expressió d'aquestes citocines, així com de l'expressió del propi NRLP3 (Liu, T. *et al.*, 2017; Lee *et al.*, 2016). Per tant, en el següent estudi hem analitzat, mitjançant la tècnica de Western Blot, la subunitat fosforilada p65 de l'NF- κ B en el lisat cel·lular.

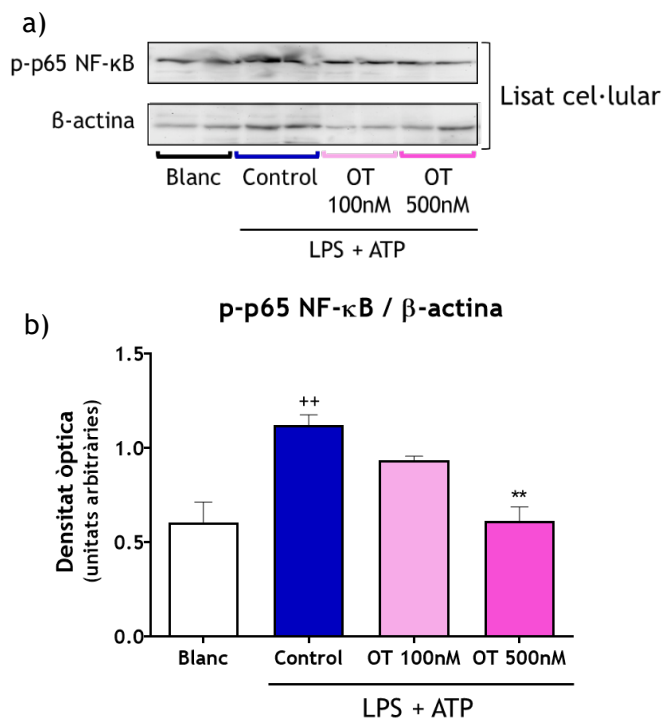


Figura 54: Efecte de l'OT sobre la fosforilació de la subunitat p-p65 d'NF- κ B en macròfags peritoneals estimulats per LPS i ATP. a) Imatge representativa de l'estudi per Western Blot en el lisat cel·lular (10 μ g proteïna). b) Anàlisi densitomètric de totes les imatges obtingudes expressat per la relació subunitat p65 de l'NF- κ B respecte a β -actina. Els resultats són expressats amb les seues mitjanes \pm SEM (n = 4 - 5). ++ $p < 0.01$ respecte el Blanc; ** $p < 0,01$ respecte al Control (ANOVA d'una via seguida del test de Tukey)

En la figura 54 podem observar com l'augment de la subunitat p-p65 en els macròfags estimulats amb LPS + ATP es veu reduït pel tractament amb OT a la concentració més elevada. L'anàlisi d'imatge relacionant les dades densitomètriques respecte a la β -actina confirma que hi ha una reducció significativa de l'activació de l'NF- κ B a la concentració d'OT 500 nM.

2.1.6. Determinació de la generació de ROS

Com ja s'ha comentat anteriorment, la producció de ROS és una de les primeres respostes cel·lulars degudes al reconeixement d'un patògen. A més, és coneguda la seua implicació en les vies d'activació de la inflamació (Forrester *et al.*, 2018).

Pel que fa a l'OT, recentment s'ha demostrat que aquest pèptid presenta propietats antioxidants en estudis realitzats amb osteoblasts (Portal-Núñez *et al.*, 2018).

En aquest apartat comprovarem com afecta l'OT a l'estrès oxidatiu en els macròfags. Així, determinarem tant l'alliberament de ROS extracel·lulars per tècniques quimioluminescents, com la producció de ROS mitocondrials mitjançant tècniques fluororimètriques.

2.1.6.1. ROS extracel·lulars per quimioluminescència

En aquesta tècnica, la generació de ROS produïda per l'estímul de TPA reacciona amb luminol per a donar un senyal quimioluminescent. En la figura 55 s'observa com amb l'estímul de TPA es produeix un augment de la generació dels ROS extracel·lulars que es veu reduït significativament en els macròfags tractats amb OT.

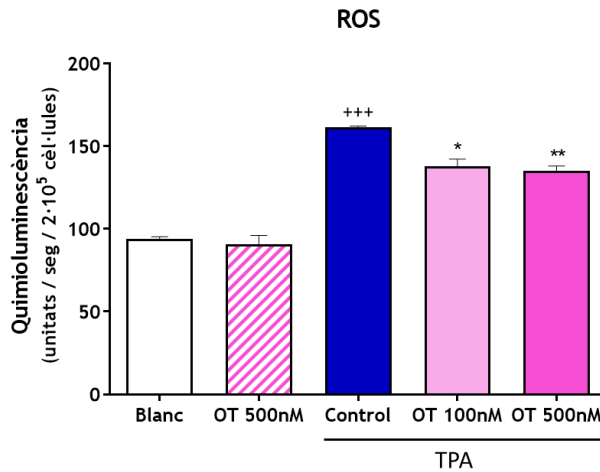


Figura 55: Efecte de l'OT sobre l'estrès oxidatiu en macròfags peritoneals estimulats amb TPA. Els nivells de ROS generats són expressats com unitats arbitràries de quimioluminescència. Les dades estan representades com les mitjanes \pm SEM ($n = 6$). +++ $p < 0,001$ respecte al grup Blanc; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ respecte al grup Control (ANOVA d'una via seguida del test de Tukey)

2.1.6.2. ROS mitocondrials amb MitoSOX™

En la figura 56 es pot observar com l'estímul amb LPS + ATP produeix un increment de la fluorescència derivada de l'oxidació del MitoSOX™ per les ROS mitocondrials generades. El tractament amb OT a la concentració 500 nM, produeix una reducció significativa d'aquesta fluorescència, confirmant per tant l'efecte antioxidant.

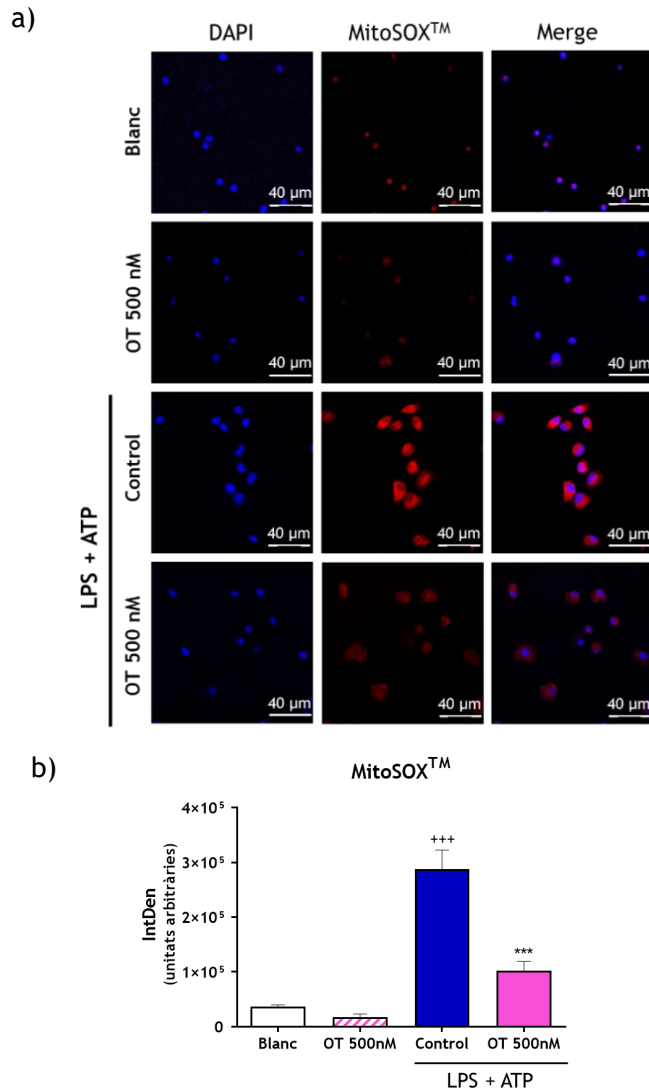


Figura 56: Efecte de la OT en la producció de ROS mitocondrials en macròfags peritoneals estimulats amb LPS i ATP. a) Imatge representativa de la fluorescència per reacció de les ROS mitocondrials amb MitoSOXTM. Imatges obtingudes mitjançant un microscopi confocal Olympus FV1000 (objectiu 40x en oli d'immersió) b) Representació de la intensitat integrada obtinguda de la relació entre fluorescència mitjana emesa pel MitoSOX^{MT} respecte a l'àrea cel·lular. L'anàlisi es du a terme amb el programa FIJI (ImageJ). Els resultats són expressats amb les seues mitjanes ± SEM (n = 4). +++ $p < 0,001$ respecte al grup Blanc; *** $p < 0,001$ respecte al grup Control (ANOVA d'una via seguida del test de Tukey)

2.1.6.3. Efecte sobre la translocació d'Nrf2

Com s'ha comentat anteriorment, el control de l'estrès oxidatiu per part d'Nrf2 pot tenir un paper important en la regulació de la inflamació i de l'activació de caspasa-1. A més, s'ha descrit que aquest factor de transcripció Nrf2 també pot inhibir la transcripció de mediadors inflamatoris per mecanismes independents de l'estrès oxidatiu (Kobayashi *et al.*, 2016). Per tant, hem considerat interessant determinar el possible efecte d'OT sobre la translocació de l'Nrf2 al nucli, mitjançant tècniques immunocitoquímiques amb microscòpia confocal.

En la figura 57 podem observar que, en absència d'estímul, el tractament amb OT augmenta la translocació de l'Nrf2 respecte a les cèl·lules Blanc, encara que les dades no són estadísticament significatives. Paral·lelament, els macròfags estimulats amb LPS + ATP també presenten una tendència a augmentar la translocació, possiblement per a controlar la resposta oxidativa i l'activació cel·lular que indueix aquest estímul (Ferrándiz *et al.*, 2018).

Aquests resultats, molt similars als obtinguts en l'estudi realitzat amb el derivat calcona, fan sospitar que possiblement les cèl·lules estan danyades per l'estímul, per la qual cosa no es podria produir la translocació al nucli de l'Nrf2 amb la mateixa eficiència que amb l'OT en les cèl·lules basals.

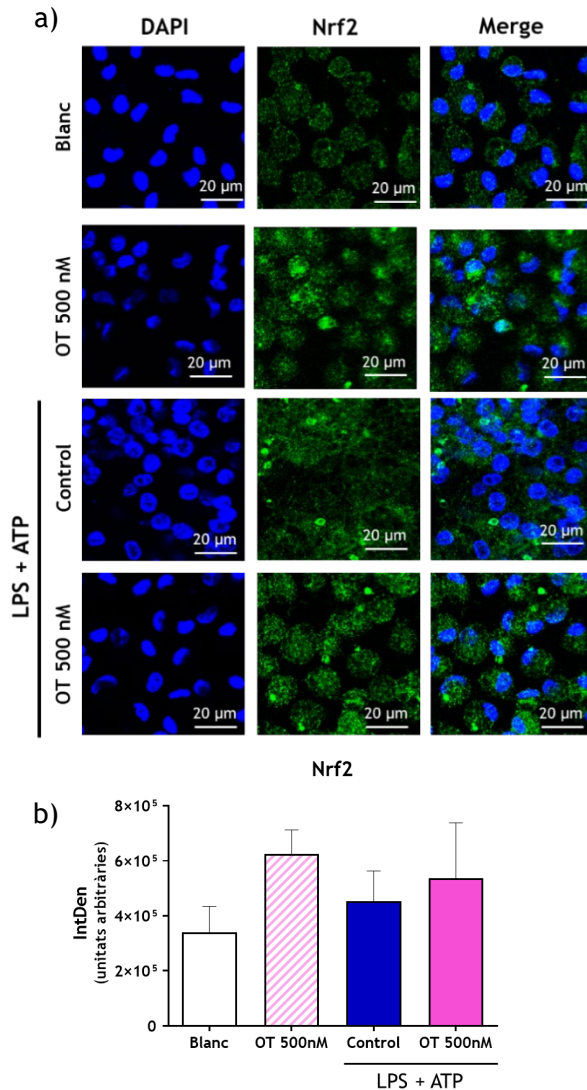


Figura 57: Efecte de l'OT en la translocació de l'Nrf2 al nucli cel·lular de macròfags peritoneals estimulats amb LPS i ATP . a) Imatge representativa de la translocació d'Nrf2 al nucli determinada per immunofluorescència amb l'anticòs anti-Nrf2 (1:800) i el secundari *Alexa Fluor*® 488. Les imatges de la fluorescència verda van ser captades per un microscopi confocal Olympus FV1000 (objectiu 40x en oli d'immersió) b) Anàlisi de la intensitat integrada obtinguda a partir de la relació entre fluorescència mitja i l'àrea del nucli cel·lular. L'anàlisi es du a terme amb el programa FIJI (ImageJ). Els resultats són expressats amb les seues mitjanes ± SEM (n = 4). (ANOVA d'una via seguida del test de Tukey)

Finalment, i com a resum dels estudis *ex vivo*, podem dir que l'osteostatina presenta propietats antioxidants en macròfags peritoneals, reduint la producció de ROS extracel·lulars i mitocondrials, a més de veure's una tendència a augmentar la translocació de l'Nrf2 al nucli en condicions basals. Aquest derivat peptídic també inhibeix l'activació del factor NF- κ B i la consegüent producció de citocines proinflamatòries, entre les que cal destacar l'IL-1 β i l'IL-18 derivades de l'activació de la caspasa-1. La inhibició de l'activació d'aquest enzim pot contribuir a l'efecte protector d'OT front a la citotoxicitat i el procés de piroptosi.

2.2. ESTUDIS *IN VIVO*

Per a completar l'estudi del perfil antiinflamatori del pèptid osteostatina hem seleccionat, a l'igual que en l'estudi del derivat calcona, dos models *in vivo* d'inflamació aguda relacionats amb aquests paràmetres: la bossa d'aire en ratolí estimulada amb cristalls de CPPD i el model d'artritis gotosa en ratolí induïda per cristalls d'MSU.

2.2.1. Bossa d'aire en ratolí estimulada amb cristalls de CPPD

Aquest model s'ha desenvolupat en les mateixes condicions comentades anteriorment per al derivat CH. Un cop formada la bossa en els ratolins C75BL/6 mascles (6^e dia), s'administra OT via intrabossa a dues dosis (3 μ g/bossa i 6 μ g/bossa). Als 20 minuts s'injecta l'agent irritant CPPD (1 mg/bossa). Finalment, a les 6 hores se sacrifiquen els animals i s'injecta 1 ml de sèrum fisiològic per extraure l'exsudat.

2.2.1.1. Migració cel·lular i activitat MPO

○ Migració cel·lular

Una vegada recollit l'exsudat de la bossa, s'agafen 10 µl per a realitzar el comptatge cel·lular en un comptador Beckman Coulter™.

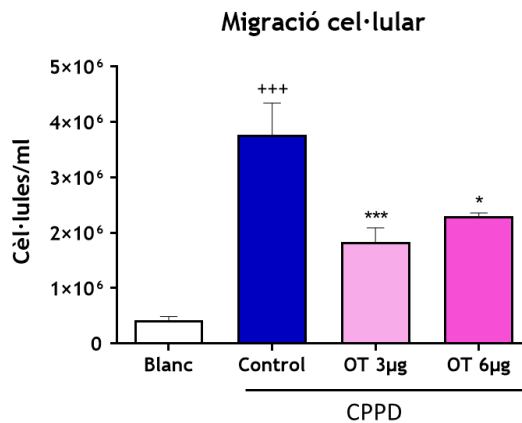


Figura 58: Efecte de l'OT sobre la migració cel·lular en la bossa d'aire. Els resultats són expressats amb les seues mitjanes ± SEM (n= 6 - 8). +++ $p < 0.001$ respecte el Blanc; * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ respecte al Control (ANOVA d'una via seguida del test de Tukey)

En la figura 58 s'observa un gran increment de la migració cel·lular en la bossa dels ratolins Control als quals se'ls havien injectat els cristalls de CPPD. El tractament amb OT produeix una disminució significativa d'aquesta migració a les dues dosis assajades.

○ Activitat MPO

Una vegada centrifugats els exsudats es mesura l'activitat MPO en els sobrenedants mitjançant un anàlisi colorimètric.

En la figura 59, podem observar que hi ha un augment de l'activitat MPO en el grup Control que se correspon amb l'increment de la infiltració

cel·lular observada en la figura 58. El tractament amb osteostatina redueix significativament aquesta activitat MPO a ambdues dosis assajades, confirmant per tant l'efecte inhibitor d'aquest pèptid sobre la migració cel·lular en el model de la bossa d'aire.

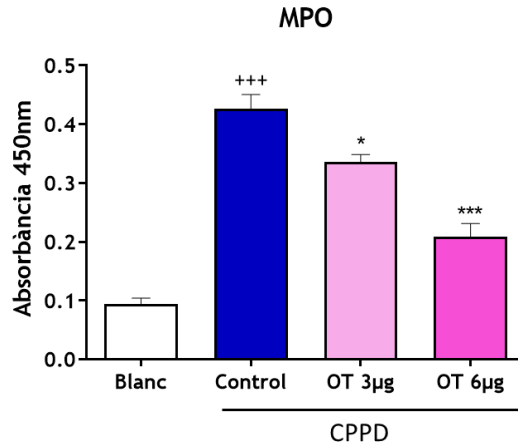


Figura 59: Efecte de l'OT sobre l'activitat MPO en l'exsudat de la bossa d'aire. Els resultats són expressats amb les seues mitjanes \pm SEM (n= 6 - 8). +++ $p < 0.001$ respecte el Blanc; * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ respecte al grup Control (ANOVA d'una via seguida del test de Tukey)

2.2.1.2. Citocines proinflamàtores

S'han avaluat diverses citocines proinflamàtores en els sobrenedants de l'exsudat de la bossa mitjançant la tècnica ELISA.

En la figura 60 s'observa com les citocines IL-1B i IL-18, ambdues relacionades amb l'activació de la caspasa-1, experimenten una disminució significativa de la seua concentració en la bossa d'aire en els grups de ratolins tractats amb OT, obtenint un 58 % d'inhibició per a IL-1B i pràcticament el 100 % d'inhibició per a IL-18 a la dosi de 6 µg/bossa.

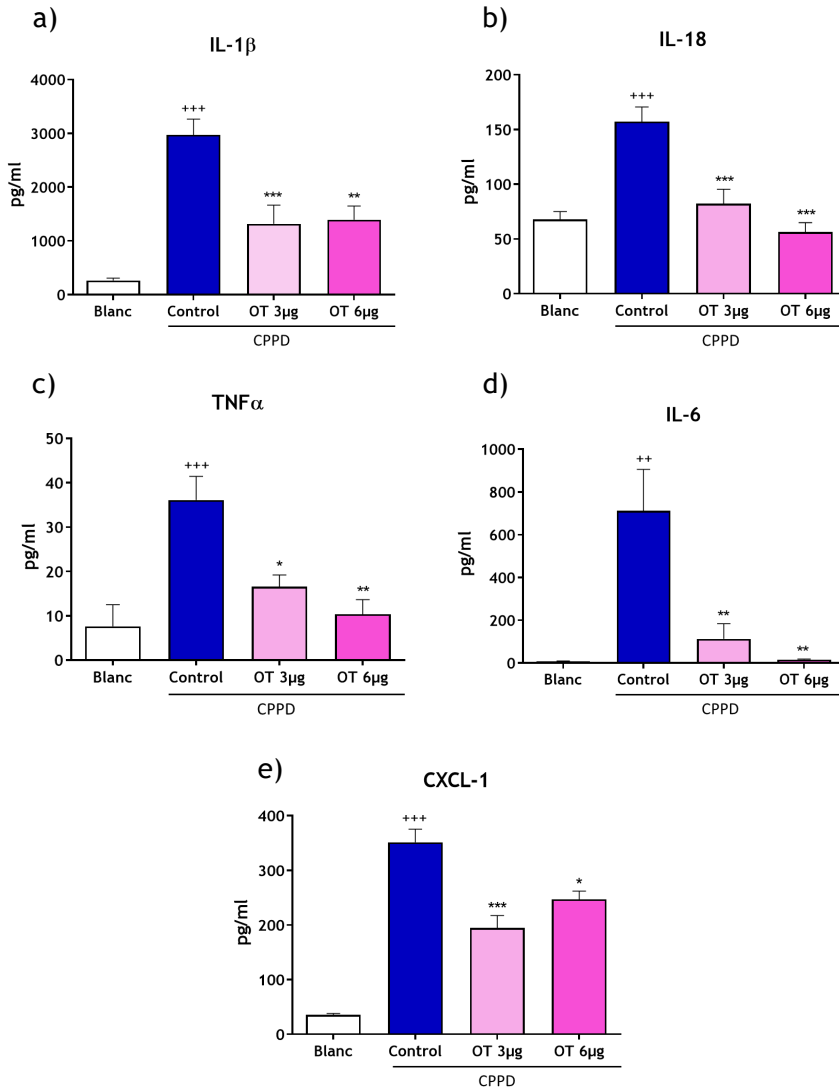


Figura 60: Efecte de l'OT sobre l'alliberament de citocines proinflamàtòries en el sobrenadant de l'exsudat de la bossa d'aire. a) IL-1β. b) IL-18. c) TNFα. d) IL-6. e) CXCL-1. Els resultats són expressats amb les seues mitjanes ± SEM (n = 6 - 8). + $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,001$ respecte al Control (ANOVA d'una via seguida del test de Tukey)**

Per a la mateixa dosi també s'aprecia una marcada disminució de la concentració de TNF α i IL-6, arribant a valors d'inhibició del 90 % i 100% respectivament.

En aquesta figura 60 també es pot observar com els nivells de la quimiocina CXCL-1 es redueixen significativament en els grups tractats amb l'osteostatina, de manera similar als resultat obtinguts en la determinació de la migració cel·lular.

2.2.1.3. Activació de caspasa-1

La reducció dels nivells de les citocines IL-1 β i IL-18 en l'exsudat de la bossa d'aire dels grups de ratolins tractats amb OT fa interessant la determinació de l'activació de la caspasa-1 en aquest model. Així, hem realitzat l'estudi per Western Blot de la subunitat activa p20 de caspasa-1 en el sobrenedant de l'exsudat en relació a la procaspasa-1 (p48) determinada en el *pellet* cel·lular.

En la figura 61a podem observar com el tractament amb OT redueix el senyal de la subunitat p20 determinada en el sobrenedant en comparació al grup de ratolins Control. L'anàlisi densitomètric i el càlcul de la relació p20/p48 demostra que aquesta reducció és estadísticament significativa a les dues dosis d'OT assajades, confirmant per tant l'efecte inhibitor d'aquest pèptid sobre l'activació de la caspasa-1 en aquest model.

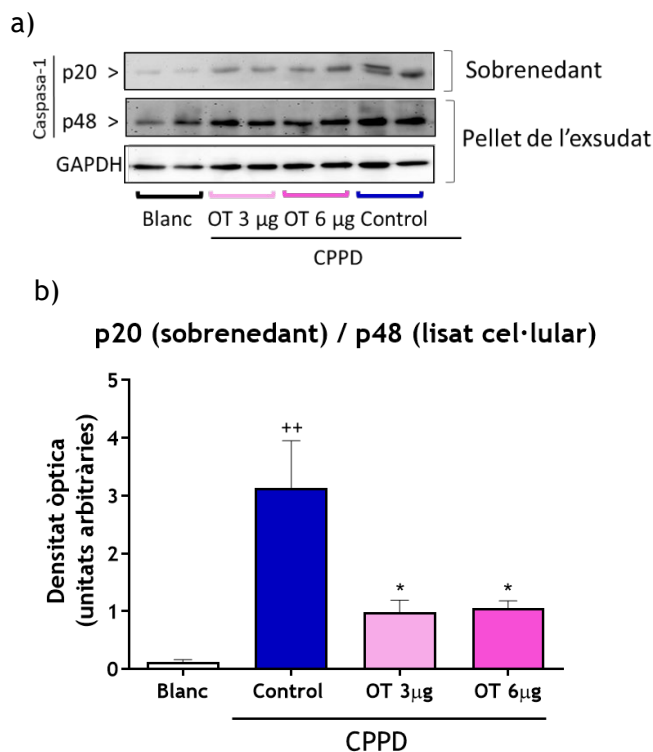


Figura 61: Efecte d'OT sobre l'activació de la caspasa-1 en el model de bossa d'aire. a) Imatge representativa de l'estudi per Western Blot de les subunitats p20 i p48 determinades en el sobrenedant i el pellet de l'exsudat respectivament. GAPDH és el control de càrrega (10 µg de proteïna). b) Anàlisi densitomètric de les imatges obtingudes expressat per la relació subunitat p20/procaspasa-1 (p48). Els resultats són expressats amb les seues mitjanes \pm SEM (n= 4 - 5). ++ $p < 0.01$ respecte el Blanc; * $p < 0,05$ respecte al Control (ANOVA d'una via seguida del test de Tukey)

2.2.1.4. Detecció de p-p65-NF- κ B

Tal com ja s'ha comentat anteriorment, en el model de la bossa d'aire l'administració de CPPD pot donar lloc a l'activació del factor de transcripció NF- κ B (Campillo-Gimenez *et al.*, 2018) participant en el desencadenament de la resposta inflamatòria en aquest model.

L'estudi s'ha realitzat analitzant la subunitat fosforilada activa p-p65-NF- κ B en els lisats del *pellet* cel·lular de l'exsudat de la bossa d'aire.

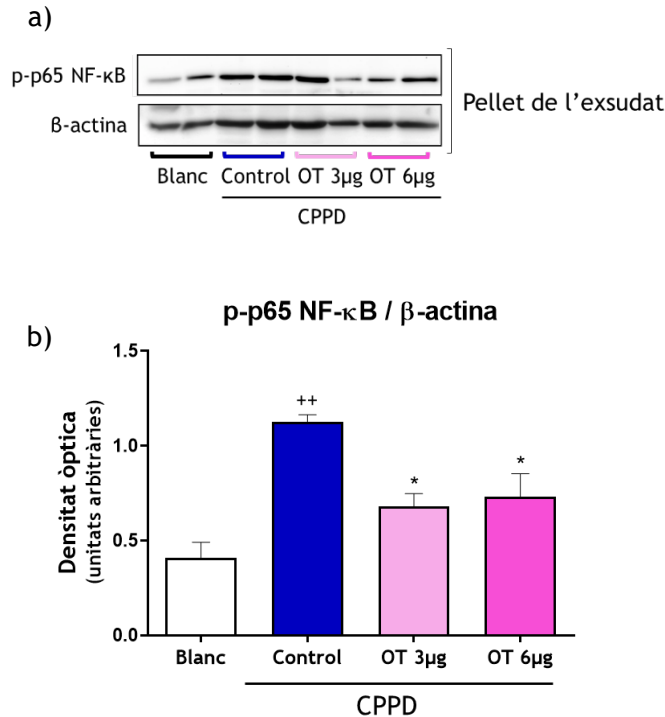


Figura 62: Inhibició de l'activació de l'NF- κ B en la bossa d'aire. a) Imatge representativa de l'estudi per Western Blot de la subunitat p65-NF- κ B en els lisats cel·lulars del *pellet*. b) Anàlisi densitomètric de totes les imatges obtingudes expressat com els valors de la subunitat p-p65 de l'NF- κ B respecte a β -actina. Els resultats són expressats amb les seues mitjanes \pm SEM (n = 4 - 5). ++ $p < 0.01$ respecte el Blanc; * $p < 0,05$ respecte al Control (ANOVA d'una via seguida del test de Tukey)

En la figura 62 es veu com la fosforilació de la subunitat p65 augmenta en el grup Control respecte al Blanc, ja que els cristalls de CPPD han produït l'activació de l'NF- κ B. Aquest senyal es veu reduïda en els ratolins tractats amb les dues dosis d'OT. Al fer la quantificació de

les imatges i analitzar-les respecte a les seues respectives senyals de β -actina, es corrobora la reducció significativa d'aquesta fosforilació, i per tant, l'activació de l'NF- κ B l'administrar OT en el model de la bossa d'aire.

2.2.2. Artritis gotosa en ratolí induïda per cristalls d'MSU

A l'igual que en l'estudi anterior realitzat amb el derivat calcona, el següent model *in vivo* elegit per a l'estudi de l'efecte antiinflamatori de l'osteostatina és el model d'artritis gotosa produïda per la injecció subcutània de cristalls d'MSU (Rasool i Varalakshmi, 2006), ja que la precipitació d'aquests cristalls és una de les característiques més rellevants d'aquesta malaltia (So i Martinon, 2017). Endemés, en aquest model la injecció d'MSU produeix una resposta inflamatòria via activació del complex multiproteic NLRP3 (Dalbeth *et al.*, 2016).

En aquest estudi s'administra via subcutània, al dors de l'animal, l'osteostatina a 80 μ g/kg o 120 μ g/kg dissolta en SF. Als 30 minuts s'injecten els cristalls d'MSU (2 mg/pota en PBS) en l'aponeurosi plantar dreta del ratolí. A les 24 hores es mesura l'edema i, després se sacrifiquen els animals. Finalment, s'obtenen les potes dretes i s'homogeneïtzen per a fer les corresponents determinacions.

2.2.2.1. Estudi tempsdependent de la formació de l'edema

L'edema s'ha avaluat a diferents temps (1, 3, 6 i 24 hores després de la injecció dels cristalls) mitjançant la mesura volumètrica d'ambdues potes posteriors amb un pletismòmetre, i el càlcul de la diferència entre la pota dreta (injectada amb MSU) i l'esquerra (sense MSU) (figura 63).

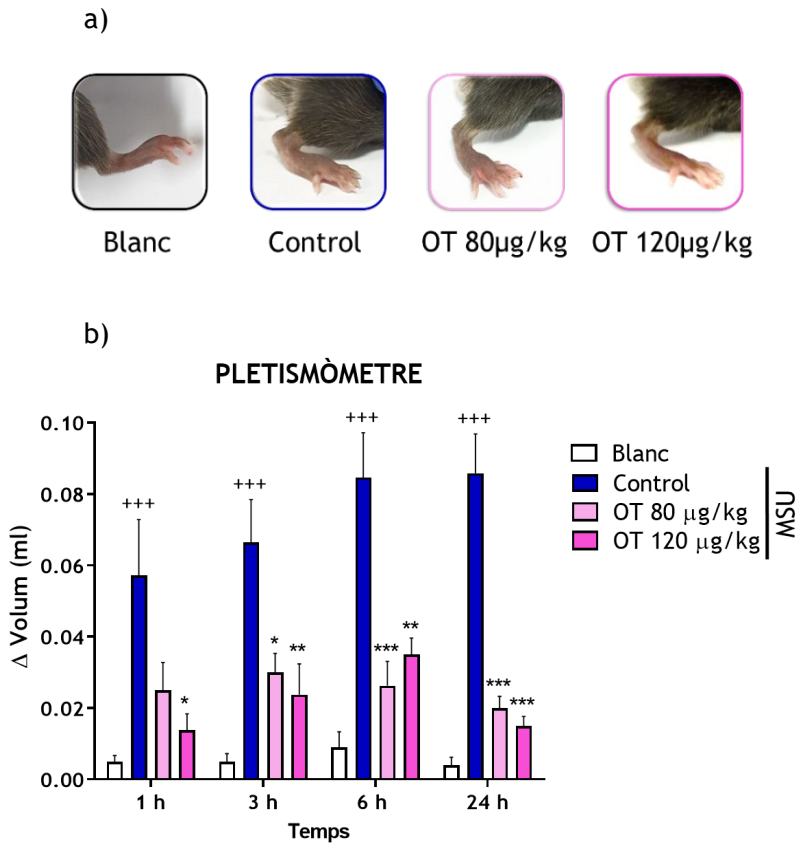


Figura 63: Estudi tempsdependent de l'efecte de l'OT sobre l'edema en el model d'artritis gotosa. a) Imatges representatives de les potes posteriors dretes de cadascun del grup experimental. b) Determinació de l'edema induït pels cristalls d'MSU a diferents temps. Els resultats són expressats amb les seues mitjanes \pm SEM (n= 6 - 8). $+++ p < 0,001$ respecte al grup Blanc de cada temps; $*p < 0,05$, $**p < 0,01$, $***p < 0,001$, respecte al grup Control per a cada temps (ANOVA de dues vies seguida del test de Bonferroni)

En la figura 63 es pot veure com l'increment del volum de les potes dels ratolins del grup Control (injectat amb els cristall d'MSU), augmenta considerablement respecte al grup Blanc, obtenint un màxim d'edema a

partir de les 6 hores. El tractament amb OT a ambdues dosis redueix l'edema a tots els temps determinats.

Per tant, l'administració d'OT tant a la dosi de 80 µg/kg com la de 120 µg/kg redueix l'edema produït pels cristalls d'MSU en la pota del ratolí.

2.2.2.2. Activitat MPO

Com s'ha comentat anteriorment, en la gota els neutròfils són reclutats i aquests intenten fagocitar els cristalls d'urat, els qual poden ser oxidats per l'MPO (Stamp *et al.*, 2014). Per tant, s'avalua l'activitat de l'MPO en els homogeneïtzats de la pota dels ratolins utilitzant un assaig colorimètric.

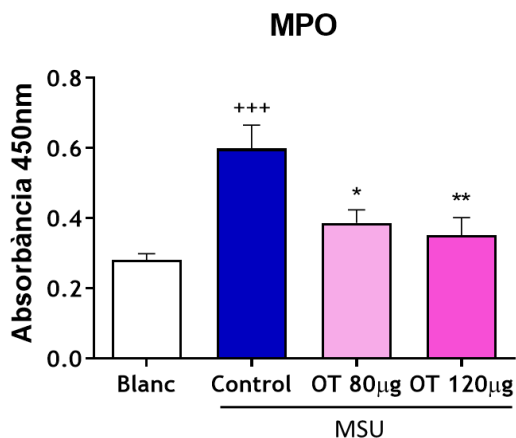


Figura 64: Efecte de l'OT sobre l'activitat MPO en els homogeneïtzats de pota en el model d'artritis gotosa. Els resultats són expressats amb les seues mitjanes \pm SEM (n= 6 - 8). +++ $p < 0,001$ respecte al grup Blanc; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ respecte al grup Control (ANOVA d'una via seguida del test de Tukey)

Els cristalls produeixen un clar augment de l'activitat MPO en els homogeneïtzats del grup Control, en comparació amb els ratolins Blanc

(figura 64). Tanmateix, es veu com el tractament amb OT redueix aquesta activitat a ambdues dosis assajades, confirmant la disminució de la infiltració cel·lular que aquest pèptid ja produïa en el protocol anterior de la bossa d'aire.

2.2.2.3. Determinació de citocines proinflamatòries

S'ha avaluat l'efecte d'OT sobre algunes de les citocines més rellevants alliberades en la pota per l'acció dels cristalls d'MSU, com són IL-1 β , IL-18, TNF α , IL-6 i CXCL-1.

Tal com era d'esperar, la injecció dels cristalls d'MSU indueix l'augment de totes les citocines determinades, en comparació amb els ratolins no estimulats. L'administració subcutània de l'OT produeix una inhibició significativa de totes aquestes citocines (figura 65). Cal destacar la disminució de l'IL-1 β i l'IL-18 (83 % i 100 % d'inhibició respectivament a la dosi de 80 μ g/kg), ambdues relacionades amb l'activació de la caspasa-1. D'altra banda, la reducció significativa dels nivells de la quimiocina CXCL-1 concorda amb la inhibició de l'activitat MPO observada en els resultats anteriors, donant suport a l'efecte inhibitor d'OT sobre la infiltració neutrofílica.

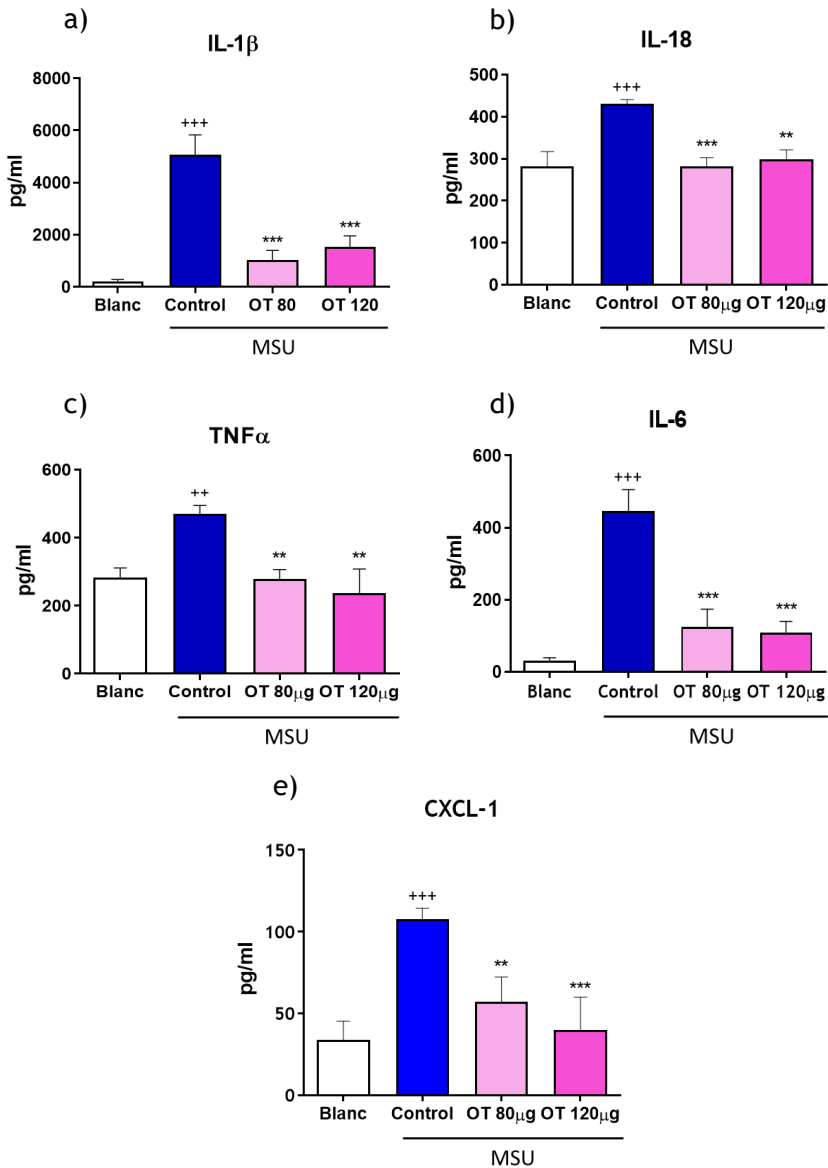


Figura 65: Efecte de l'OT sobre l'alliberament de citocines proinflamàtòries en el model d'artritis gotosa. a) IL-1 β . b) IL-18. c) TNF α . d) IL-6. e) CXCL-1. Els resultats són expressats amb les seues mitjanes \pm SEM (n= 6 - 8) +++ $p < 0,001$ respecte el Blanc; ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ respecte al Control (ANOVA d'una via seguida del test de Tukey)

2.2.2.4. Activació de caspasa-1

S'ha determinat l'activació de la caspasa-1 mitjançant la determinació de la relació entre la subunitat p20 activa i la procaspasa-1 (p48) en l'homogeneïtzat de les potes del ratolins.

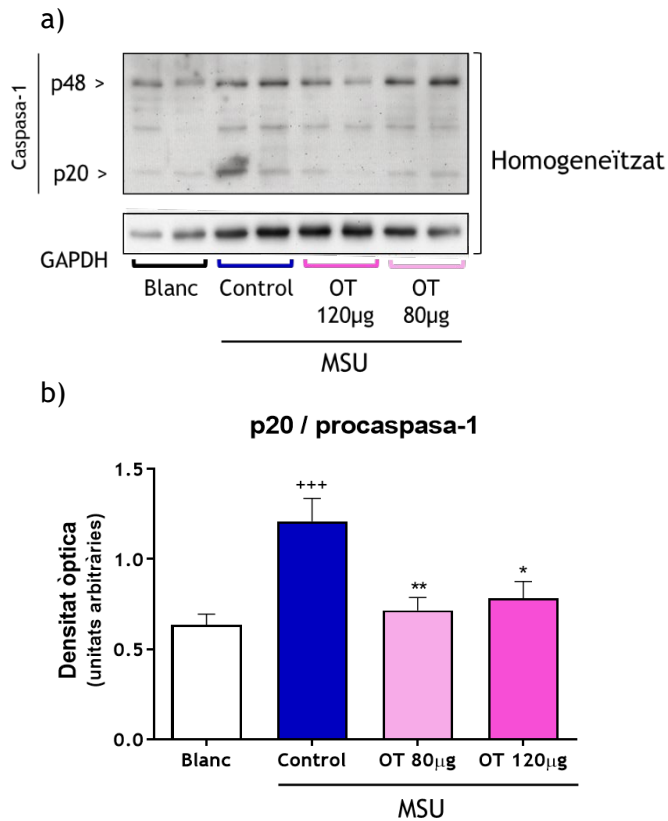


Figura 66: Efecte de l'osteostatina en l'activació de la caspasa-1 en el model d'artritis gotosa per cristalls d'MSU. a) Imatge representativa de l'estudi per Western blot dels homogeneïtzats de pota, on es marca la subunitat p20, la procaspasa p48 i la GAPDH com a control de càrrega. b) Anàlisi densitomètric de totes les imatges obtingudes expressat per la subunitat p20 / procaspasa-1 (p48). b) Els resultats són expressats amb les seues mitjanes \pm SEM (n= 4 - 5). +++ $p < 0.001$ respecte el Blanc; * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$ respecte al Control (ANOVA d'una via seguida del test de Tukey)

En la figura 66 es pot comprovar com els cristalls d'MSU produeixen un augment en el senyal de la subunitat p20 dels ratolins Control respecte als no estimulats. En els animals tractats amb osteostatina s'aprecia una disminució significativa d'aquest senyal, suggerint per tant una disminució de l'activitat caspasa-1 i, per tant, una reducció de la resposta inflamatòria. Aquests valors concorden amb els obtingut en la figura 65a on es veu que OT redueix la producció de la citocina activa IL-1B, així com l'IL-18. Per tant, l'efecte antiinflamatori d'osteostatina en el model d'artritis gotosa estaria en part relacionat amb la inhibició de l'activació de la caspasa-1 produïda pels cristalls d'MSU.

2.2.2.5. Detecció de p-p65-NF- κ B

En la resposta inflamatòria produïda pels cristalls d'MSU en la cavitat articular, a més de les citocines i factors mencionats anteriorment, també s'ha demostrat que el factor de transcripció NF- κ B es veu involucrat (Liu, T. *et al.*, 2017).

En el següent estudi analitzem la subunitat p-p65 de l'NF- κ B mitjançant la tècnica de Western Blot, utilitzant com a proteïna de referència la β -actina.

En la figura 67 es pot observar com la fracció fosforilada p65 de l'NF- κ B està augmentada en el grup Control si ho comparem respecte al grup Blanc, indicant una activació d'aquest factor de transcripció. En el cas dels grups tractats amb l'osteostatina s'aprecia, tant per densitometria com en la pròpia imatge, una disminució de la fosforilació significativa a ambdues dosis assajades.

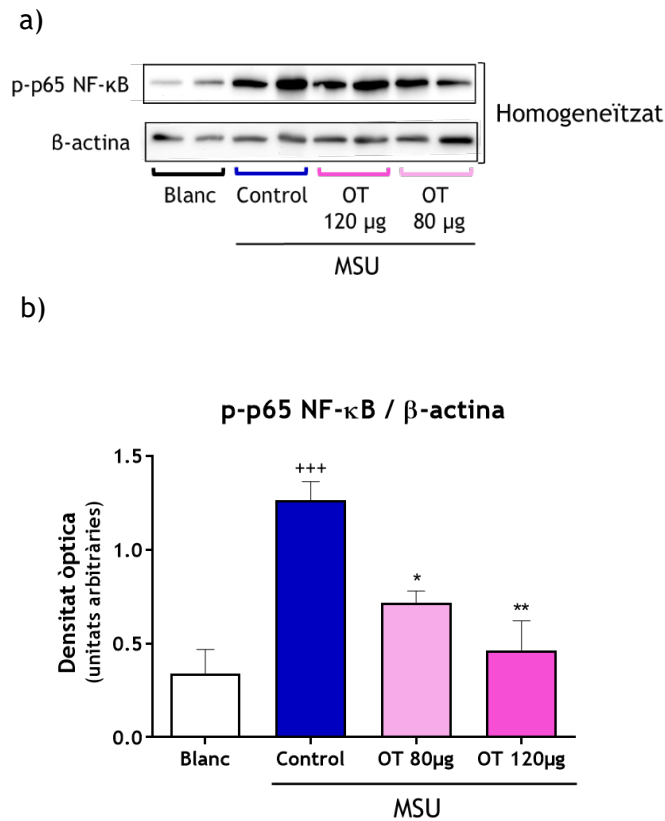


Figura 67: Inhibició de la fosforilació de l'NF-κB per l'osteostatina en el model d'artritis gotosa per MSU. a) Imatge representativa de l'anàlisi per Western Blot de la subunitat p-p65 de l'NF-κB en l'homogeneïtzat de pota. b) Anàlisi densitomètric de totes les imatges obtingudes expressat com els valors de la subunitat p-p65 de l'NF-κB respecte els de la β-actina. Els resultats són expressats amb les seues mitjanes ± SEM (n= 4 - 5). +++ $p < 0.001$ respecte el Blanc; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ respecte al Control (ANOVA d'una via seguida del test de Tukey)

Discussió

A. EFECTE DE LA CALCONA

En la present Tesi Doctoral, s'ha estudiat l'efecte del derivat 2,4,5-trimetoxi-2'-trifluorometilcalcona sobre diversos paràmetres inflamatoris involucrats en el desenvolupament de l'artritis gotosa. Amb aquesta finalitat, s'ha dut a terme una sèrie de protocols *ex vivo* / *in vivo* en ratolins de la soca C57BL/6.

En primer lloc s'ha realitzat l'estudi en macròfags, cèl·lules clau en l'inici de la cascada inflamatòria de l'atac de gota ja que fagociten els cristalls d'MSU, donant lloc a l'activació de la via NLRP3/Caspasa-1 i el consegüent alliberament d'IL-1 β i IL-18 (Dalbeth *et al.*, 2016).

En les nostres condicions experimentals, i amb concordança en la bibliografia científica consultada, els macròfags han estat estimulats amb LPS (com a senyal inicial activadora de receptors TLR4), i ATP (activador del sistema NLRP3/caspasa-1 per unió als receptors purinèrgics P2X7) (Conforti-Andreoni *et al.*, 2011). Els resultats obtinguts demostren que el tractament amb calcona inhibeix l'activació de la caspasa-1, ja que es redueix l'alliberament a l'espai extracel·lular tant de la subunitat activa p20 com de les citocines IL-1 β i IL-18. A més, CH redueix els nivells d'LDH en els sobrenedants cel·lulars, confirmant l'efecte protector d'aquest compost front al fenomen de piroptosi característic de l'activació de caspasa-1. Aquest efecte citoprotector es avalat pels resultats obtinguts a l'estudi de MTT, on el dany cel·lular induït per l'activació amb LPS+ATP es atenuat pel tractament amb CH.

Com s'ha comentat en l'apartat d'introducció, NF- κ B forma part de la senyal inicial o de *priming* per a l'activació transcripcional de l'inflamasoma i de la pro-IL-1 β , que posteriorment donaria lloc a la segon fase d'activació de la caspasa-1 (So i Martinon, 2017). Així mateix, l'IL-

1B alliberada per la caspasa-1 pot contribuir, al seu torn, a l'activació de l'NF- κ B mitjançant l'activació dels seus receptors específics (Winkler i Rösen-Wolff, 2015). Els resultats obtinguts en aquest estudi són preliminars i no permeten establir si l'efecte de CH sobre l'activació de l'NF- κ B es produeix a nivell transcripcional o en fases posteriors de l'activació de l'NLRP3, però sí que justifiquen la inhibició per part de CH de l'alliberament de altres citocines pro-inflamatòries regulades per aquest factor de transcripció, com són la IL-6 i el TNF α (Rothschild *et al.*, 2018; Singh *et al.*, 2014).

Encara que el paper de les ROS i dels mitocondris en l'activació de l'inflamasoma NLRP3 continua sent controvertit, l'ús d'antioxidants bloqueja l'activació de caspasa-1 dependent de l'NLRP3, fet que indica que la senyalització redox o l'estrès oxidatiu estan implicats en aquest procés (So i Martinon, 2017). Diversos autors suggereixen que les ROS participen en la senyal inicial necessària per a la transcripció de l'NLRP3 mediada per l'NF- κ B (Bolívar *et al.*, 2019; Liu, T. *et al.*, 2017). D'altres donen major interès a l'activació de la NOX, o a la pertorbació mitocondrial, ja que la majoria dels estímuls que participen en la fase d'activació de l'inflamasoma augmenten els mtROS (Kelley *et al.*, 2019; Abais *et al.*, 2015).

En el present estudi, el tractament amb CH redueix la producció de ROS estimulada via proteïna cinasa C/NOX i també la generació de mtROS induïda per LPS/ATP, presentant un clar efecte antioxidant que podria estar relacionat amb la inhibició de l'activació de caspasa-1. A més, la reducció de les ROS també podria participar de l'efecte inhibitor de CH sobre l'activació de l'NF- κ B, factor nuclear activat per l'estrès oxidatiu (Forrester *et al.*, 2018).

En relació a l'efecte antioxidant, hem de ressaltar també que el tractament amb CH augmenta la translocació de l'Nrf2 al nucli cel·lular.

En condicions basals, aquest factor de transcripció roman inactiu en el citoplasma cel·lular unit a la proteïna inhibidora Keap1, però quan la cèl·lula es veu exposada a l'estrès oxidatiu, es dissocia i es transloca a l'interior del nucli per a activar la transcripció de gens antioxidants, antiinflamatoris i de supervivència cel·lular (Ferrándiz *et al.*, 2018). A més, Nrf2 pot inhibir la transcripció de citocines inflamatòries independentment de l'estrès oxidatiu (Kobayashi *et al.*, 2016).

Diversos estudis indiquen que l'activació d'Nrf2 té un efecte regulador negatiu en el procés d'activació de l'inflamasoma NLRP3 i en l'alliberament de la forma madura de l'IL-1 β per part de la caspasa-1 mitjançant l'expressió de l'enzim citoprotector NQO1 (Liu, X. *et al.*, 2017). Altres autors demostren que la translocació d'Nrf2 al nucli inhibeix l'expressió de NLRP3 a nivell transcripcional per inhibició de l'activació de l'NF- κ B, suggerint una clara interrelació entre aquestes vies de senyalització (Hennig *et al.*, 2018).

Encara que els mecanismes de correlació entre aquest vies de senyalització continuen essent tema de debat, podem suggerir que l'activació d'Nrf2 per CH participaria de l'efecte antioxidant i potencialment antiinflamatori d'aquest compost. En aquest sentit, estudis anteriors ja demostraren l'efecte antiinflamatori del derivat 3',4',5',3,4,5-hexametoxi-calcona per inhibició de l'NF- κ B i activació de Nrf2 (Alcaraz *et al.*, 2004). Més recentment la calcona isoliquiritigenina també inhibeix l'estrès oxidatiu així com l'activació d'NF- κ B i d'NLRP3 via translocació de l'Nrf2 (Zeng *et al.*, 2017).

Es conegut l'efecte antioxidant de moltes calcones, que generalment s'atribueix a la tinença de grups hidroxil o catecol en les estructures de les molècules (Mubarak *et al.*, 2019; Sahu *et al.*, 2012). No obstant, en el nostre grup d'investigació s'han descrit derivats calcona

tant hidroxilats com metoxilats amb activitat antiinflamatòria i antioxidant (Araico *et al.*, 2006; Rojas *et al.*, 2002; Herencia *et al.*, 1998, 2001). A més, hi ha estudis que avalen també l'efecte antioxidant de les calcones fluorades en l'anell benzoil (Gaonkar i Vignesh, 2017; Singh, *et al.*, 2014; Sahu *et al.*, 2012).

D'altra banda, una característica estructural que solen compartir les calcones que actuen com a inhibidores de la inflamació es el doble enllaç localitzat entre el carboni C- α i C- β (Nowakowska, 2007).

En articles com el d'Herencia *et al.*, (1999) ja es va observar el potencial antiinflamatòri de les calcones trimetoxilades en l'anell estirè, ja que aquests grups podrien conferir-li la capacitat d'inhibir la síntesis d'iNOS i COX-2. Endemés, en altres estudis com el de Rojas *et al.*, (2002), es va verificar que la substitució trifluorometil en l'anell benzoil de diverses trimetoxicalcones, principalment en posició C-2', està associada a una inhibició molt potent de la producció de NO. A més, la influència de la part trimetoxi sobre l'activitat antiinflamatòria, depèn fortament del patró de substitució del fluor / CF₃ en la porció benzoil de l'estructura calcona, com és el cas de la CH estudiada.

Encara que és difícil traure conclusions a aquest respecte, podem dir que l'estructura de la calcona que s'ha utilitzat en el present estudi posseeix un doble enllaç en la posició entre els carbonis C- α i C- β , tres grups metoxi, i un grup trifluorometil. Les característiques estructurals mencionades i alguns estudis amb derivats calcona similars com el de Rojas *et al.*, (2002), poden ajudar a determinar la relació estructura activitat d'aquest tipus de derivats (Figura 68).

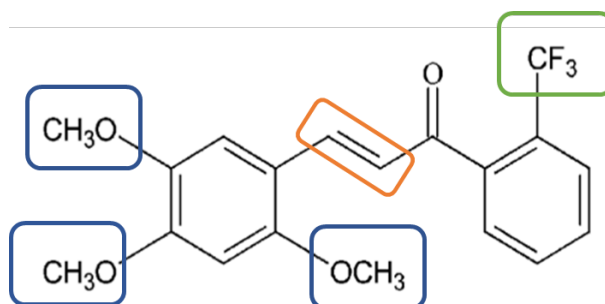


Figura 68: Característiques estructurals relacionades amb l'efecte antiinflamatori de CH

En una segona fase, i per a confirmar els interessants resultats obtinguts amb l'estudi de CH en macròfags, s'ha plantejat el desenvolupament de models animals relacionats amb els processos d'activació de la artritis gotosa. Així, en primer lloc s'ha analitzat l'efecte de CH en el model de MAP estimulat amb cristalls de CPPD, on tant l'activació de l'NF- κ B com de l'inflamasoma NLRP3 participen en el desenvolupament de la reacció inflamatòria i en l'alliberament de les citocines IL-6, TNF α , IL-1 β i IL-18, entre altres (Campillo-Gimenez *et al.*, 2018; Conway i McCarthy, 2018). En aquest model, l'administració de la CH via intra-bossa confirma el seu efecte inhibidor sobre l'activació d'NF- κ B i de caspasa-1 així com de totes les citocines mesurades. Es destaca, que aquest protocol ens ha permet avaluar per primera vegada l'efecte inhibidor de CH sobre la migració neutrofílica així com sobre l'activitat MPO i l'alliberament de CXCL1, principal quimiocina lligada al reclutament neutrofílic que en aquest model està majoritàriament regulada per l'NF- κ B (Campillo-Gimenez *et al.*, 2018; Sawant *et al.*, 2016).

Arribats a aquest punt, i donat que els neutròfils són també cèl·lules efectores clau en la fase aguda de la gota (Chen *et al.*, 2017),

hem decidit abordar un model animal d'artritis gotosa induït per cristalls d'MSU amb la finalitat d'aconseguir unes condicions similars a les característiques de la artritis gotosa humana (Wang, Y. *et al.*, 2019). A més, l'MSU indueix l'activació de l'NLRP3, produint l'activació de caspasa-1 i l'alliberament d'IL-1 β i IL-18, entre altres citocines pro-inflamatòries (Ferrari *et al.*, 2016; Rasool i Varalakshmi, 2006).

Els resultats obtinguts han demostrat que l'administració oral de calcona presenta un clar efecte antiinflamatori, reduint l'edema plantar en els animals així com la l'activitat MPO en els consegüents homogenats, confirmant per tant la inhibició de la migració neutrofílica. A més, s'ha corroborat novament l'efecte inhibitor sobre l'alliberament de citocines i l'activació d'NF- κ B i de caspasa-1. A més a més, estudis recents han posat de manifest l'efecte beneficiós dels derivats *trans*-calcona i hesperidin metil-calcona en el tractament de l'artritis gotosa per inhibició de ROS/NF- κ B/NLRP3 i activació d'Nrf2, la qual cosa indica el potencial interès de les calcones a este nivell (Ruiz-Miyazawa *et al.*, 2018; Staurengo-Ferrari *et al.*, 2018).

En conclusió, els resultats d'aquest estudi demostren el potencial interès de 2,4,5-trimetoxi-2'-trifluorometilcalcona en el tractament de l'artritis gotosa. Aquest compost es capaç d'inhibir diversos paràmetres clarament involucrats en el desenvolupament de la patologia, com són l'estrès oxidatiu, l'activació d'NF- κ B i caspasa-1, i les consegüent citocines proinflamatòries (figura 69). Encara que són necessaris més estudis per a dilucidar exactament el mecanisme d'acció i la correlació entre tots aquests paràmetres, la absència de toxicitat d'aquesta molècula i la seua efectivitat via oral, fan de ella una bona candidata per a aprofundir en la seua reserca amb la finalitat de prevenir i tractar la inflamació aguda en patologies com l'artritis gotosa.

B. EFECTE DE L'OSTEOSTATINA:

Aquest estudi aporta noves dades sobre l'activitat farmacològica de l'OT, un pentapèptid que correspon a la seqüència d'aminoàcids C-terminal (107-111) de PTHrP. Aquesta proteïna pot ser processada per generar diversos fragments bioactius: un fragment N-terminal (1-36), un o diversos fragments de la regió mitjana, que inclou seqüències que són dominis de localització nuclear o nucleolar, i un fragment C-terminal que inclou la seqüència d'OT (Orloff *et al.*, 1994). Els pèptids C-terminal de PTHrP actuen de manera independent de l'receptor PTHR1, que és conegut per intervenir els efectes anabòlics sobre l'os de PTH, PTHrP i els pèptids N-terminal.

Encara no s'ha determinat el mecanisme d'acció d'OT. S'ha suggerit la seua interacció amb un receptor PTHrP específic, que portaria a l'activació de PKC a la membrana cel·lular de diversos tipus de cèl·lules (Cuthbertson *et al.*, 1999) o que podria ser el resultat en la transactivació del receptor 2 del VEGF (*Vascular endothelial growth factor*) en osteoblasts (De Gortázar *et al.*, 2006). L'OT ha demostrat tindre efectes osteogènics i inhibir l'osteoclastogènesi. També inhibeix la senescència dels osteoblasts humans artròsics (Platas *et al.*, 2017). El potencial antiinflamatori de l'OT s'ha posat de manifest en treballs previs en el nostre grup realitzats sobre osteoblasts artròsics (Platas *et al.*, 2017), així com en estudis *in vivo*, en el model d'artritis induïda per col·lagen (Nácher-Juan *et al.*, 2019). En aquest model d'artritis, OT va reduir la producció local de les citocines proinflamatòries IL-1 β , IL-6, IL-17 i TNF α , i per una altra banda, va augmentar l'alliberació de la citocina antiinflamatòria IL-10. A més, va reduir la infiltració cel·lular en la cavitat articular. El perfil antiinflamatori de l'OT s'ha confirmat en el

present estudi, en el model *ex vivo* de macròfags peritoneals de ratolí i en els models d'inflamació induïda per cristalls CPPD i d'artritis gotosa per MSU.

En macròfags peritoneals de ratolí estimulats amb LPS + ATP, l'OT redueix l'alliberament de les citocines IL-1 β , IL-18, TNF α i IL-6, les quals tenen un important paper en nombroses patologies inflamatòries. Aquest efecte, podria estar relacionat amb la reducció de l'activació de NF- κ B que és el principal factor de transcripció implicat en la regulació dels gens proinflamatoris. A més, IL-1 β i IL-18 són citocines que depenen de l'activació de l'inflamasoma i de la caspasa-1 per al seu alliberament en forma activa, i en aquest estudi s'ha demostrat que l'OT inhibeix l'activació de la caspasa-1. D'aquesta manera, els resultats obtinguts suggereixen que aquest mecanisme pot contribuir als efectes inhibidors que posseeix l'OT sobre els nivells de l'IL-1 β i l'IL-18.

Els assajos *in vitro* també indiquen que OT redueix la producció de ROS, principalment a nivell mitocondrial. Aquests resultats confirmarien els efectes inhibidors sobre l'estrès oxidatiu d'aquesta molècula, que al seu torn, es van demostrar en cèl·lules osteoblàstiques (Portal-Núñez *et al.*, 2018). La disminució de la generació de ROS podria conduir a la reducció de l'activitat de l'NF- κ B i de l'activació de la caspasa-1 produïda per l'OT. A més a més, podria participar en els efectes protectors sobre la viabilitat cel·lular que s'han demostrat en aquest estudi. D'altra banda, no s'ha observat que l'activació del factor de transcripció Nrf2 contribuïska de manera significativa als efectes antiinflamatoris d'aquest pèptid.

En la inflamació gotosa, l'alliberament d'IL-1 β produït per l'activació de l'inflamasoma té un paper fonamental. L'activació dels macròfags pels cristalls de MSU indueixen a l'alliberament de l'IL-1 β . Aquesta citocina i els mateixos cristalls activen els diferents tipus

cel·lulars presents a la zona (macròfags, cèl·lules endotelials, fibroblasts, etc.), el que produeix l'alliberament de nombrosos mediadors inflamatoris com quimiocines i citocines. La producció d'IL-8 (en humans) o de CXCL1 (en ratolins) determina la migració de neutròfils a el focus on es troben els cristalls i l'activació d'aquestes cèl·lules, donant lloc a més mediadors inflamatoris que amplifiquen la resposta, produint l'edema i el dolor (Martinon, 2010). Endemés, en la inflamació induïda pels cristalls de CPPD s'ha demostrat l'important paper que desenvolupa l'IL-1 β en la migració de neutròfils a l'àrea afectada (Torres *et al.*, 2009).

En els models *in vivo* utilitzats, CPPD (MAP) i MSU (artritis) han induït la producció de l'IL-1 β en el focus inflamatori, en el qual ha tingut lloc la producció de la quimiocina CXCL-1 que origina una intensa migració neutrofílica. En aquests models, l'OT ha demostrat tenir propietats antiinflamatòries, controlant les fases vascular i cel·lular de la resposta. La inhibició de la migració cel·lular dependria de la reducció en la producció de CXCL-1, que al seu torn es relaciona amb els nivells menors de l'IL-1 β en el focus inflamatori. De manera similar a com s'ha observat en els assajos *in vitro*, la disminució de l'activació de caspasa-1 podria ser responsable del control dels nivells de IL-1 β i IL-18. No obstant això, l'activació de pro-IL-1 β en la resposta inflamatòria pot tenir lloc per altres mecanismes independents de caspasa-1, per exemple, per l'activitat elastasa dels neutròfils (Guma *et al.*, 2009), el que podria ser el causant d'un efecte més acusat de l'OT sobre l'activació de pro-IL-18.

Es sap que la resposta inflamatòria als microcristalls és dependent de NF- κ B. Així, l'activació de NF- κ B per CPPD o MSU determina la producció d'IL-1 β , IL-18, IL-6, TNF α i CXCL-1 (Campillo-Gimenez *et al.*, 2018). Els resultats obtinguts indiquen que l'OT redueix l'activació de NF- κ B induïda per cristalls en els models *in vivo* i com a conseqüència, disminuiria la producció d'aquests mediadors i el desenvolupament del

procés inflamatori. Els resultats obtinguts tant *in vitro*, en macròfags peritoneals de ratolí, com *in vivo*, suggereixen que l'OT podria regular la primera fase de "priming" a l'inhibir l'activació de l'NF- κ B i per tant la transcripció de les citocines proinflamatòries, i la segona fase de formació del complex inflamasma, reduint l'activació de la caspasa-1 en aquestes cèl·lules i l'alliberament de les formes actives IL-1 β i IL-18. No obstant això, es requereixen nous estudis per determinar amb exactitud el mecanisme d'acció implicat en els efectes de l'OT.

Aquest pèptid ha demostrat un interessant perfil antiinflamatori. En un estudi recent s'ha posat de manifest la seva activitat antiartrítica en un model d'artritis reumatoide, en qual va ser capaç de controlar les respostes humoral i cel·lular, actuant en la fase d'inducció i en la fase efectora de l'artritis. Cal destacar que l'OT va protegir significativament de la destrucció articular en el model d'artritis reumatoide (Nácher-Juan *et al.*, 2019). En conjunt, aquest pèptid ha demostrat la seua capacitat de regular la resposta immune innata i adaptativa, evitant les conseqüències de la seua activació excessiva (figura 69).

Els resultats d'aquesta Tesi suggereixen l'interès potencial de l'OT en el desenvolupament de noves estratègies per a la regulació de processos inflamatoris desencadenats per cristalls, com l'artritis gotosa.

En la figurat 69 s'esquematitzen els principals mecanismes implicats en l'efecte antiinflamatori de les dues molècules estudiades en la present Tesi Doctoral.

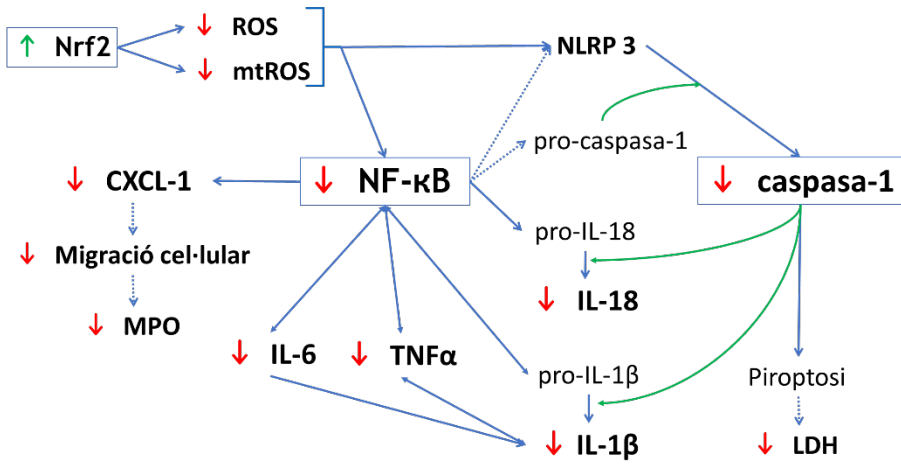


Figura 69: Mecanismes implicats en l'efecte antiinflamatori de la calcona i de l'osteostatina

Conclusions

1. En macròfags peritoneals de ratolí, el derivat 2,4,5-trimetoxi-2'-trifluorometilcalcona i l'osteostatina disminueixen l'estrès oxidatiu i la producció d'IL-6 i TNF α , possiblement en relació al control de l'activació de l'NF- κ B. En aquestes cèl·lules, ambdues molècules redueixen també el fenomen de piroptosi i l'alliberament d'IL-1B i d'IL-18 com a conseqüència de la inhibició de l'activació de caspasa-1.
2. En el model de bossa d'aire induïda pels cristalls de CPPD es confirma aquest efecte inhibitor del derivat calcona i d'osteostatina sobre l'activació d'NF- κ B i caspasa-1. Paral·lelament, s'ha demostrat la inhibició de les citocines anteriorment esmentades, a més de la quimiocina CXCL-1, resultat que es correlaciona amb la reducció de la migració leucocitària evidenciada en aquest model *in vivo*.
3. S'ha posat a punt el model d'artritis gotosa induïda per cristalls d'MSU, on s'ha demostrat l'efecte antiinflamatori de la calcona per via oral i de l'osteostatina per via subcutània. En aquest model, els dos derivats inhibeixen de manera molt significativa l'edema, la migració leucocitària i la producció de citocines proinflamatòries.
4. Els resultats d'aquest estudi *in vitro* i *in vivo* ha posat de manifest la capacitat inhibitora de l'activació de la caspasa-1 i d'NF- κ B com a possibles mecanisme d'acció de la calcona i d'osteostatina, suggerint el seu potencial interès en el tractament de l'artritis gotosa.

Referències

Abais, J. M., Xia, M., Zhang, Y., Boini, K. M., Li, P. L. (2015) Redox Regulation of NLRP3 Inflammasomes: ROS as Trigger or Effector?. *Antioxid Redox Signal*. 22(13):1111-1129.

Abcam (2019) Cytochrome c Profiling ELISA Kit (ab110172). *Abcam*. Disponible en: https://www.abcam.com/cytochrome-c-profiling-elisa-kit-ab110172.html#description_images_1 (Consultat: 1 de desembre de 2019).

Abhishek, A., Roddy, A. E. i Doherty, M. (2017) Gout - a guide for the general and acute physicians. *Clin Med (Lond)*. 17(1):54-63.

Alamy (2019) La Gota, James Gillray 1799. Disponible en: <https://www.alamy.es/foto-la-gota-james-gillray-1799-dibujos-animados-por-el-gran-caricaturista-de-la-agonia-inducida-por-la-enfermedad-inflamatoria-15576514.html?pv=1&stamp=2&imageid=F394D818-BB6B-497E-A8C1-39DA9B381CE5&p=28623&n=0&orientation=0&pn=1&sea> (Consultat: 12 de desembre de 2019).

Alcaraz, M. J., Vicente, A. M., Araico, A., Dominguez, J. N., Terencio, M. C., Ferrándiz, M. L. (2004) Role of nuclear factor- κ B and heme oxygenase-1 in the mechanism of action of an anti-inflammatory chalcone derivative in RAW 264.7 cells. *Br J Pharmacol*. 142(7):1191-1199.

Ander, H. J., Muruve, D. A. (2011) The inflammasomes in kidney disease *J Am Soc Nephrol*. 22(6):1007-18. .

Araico, A., Terencio, M. C., Alcaraz, M. J., Domínguez, J. N., León, C., Ferrándiz, M. L. (2006) Phenylsulphonyl urenyl chalcone derivatives as dual inhibitors of cyclo-oxygenase-2 and 5-lipoxygenase. *Life Sci*. 78(25): 2911-2918.

Ardura, J. A., Portal-Núñez, S., Lozano, D., Gutiérrez-Rojas, I., Sánchez-Salcedo, S., López-Herradón, A., Mulero, F., Villanueva-Peñacarrillo, M. L., Vallet-Regí, M., Esbrit, P. (2016) Local delivery of parathyroid hormone-related protein-derived peptides coated onto a hydroxyapatite-based implant enhances bone regeneration in old and diabetic rats. *J Biomed Mater Res A*. 104(8): 2060-2070.

Astone, G., Alcaraz, M.J., Ferràndiz, M.L. (2015) Characterization of an animal model of inflammation induced by calcium pyrophosphate dihydrate crystals. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 117(2):48-53.

Aune, D., Norat, T., Vatten, L. J. (2014) Body mass index and the risk of gout: a systematic review and dose-response meta-analysis of prospective studies. *Eur J Nutr*. 53(8):1591-1601.

Bauernfeind, F., Horvath, G., Stutz, A., Alnemri, E., Macdonald, K., Speert, D., Fernandes-Alnemri, T., Wu, J., Monks, B. G., Fitzgerald, K., Hornung, V., Latz, E. (2009) NF- κ B activating pattern recognition and cytokine receptors license NLRP3 inflammasome activation by regulating NLRP3 expression. *J Immunol*. 183(2):787-791.

Berman, E. L. (1995) Clues in the eye: Ocular signs of metabolic and nutritional disorders. *Geriatrics*. 50(7):34-44.

Bolívar, B. E., Vogel, T. P., Bouchier-Hayes, L. (2019) Inflammatory caspase regulation: maintaining balance between inflammation and cell death in health and disease. *FEBS J*. 286(14):2628-2644.

Borenfreund, E., Babich, H., Martin-Alguacil, N. (1988). Comparisons of two in vitro cytotoxicity assays-The neutral red (NR) and tetrazolium MTT test. *Toxicol In Vitro*. 2(1):1-6.

Burns, C. M., Wortmann, R. L. (2011). Gout therapeutics: New drugs for an old disease". *Lancet*. 377(9760):165-177.

Campillo-Gimenez, L., Renaudin, F., Jalabert, M., Gras, P., Gosset, M., Rey. C., Sarda S., Collet C., Cohen-Solal, M., Combes, C., Lioté F., Ea, H.K. (2018). Inflammatory potential of four different phases of calcium pyrophosphate relies on NF- κ B activation and MAPK pathways. *Front Immunol*. 9:2248.

Canning, P., Sorrell, F. J., Bullock, A. N. (2015). Structural basis of Keap1 interactions with Nrf2. *Free Radic Biol Med*. 88(Pt B):101-107.

Caracuel, M. Á. (2019) Reseña histórica sobre la gota. *Topdoctors, España*. Disponible en: <https://www.topdoctors.es/articulos-medicos/una-resena-historica-sobre-la-gota> (Consultat: 11 desembre 2019).

Catalán, L., Ferrándiz, M. L., Terencio, M. C., Alcaraz, M. J. (2016) Modelo ex vivo para el estudio de la actividad caspasa-1 en macrófagos peritoneales de ratón. *X International Workshop on Sensors and Molecular Recognition. IDM, València*. P-49:96.

Chen, J., Wu, M., Yang, J., Wang, J., Qiao, Y., Li, X. (2017) The Immunological Basis in the Pathogenesis of Gout. *Iran J Immunol*. 14(2):90-98.

Chen, Y., Meng, J., Bi, F., Li, H., Chang, C., Ji, C., Liu, W. (2019) NEK7 Regulates NLRP3 Inflammasome Activation and Neuroinflammation Post-traumatic Brain Injury. *Front Mol Neurosci*. 12:247.

Conforti-Andreoni, C., Ricciardi-Castagnoli, P., Mortellaro, A. (2011) The inflammasomes in health and disease: from genetics to molecular

mechanisms of autoinflammation and beyond. *Cell Mol Immunol.* 8:135-145.

Conway, R., Mccarthy, G. M. (2018) Calcium-Containing Crystals and Osteoarthritis: an Unhealthy Alliance. *Curr Rheumatol Rep.* 20(3):13.

Cuthbertson, R. M., Kemp, B. E., Barden, J. A. (1999) Structure study of osteostatin PTHrP [Thr107](107 -139). *Biochim Biophys Acta.* 1432(1):64-72.

Dalbeth, N., Merriman, T. R., Stamp, L. K. (2016) Gout. *Lancet.* 388(10055):2039-2052.

Dawson, J. Sedgwick, A. D., Edwards, J. C., Lees P. (1991) A comparative study of the cellular, exudative and histological responses to carrageenan, dextran and zymosan in the mouse. *Int J Tissue React.* 13(4):171-85.

de Castro, L. F., Lozano, D., Portal-Núñez, S., Maycas, M., de la Fuente, M., Caeiro, J. R., Esbrit, P. (2012) Comparison of the skeletal effects induced by daily administration of PTHrP (1-36) and PTHrP (107-139) to ovariectomized mice. *J Cell Physiol.* 227(4):1752-1760.

de Gortázar, A. R., Alonso, V., Alvarez-Arroyo, M. V., Esbrit. P. (2006) Transient exposure to PTHrP (107-139) exerts anabolic effects through vascular endothelial growth factor receptor 2 in human osteoblastic cells in vitro. *Calcif Tissue Int.* 79(5):360-369.

De León, E. J., Alcaraz, M. J., Dominguez, J. N., Charris, J., Terencio, M. C. (2003) 1-(2,3,4-Trimethoxyphenyl)-3-(3-(2-chloroquinolinyl))-2-propen-1-one, a chalcone derivative with analgesic, anti-inflammatory and immunomodulatory properties. *Inflamm Res.* 52(6):246-257.

De Young, L. M., Kheifets, J. B., Ballaron, S. J., Young, J. M. (1989) Edema and cell infiltration in the phorbol ester-treated mouse ear are temporally separate and can be differentially modulated by pharmacologic agents. *Agents Actions*. 26(3-4):335-341.

Desai, J., Steiger, S., Anders, H. J. (2017) Molecular Pathophysiology of Gout. *Trends Mol Med*. 23(8):756-768.

Devlin, T. M. (2000) Bioquímica. 3ª Edición. Editorial Reverté, Barcelona. Disponible en: <http://lupithaaa.blogspot.es/1285093463/gota/> (Consultat: 19 novembre 2019).

Dinareello, C. A. Novick, D., Kim S., Kaplanski, G. (2013) Interleukin-18 and IL-18 binding protein. *Front Immunol*. 4:1-10.

Dinesh, P., Rasool, M. K. (2017) Berberine, an isoquinoline alkaloid suppresses TXNIP mediated NLRP3 inflammasome activation in MSU crystal stimulated RAW 264.7 macrophages through the upregulation of Nrf2 transcription factor and alleviates MSU crystal induced inflammation in rats. *Int Immunopharmacol*. 44:26-37.

Dinkova-Kostova, A. T., Abramov, A. Y. (2015) The emerging role of Nrf2 in mitochondrial function. *Free Radic Biol Med*. 88(Pt B):179-188.

Edwards, J. C. W., Sedgwick, A. D., Willoughby, D. A. (1981) The formation of a structure with the features of synovial lining by subcutaneous injection of air: an in vivo tissue culture system. *J Pathol*. 134(2):147-56.

Esbrit, P., Alcaraz, M. J. (2013) Current perspectives on parathyroid hormone (PTH) and PTH-related protein (PTHrP) as bone anabolic therapies. *Biochem Pharmacol*. 85(10):1417-1423.

Fenando, A., Widrich, J. (2019) Gout (Podagra). *StatPearls*. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31536213> (Actualitzat: 18 de novembre de 2019; Consultat: 9 de novembre de 2019).

Ferrándiz, M. L., Nacher-Juan, J., Alcaraz, M. J. (2018) Nrf2 as a therapeutic target for rheumatic diseases. *Biochem Pharmacol.* 152:338-346.

Ferrari, F. C., Lemos Lima, R. C., Schimith Ferraz Filha, Z., Barros C.H., de Paula Michel Araújo, M.C., Antunes Saúde-Guimarães D. (2016) Effects of *Pimenta pseudocaryophyllus* extracts on gout: Anti-inflammatory activity and anti-hyperuricemic effect through xantine oxidase and uricosuric action. *J Ethnopharmacol.* 180:37-42.

Forrester, S. J., Kikuchi D. S., Hernandez, M. S., Xu, Q, Griendling, K. K. (2018) Reactive Oxygen Species in Metabolic and Inflammatory Signaling. *Circ Res.* 122(6):877-902.

Franchi, L., Eigenbrod, T., Muñoz-Planillo, R., Nuñez G. (2009) The Inflammasome: A Caspase-1 Activation Platform Regulating Immune Responses and Disease Pathogenesis. *Nat Immunol.* 10(3):241-7.

Gaonkar, S. L., Vignesh, U. N. (2017) Synthesis and pharmacological properties of chalcones: a review. *Res Chem Intermed.* 43(11):6043-6077.

García-Martín, A., Acitores, A., Maycas, M., Villanueva-Peñacarrillo, M. L., Esbrit P. (2013) Src kinases mediate VEGFR2 transactivation by the osteostatin domain of PTHrP to modulate osteoblastic function. *J Cell Biochem.* 114(6):1404-1413.

Garrote Corral, S., Zegarra Mondragón, S., Guillen Astete, C., Bachiller Corral, F. J. (2017) Artritis microcristal·lines. *Medicine.* 12(27):1574-1585.

GenScript (2019) Western Blot Antibody Troubleshooting. Disponible en: <https://www.genscript.com/Western-Blot-Antibody-Troubleshooting.html> (Consultat: 18 novembre 2019).

Ghaemi-Oskouie, F., Shi, Y. (2011) The Role of Uric Acid as an Endogenous Danger Signal in Immunity and Inflammation. *Curr Rheumatol Rep.* 13(2):160-166.

Guma, M., Ronacher, L., Liu-Bryan, R., Takai, S., Karin, M., Corr, M. (2009) Caspase1-independent activation of interleukin-1beta in neutrophil-predominant inflammation. *Arthritis Rheum.* 60(12):3642-3650.

Hari, A., Zhang, Y., Tu, Z., Detampel, P., Stenner, M., Ganguly, A., Shi, Y., (2014) Activation of NLRP3 inflammasome by crystalline structures via cell surface contact. *Sci Rep.* 4:7281.

Heldt, H., Piechulla, B. (2011) Phenylpropanoids comprise a multitude of plant secondary metabolites and cell wall components. *Plant Biochem.* 431-449.

Hennig, P., Garstkiewicz, M., Grossi, S., Di Filippo, M., French, L. E., Beer, H. D. (2018) The crosstalk between Nrf2 and inflammasomes. *Int J Mol Sci.* 19(2):E562.

Herencia, F., Ferrándiz, M. L., Ubeda, A., Domínguez, J. N., Charris, J. E., Lobo, G. M., Alcaraz, M. J. (1998) Synthesis and anti-inflammatory activity of chalcone derivatives. *Bioorg Med Chem Lett.* 8(10):1169-1174.

Herencia, F., Ferrándiz, M. L., Ubeda, A., Domínguez, J. N., Charris, J. E., Lobo, G. M., Alcaraz, M. J. (1999) Novel anti-inflammatory chalcone derivatives inhibit the induction of nitric oxide synthase and

cyclooxygenase-2 in mouse peritoneal macrophages. *FEBS Lett.* 453(1-2):129-134.

Herencia, F., Ferrándiz, M. L., Ubeda, A., Guillén, I., Domínguez, J. N., Charris, J. E., Lobo, G. M., Alcaraz, M. J. (2001) 4-Dimethylamino-3',4'-dimethoxychalcone downregulates iNOS expression and exerts anti-inflammatory effects. *Free Radic Biol Med.* 30(1):43-50.

Jiang, Y., Lin, Y., Hu, Y. J., Song, X. J., Pan, H. H., Zhang, H. J. (2017) Caffeoylquinic acid derivatives rich extract from *Gnaphalium pensylvanicum* willd. Ameliorates hyperuricemia and acute gouty arthritis in animal model. *BMC Complement Altern Med.* 17(1):320.

Jiao, H., Soejima, Y., Ohe, Y., Saijo, N. (1992) A new MTT assay for examining the cytotoxicity of activated macrophages towards the non-adherent P388 leukaemia cell line. *J Immunol Methods.* 153(1-2):265-266.

Jin, H. M., Kim, T. J., Choi, J. H., Kim, M. J., Cho, Y. N., Nam, K. I., Kee, S. J., Moon, J. B., Choi, S. Y., Park, D. J., Lee, S. S., Park, Y. W. (2014) MicroRNA-155 as a proinflammatory regulator via SHIP-1 down-regulation in acute gouty arthritis. *Arthritis Res Ther.* 16(2):R88.

Jordan, K. M., Cameron, J. S., Snaith, M., Zhang, W., Doherty, M., Seckl, J., Hingorani, A., Jaques, R., Nuki, G. (2007) British Society for Rheumatology and British Health Professionals in Rheumatology guideline for the management of gout. *Rheumatology (Oxford).* 46(8):1372-1374.

Kawai, T., Akira, S. (2007) Signaling to NF- κ B by Toll-like receptors. *Trends Mol Med.* 13(11):460-469.

Kazazian, N. H. (2014) NLRP3 inflammasome activation by crystal structures. *BioSciences master reviews.* ENS-Lyon, France. Disponible en:

<http://biologie.ens-lyon.fr/ressources/bibliographies/m1-13-14-biosci-reviews-hanna-kazazian-n-1c-m.xml#N103FD>. (Consultat: 1 de setembre 2019)

Kelley, N., Jeltema, D., Duan, Y., He, Y. (2019) The NLRP3 Inflammasome: An Overview of Mechanisms of Activation and Regulation. *Int J Mol Sci.* 20:13.

Khanna, D., FitzGerald, J. D., Bae, S., Singh, M. K., Neogi, T., Pillinger, M. H., Merrill, J., Lee, S., Prakash, S., Kaldas, M., Gogia, M., Perez-Ruiz, F., Taylor, W., Lioté, F., Choi, H., Singh, J. A., Dalbeth, N., Kaplan, S., Niyyar, V., Jones, D., Yarows, S. A., Roessler, B., Kerr, G., King, C., Levy, G., Furst, D. E., Edwards, N. L., Mandell, B., Schumacher, H. R., Robbins, M., Wenger, N., Terkeltaub, R. (2012a) 2012 American College of Rheumatology Guidelines for Management of Gout Part I: Systematic Non-pharmacologic and Pharmacologic Therapeutic Approaches to Hyperuricemia. *Arthritis Care Res (Hoboken)*. 64(10):1431-1446.

Khanna, D., Khanna, P. P., Fitzgerald, J. D., Singh, M. K., Bae, S., Neogi, T., Pillinger, M.H., Merrill, J., Lee, S., Prakash, S., Kaldas, M., Gogia, M., Perez-Ruiz, F., Taylor, W., Lioté, F., Choi, H., Singh, J. A., Dalbeth, N., Kaplan, S., Niyyar, V., Jones, D., Yarows, S. A., Roessler, B., Kerr, G., King, C., Levy, G., Furst, D.E., Edwards, N.L., Mandell, B., Schumacher, H. R., Robbins, M., Wenger, N., Terkeltaub, R. (2012b) 2012 American College of Rheumatology Guidelines for Management of Gout Part II: Therapy and Anti-inflammatory Prophylaxis of Acute Gouty Arthritis. *Arthritis Care Res (Hoboken)*. 64(10):1447-1461.

Kim, J. J., Jo, E.K. (2013) NLRP3 Inflammasome and Host Protection against Bacterial Infection. *J Korean Med Sci.* 28(10):1415-1423.

Kobayashi, E. H., Suzuki, T., Funayama, R., Nagashima, T., Hayashi, M., Sekine, H., Tanaka, N., Moriguchi, T., Motohashi, H., Nakayama, K., Yamamoto, M. (2016) Nrf2 suppresses macrophage inflammatory response by blocking proinflammatory cytokine transcription. *Nat Commun.* 23: 11624.

Kontogiorgis, C., Mantzanidou, M., Hadjipavlou-Litina, D. (2008) Chalcones and their Potential Role in Inflammation. *Mini Rev Med Chem.* 8(12):1224-1242.

Kumagai, Y., Watanabe, W., Kobayashi, A., Sato, K., Onuma, S., Sakamoto, H. (2001) Inhibitory effect of low density lipoprotein on the inflammation-inducing activity of calcium pyrophosphate dihydrate crystals. *J Rheumatol.* 28(12):2674-2680.

Kuo, C. F., Grainge, M. J., Zhang, W., Doherty, M. (2015) Global epidemiology of gout: Prevalence, incidence and risk factors. *Nat Rev Rheumatol.* 11(11):649-662.

Leder, B. Z., O'Dea, L. S., Zanchetta, J. R., Kumar, P., Banks, K., McKay, K., Lyttle, C. R., Hattersley, G. (2015) Effects of abaloparatide, a human parathyroid hormone-related peptide analog, on bone mineral density in postmenopausal women with osteoporosis. *J Clin Endocrinol Metab.* 100(2):697-706.

Lee, H. E., Yang, G., Kim, N. D., Jeong, S., Jung, Y., Choi, J. Y., Park, H. H., Lee, J. Y. (2016) Targeting ASC in NLRP3 inflammasome by caffeic acid phenethyl ester: A novel strategy to treat acute gout. *Sci Rep.* 6:38622.

Lee, S. J., Nam, K. I., Jin, H. M., Cho, Y. N., Lee, S. E., Kim, T. J., Lee, S. S., Kee, S. J., Lee, K. B., Kim, N., Park, Y. W. (2011) Bone destruction

by receptor activator of nuclear factor κ B ligand-expressing T cells in chronic gouty arthritis. *Arthritis Res Ther.* 13(5):R164.

Lee, Y. M., Shon, E. J., Kim, O. S., Kim, D. S. (2017) Effects of Mollugo pentaphylla extract on monosodium urate crystal-induced gouty arthritis in mice. *BMC Complement Altern Med.* 17(1):447.

Lemos Lima, R. C., Ferrari, F. C., de Souza, M. R., Pereira, B. M, Paula, C. A., Saúde-guimarães, D. A. (2015). Effects of extracts of leaves from Sparattosperma leucanthum on hyperuricemia and gouty arthritis. *J Ethnopharmacol.* 161:194-199.

Li, L., Wang, D., Wang, X., Bai, R., Wang, C., Gao, Y., Anastassiades, T. (2019) N-Butyrylated hyaluronic acid ameliorates gout and hyperuricemia in animal models. *Pharm Biol.* 57(1):717-728.

Lin, Y., Liu, P. G., Liang, W. Q., Hu, Y. J., Xu, P., Zhou, J., Pu, J. B., Zhang, H. J. (2018) Luteolin-4'-O-glucoside and its aglycone, two major flavones of Gnaphalium affine D. Don, resist hyperuricemia and acute gouty arthritis activity in animal models. *Phytomedicine.* 41:54-61.

Liu, L., Xue, Y., Zhu, Y., Xuan, D., Yang, X., Liang, M., Wang, J., Zhu, X., Zhang, J., Zou, H. (2016) Interleukin 37 limits monosodium urate crystal-induced innate immune responses in human and murine models of gout. *Arthritis Res Ther.* 18(1):268.

Liu, T., Zhang, L., Joo D., Sun, S. C. (2017) NF- κ B signaling in inflammation. *Signal Transduct Target Ther.* 2:17023.

Liu, X., Zhang, X., Ding, Y., Zhou, W., Tao, L., Lu, P., Wang, Y., Hu, R. (2017) Nuclear Factor E2-Related Factor-2 Negatively Regulates NLRP3

Inflammasome Activity by Inhibiting Reactive Oxygen Species-Induced NLRP3 Priming. *Antioxid Redox Signal*. 26(1):28-43.

Luo, C. Y., Wang, L., Sun, C., Li, D. J. (2011) Estrogen enhances the functions of CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ regulatory T cells that suppress osteoclast differentiation and bone resorption in vitro. *Cell Mol Immunol*. 8:50-58.

Mahapatra, D. K., Bharti, S. K., Asati, V. (2017) Chalcone Derivatives: Anti-inflammatory Potential and Molecular Targets Perspectives. *Curr Top Med Chem*. 17(28):3146-3169.

Mankan, A. K., Kubarenko, A., Hornung, V. (2012) Immunology in clinic review series; focus on autoinflammatory diseases: Inflammasomes: Mechanisms of activation. *Clin Exp Immunol*. 167(3):369-381.

Marangella, M. (2005) Uric Acid Elimination in the Urine. Pathophysiological Implications. Ronco C, Rodeghiero F (ed): Hyperuricemic Syndromes: Pathophysiology and Therapy. *Contrib Nephrol*. Basel, Karger. 147:132-148.

Marchetti, C., Swartzwelter, B., Koenders, M. I., Azam, T., Tengesdal, I. W., Powers, N., de Graaf D. M., Dinarello, C. A., Joosten, L. A. B. (2018) NLRP3 inflammasome inhibitor OLT1177 suppresses joint inflammation in murine models of acute arthritis. *Arthritis Res Ther*. 20(1):169.

Marcotti, A., Miralles, A., Dominguez, E., Pascual, E., Gomis, A., Belmonte, C., de la Peña, E. (2018) Joint nociceptor nerve activity and pain in an animal model of acute gout and its modulation by intra-articular hyaluronan. *Pain*. 159(4):739-748.

Martin, T. J. (2016) Parathyroid hormone-related protein, its regulation of cartilage and bone development, and role in treating bone diseases. *Physiol Rev.* 96(3):831-871.

Martin, W. J., Harper, J. L. (2009) Innate inflammation and resolution in acute gout. *Immunol Cell Biol.* 88(1):15-19.

Martinon, F. (2010) Update on biology: Uric acid and the activation of immune and inflammatory cells. *Curr Rheumatol Rep.* 12(2):135-141.

Martinon, F., Pétrilli, V., Mayor, A., Tardivel, A., Tschopp, J. (2006) Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome. *Nature.* 440(7081):237-241.

Mayo Clinic (2019) Gout. *Mayo Foundation for Medical Education and Research.* Disponible en: www.mayoclinic.org/diseases-conditions/gout/symptoms-causes/syc-20372897 (Actualitzada: 1 de març de 2019; consultat: 29 de setembre de 2019).

Merriman, T. R., Choi, H. K., Dalbeth, N. (2014) The genetic basis of gout. *Rheum Dis Clin North Am.* 40(2):279-90.

Mubarak, S., Zia-Ur-Rehman, M., Jamil, N., Zaheer, M., Nadeem Arshad, M., Mohammad Asiri, A. (2019) Environment Friendly Synthesis of N'-(1,3-Diphenylallylidene)-1-ethyl-7-methyl-4-oxo-1,4-dihydro-1,8-naphthyridine-3-carbohydrazides: Crystal Structure and Their Anti-oxidant Potential. *Chem Pharm Bull (Tokyo).* 67(11):1190-1200.

Nácher-Juan, J., Terencio, M. C., Alcaraz M. J., Ferrándiz M. L. (2019) Osteostatin Inhibits Collagen-Induced Arthritis by Regulation of Immune Activation, Pro-Inflammatory Cytokines, and Osteoclastogenesis. *Int J Mol Sci.* 20(16):3845.

Neogi, T. (2016) Gout. *Ann Intern Med.* 165(1):ITC1-ITC16.

Nowakowska, Z. (2007) A review of anti-infective and anti-inflammatory chalcones. *Eur J Med Chem.* 42(2):125-137.

Orloff, J. J., Reddy, D., de Papp, A. E., Yang, K. H., Soifer, N. E., Stewart, A. F. (1994) Parathyroid hormone-related protein as a prohormone: Posttranslational processing and receptor interactions. *Endocr Rev.* 15(1):40-60.

Park, H. S., Jung, H. Y., Park, E. Y., Kim, J., Lee, W. J., Bae, Y. S. (2004) Cutting Edge: Direct Interaction of TLR4 with NAD(P)H Oxidase 4 Isozyme Is Essential for Lipopolysaccharide-Induced Production of Reactive Oxygen Species and Activation of NF- κ B. *J Immunol.* 173(6):3589-3593.

Pelegrin, P., Barroso-Gutierrez, C., Surprenant, A. (2008) P2X 7 Receptor Differentially Couples to Distinct Release Pathways for IL-1 β in Mouse Macrophage. *J Immunol.* 180(11):7147-7157.

Platas, J., Guillén, M. I., Gomar, F., Castejón, M. A., Esbrit, P., Alcaraz M. J. (2017) Anti-senescence and anti-inflammatory effects of the C-terminal moiety of PTHrP peptides in OA osteoblasts. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 72(5):624-631.

Portal-Núñez, S., Ardura, J. A., Lozano, D., Martínez de Toda, I., De la Fuente, M., Herrero-Beaumont, G., Largo, R., Esbrit, P. (2018) Parathyroid hormone-related protein exhibits antioxidant features in osteoblastic cells through its N-terminal and osteostatin domains. *Bone Joint Res.* 7(1):58-68.

Punzi, L., Scanu, A., Spinella, P., Galozzi, P., Oliviero, F. (2019) One year in review 2018: Gout. *Clin Exp Rheumatol.* 37(1):1-11.

Ramachandran, R. A., Lupfer, C., Zaki, H. (2018) The Inflammasome: Regulation of Nitric Oxide and Antimicrobial Host Defence. *Adv Microb Physiol.* 72:65-115.

Rasool, M., Varalakshmi, P. (2006) Suppressive effect of *Withania somnifera* root powder on experimental gouty arthritis: An in vivo and in vitro study. *Chem Biol.* 164(3):174-180.

Rayamajhi, M., Zhang, Y., Miao, E. (2014) Detection of pyroptosis by measuring released lactate dehydrogenase activity. *Methods Mol Biol.* 1040(7):85-90.

Richette, P., Doherty, M., Pascual, E., Barskova, V., Becce, F., Castañeda-Sanabria, J., Coyfish, M., Guillo, S., Jansen, T. L., Janssens, H., Lioté, F., Mallen, C., Nuki, G., Perez-Ruiz, F., Pimentao, J., Punzi, L., Pywell, T., So, A., Tausche, A. K., Uhlig, T., Zavada, J., Zhang, W., Tubach, F., Bardin, T. (2017) 2016 updated EULAR evidence-based recommendations for the management of gout. *Ann Rheum Dis.* 76(1):29-42.

Roddy, E., Choi, H. K. (2014) Epidemiology of gout. *Rheum Dis Clin North Am.* 40(2):155-175.

Rojas, J., Payá, M., Devesa, I., Dominguez, J. N., Ferrándiz, M. L. (2003) Therapeutic administration of 3,4,5-trimethoxy-4'-fluorochalcone, a selective inhibitor of iNOS expression, attenuates the development of adjuvant-induced arthritis in rats. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* 368(3):225-233.

Rojas, J., Payá, M., Dominguez, J. N., Ferrándiz L. M. (2002) The synthesis and effect of fluorinated chalcone derivatives on nitric oxide production. *Bioorg Med Chem Lett.* 12(15):1951-1954.

Rothschild, D. E., McDaniel, D. K., Ringel-Scaia, V. M., Allen, I. C. (2018) Modulating inflammation through the negative regulation of NF- κ B signaling. *J Leukoc Biol.* 103(6):131-1150.

Royal Society of Chemistry (2015) ChemSpider, Search and share chemistry. Osteostatin. Disponible en: <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.3816829.html?rid=eb3465cd-3959-4ce9-b595-74e4afd0d363> (Actualizat 17 d'agost de 2015; consultat: 08 de novembre de 2019).

Ruiz-Miyazawa, K. W., Staurengo-Ferrari, L., Pinho-Ribeiro, F. A., Fattori, V., Zaninelli, T. H., Badaro-Garcia, S., Borghi, S. M., Andrade, K. C., Clemente-Napimoga, J. T., Alves-Filho, J. C., Cunha, T. M., Fraceto, L. F., Cunha, F. Q., Napimoga, M. H., Casagrande, R., Verri, W. A. Jr. (2018) 15d-PGJ 2-loaded nanocapsules ameliorate experimental gout arthritis by reducing pain and inflammation in a PPAR-gamma-sensitive manner in mice. *Sci Rep.* 8(1):13979.

Sabina, E. P., Chandel, S., Rasool, M. K. (2008) Inhibition of monosodium urate crystal-induced inflammation by withaferin A. *J Pharm Pharm Sci.* 11(4):46-55.

Sahu, N. K., Balbhadra, S. S., Choudhary, J., Kohli, D. V. (2012) Exploring Pharmacological Significance of Chalcone Scaffold: A Review. *Curr Med Chem.* 19(2):209-225.

Sawant, K. V., Poluri, K. M., Dutta, A. K., Sepuru, K. M., Troshkina, A., Garofalo, R. P., Rajarathnam, K. (2016) Chemokine CXCL1 mediated neutrophil recruitment: Role of glycosaminoglycan interactions. *Sci Rep.* 6:33123.

Schettler, A., Thorn, H., Jockusch, B. M., Tschesche, H. (1991) Release of proteinases from stimulated polymorphonuclear leukocytes: Evidence

for subclasses of the main granule types and their association with cytoskeletal components. *Eur J Biochem.* 197(1):197-202.

Schlesinger, N. (2010) Diagnosing and treating gout: A review to aid primary care physicians. *Postgrad Med.* 122(2):157-161.

Shah, D., Mohan, G., Flueckiger P., Corrigan, F., Conn, D. (2015) Polyarticular gout flare masquerading as sepsis. *Am J Med.* 128(7):e11-e12.

Shen, H. H., Yang, Y. X., Meng, X., Luo, X. Y., Li, X. M., Shuai, Z. W., Ye, D. Q., Pan, H. F. (2018) NLRP3: A promising therapeutic target for autoimmune diseases. *Autoimmun Rev.* 17(7):694-702.

Singh, N., Parashar, P., Tripathi, C. B., Kanoujia, J., Kaithwas, G., Saraf S. A. (2017) Oral delivery of allopurinol niosomes in treatment of gout in animal model. *J Liposome Res.* 27(2):130-138.

Singh, P., Anand, A., Kumar, V. (2014) Recent developments in biological activities of chalcones: A mini review. *Eur J Med Chem.* 85:758-777.

Sivera, F., Andrés, M., Quilis, N. (2017) Diagnóstico y tratamiento de la gota. *Med Clin (Barc).* 148(6):271-276.

So, A. K., Martinon, F. (2017) Inflammation in gout: mechanisms and therapeutic targets. *Nat Rev Rheumatol.* 13:639-647.

So, A., Thorens, B. (2010) Uric acid transport and disease. *J Clin Invest.* 120(6):1791-1799.

de Souza, M. R., de Paula, C. A., Pereira de Resende, M. L., Grabe-Guimarães, A., de Souza Filho, J. D., Saúde-Guimarães, D. A. (2012) Pharmacological basis for use of *Lychnophora trichocarpha* in gouty

arthritis : Anti-hyperuricemic and anti-inflammatory effects of its extract , fraction and constituents. *J Ethnopharmacol.* 142(3):845-850.

Stamp, L. K., Turner, R., Khalilova, I. S., Zhang, M., Drake, J., Forbes, L. V., Kettle, A. J. (2014) Myeloperoxidase and oxidation of uric acid in gout: implications for the clinical consequences of hyperuricaemia. *Rheumatology (Oxford).* 53(11):1958-1965.

Staurengo-Ferrari, L., Ruiz-Miyazawa, K. W., Pinho-Ribeiro, F. A., Fattori, V., Zaninelli, T. H., Badaro-Garcia, S., Borghi, S. M., Carvalho, T. T., Alves-Filho, J. C., Cunha, T. M., Cunha, F. Q., Casagrande, R., Verri, W. A. Jr. (2018) Trans-chalcone attenuates pain and inflammation in experimental acute gout arthritis in mice. *Front Pharmacol.* 9:1123.

Terkeltaub, R. (2017) What makes gouty inflammation so variable? *BMC Med.* 15(1):158.

Tin, A., Marten J., [...], Köttgen, A. (2019) Target genes, variants, tissues and transcriptional pathways influencing human serum urate levels. *Nat Genet.* 51(10):1459-1474.

Torres, M. A., Jones, J. D. G., Dangl, J. L. (2006) Reactive Oxygen Species Signaling in Response to Pathogens. *Plant Physiol.* 141(2):373-378.

Torres, R., Macdonald, L., Croll, S. D., Reinhardt, J., Dore, A., Stevens, S., Hylton, D. M., Rudge, J. S., Liu-Bryan, R., Terkeltaub, R. A., Yancopoulos, G. D., Murphy, A. J. (2009) Hyperalgesia, synovitis and multiple biomarkers of inflammation are suppressed by interleukin 1 inhibition in a novel animal model of gouty arthritis. *Ann Rheum Dis.* 68(10):1602-1608.

- Tur, M. A., Belozertseva, I. V. (2018) Effect of Spontaneous Partial Sensory Deprivation on the Behavior of Male C57BL/6N Mice. *Neurosci Behav Physiol.* 48(5):557-563.
- van de Loosdrecht, A. A., Nennie, E., Ossenkoppele, G. J., Beelen, R. H., Langenhuijsen, M. M. (1991) Cell mediated cytotoxicity against U 937 cells by human monocytes and macrophages in a modified colorimetric MTT assay. A methodological study. *J Immunol Methods.* 141(1):15-22.
- Wang, J., Chen, G., Lu, L., Zou, H. (2019) Sirt1 inhibits gouty arthritis via activating PPAR γ . *Clin Rheumatol.* 38(11):3235-3242.
- Wang, M., Tian, T., Yu, S., He, N., Ma, D. (2013) Th17 and Treg Cells in Bone Related Diseases. *Clin Dev Immunol.* 2013:203705.
- Wang, Y., Lin, Z., Zhang, B., Jiang, Z., Guo, F., Yang, T. (2019) Cichorium intybus L. Extract Suppresses Experimental Gout by Inhibiting the NF- κ B and NLRP3 Signaling Pathways. *Int J Mol Sci.* 20(19):4921.
- Watanabe, W., Baker, D. G., Schumacher, H. R. (1992) Comparison of the acute inflammation induced by calcium pyrophosphate dihydrate, apatite and mixed crystals in the rat air pouch model of a synovial space. *J Rheumatol.* 19(9):1453-7.
- Winkler, S., Rösen-Wolff, A. (2015) Caspase-1: An integral regulator of innate immunity. *Semin Immunopathol.* 37(4):419-427.
- Wojtala, A., Bonora, M., Malinska, D., Pinton, P., Duszynski, J., Wieckowski, M. R. (2014) Methods to monitor ROS production by fluorescence microscopy and fluorometry. *Methods Enzymol.* 542:243-262.

Yang, G., Yeon, S. H., Lee, H. E., Kang, H. C., Cho, Y. Y., Lee, H. S., Lee, J. Y. (2018) Suppression of NLRP3 inflammasome by oral treatment with sulforaphane alleviates acute gouty inflammation. *Rheumatology (Oxford)*. 57(4):727-736.

Yao, Z., Painter, S. L., Fanslow, W. C., Ulrich, D., Macduff, B. M., Spriggs, M. K., Armitage, R. J. (1995) Human IL-17: a novel cytokine derived from T cells. *J Immunol*. 155(12):5483-5486.

Yu, Y., Yang, J., Fu, S., Xue, Y., Liang, M., Xuan, D., Zhu, X., Wan, W., Lv, L., Zou, H. (2019) Leptin Promotes Monosodium Urate Crystal-Induced Inflammation in Human and Murine Models of Gout. *J Immunol*. 202(9):2728-2736.

Zeng J., Chen, Y., Ding, R., Feng, L., Fu, Z., Yang, S., Deng, X., Xie, Z., Zheng, S. (2017) Isoliquiritigenin alleviates early brain injury after experimental intracerebral hemorrhage via suppressing ROS- and/or NF- κ B-mediated NLRP3 inflammasome activation by promoting Nrf2 antioxidant pathway. *J Neuroinflammation*. 14(1):119.

Annexos

1. LLISTA DE FIGURES:

Introducció:

Figura 1: La gota per James Gillray	3
Figura 2: Vies de l'homeòstasi de l'urat.....	6
Figura 3: Gota aguda.....	8
Figura 4: Microscòpia de líquid sinovial i tècniques d'observació	10
Figura 5: Tractament farmacològic de la gota.....	14
Figura 6: Arbre de decisions en un atac agut de gota segons les recomanacions de l'EULAR.....	15
Figura 7: Gestió de la hiperuricèmia en pacients amb gota segons les recomanacions de l'EULAR.....	20
Figura 8: Resposta immunitària innata en l'artritis gotosa.....	26
Figura 9: Inflamació en la gota aguda i principals dianes terapèutiques	28
Figura 10: Model simplificat de l'estructura i activació de l'inflamasoma NLRP3.....	31
Figura 11: Canvi conformacional, oligomerització i activació de l'inflamasoma NLRP3	32
Figura 12: Efectes de l'activació de la caspasa-1	36
Figura 13: Senyalització NLRP3-caspasa-1 pels cristalls d'MSU	39
Figura 14: Estrès oxidatiu en gota	44
Figura 15: Vies d'activació de l'inflamasoma NLRP3	46
Figura 16: La calcona com precursor de diversos flavonoides.....	51
Figura 17: Estructura química de 2,4,5-trimetoxi-2'-trifluorometilcalcona (CH).....	53
Figura 18: Dominis funcionals de la PTHrP	54
Figura 19: Estructura molecular de l'osteostatina [PTHrP (107-111)] ..	56

Material i mètodes:

Figura 20: Ratolí de la soca C57BL/6.....	66
Figura 21: Placa de 6 pouets	69
Figura 22: Esquema d'extracció, cultiu i activació dels macròfags peritoneals	70
Figura 23: Reducció de l'MTT a formazan	71
Figura 24: Reacció catalitzada per l'LDH.....	73
Figura 25: Esquema ELISA.....	74
Figura 26: Procés Western Blot	77
Figura 27: Cristalls CPPD en l'exsudat extret de la bossa d'aire.	86
Figura 28: Fotografia d'un ratolí C57BL/6	87
Figura 29: Esquema del protocol seguit per al desenvolupament de la bossa d'aire	88
Figura 30: Fotografia de la injecció subcutània dels cristalls d'MSU ...	91
Figura 31: Esquema del model <i>in vivo</i> d'artritis gotosa.....	93

Resultats:

Figura 32: Efecte de CH sobre la citotoxicitat cel·lular en macròfags peritoneals estimulats amb LPS i ATP.....	98
Figura 33: Efecte de CH sobre l'alliberament de citocines proinflamatòries en macròfags peritoneals estimulats amb LPS i ATP .	99
Figura 34: : Inhibició de l'activació de la caspasa-1 en macròfags peritoneals estimulats amb LPS i ATP.....	101
Figura 35: Efecte de CH sobre l'alliberament d'LDH en macròfags peritoneals estimulats amb LPS i ATP.....	102
Figura 36: Efecte de la CH sobre la fosforilació de la subunitat p65 d'NF- κ B en macròfags peritoneals estimulats per LPS i ATP.....	103
Figura 37: Efecte de la CH sobre l'estrès oxidatiu en macròfags peritoneals estimulats amb TPA	106

Figura 38: Efecte de la CH en la producció de ROS mitocondrials en macròfags peritoneals estimulats amb LPS i ATP.....	107
Figura 39: Efecte de la CH en la translocació de l'Nrf2 al nucli cel·lular de macròfags peritoneals estimulats amb LPS i ATP.....	109
Figura 40: Efecte de la CH sobre la migració cel·lular en la bossa d'aire	113
Figura 41: Efecte de la CH sobre l'activitat MPO en sobrenedant de l'exsudat de la bossa d'aire.....	114
Figura 42: Efecte de la CH sobre l'alliberament de citocines proinflamatòries en el sobrenedant de l'exsudat de la bossa d'aire...	115
Figura 43: Efecte de CH sobre l'activació de la caspasa-1 en el model de bossa d'aire.....	117
Figura 44: Efecte de inhibició de l'activació de l'NF- κ B en la bossa d'aire	119
Figura 45: Estudi tempsdependent de l'efecte de CH sobre l'edema en el model d'artritis gotosa	121
Figura 46: Efecte de la CH sobre l'activitat MPO en els homogeneïtzats de les potes en el model d'artritis gotosa.....	122
Figura 47: Efecte de la CH sobre l'alliberament de citocines proinflamatòries en el model d'artritis gotosa	124
Figura 48: Efecte de CH sobre l'activació de la caspasa-1 en el model d'artritis gotosa.....	126
Figura 49: Efecte de CH sobre la fosforilació de la subunitat p-p65 d'NF- κ B en el model d'artritis gotosa	127
Figura 50: Efecte de l'OT sobre la viabilitat cel·lular de macròfags peritoneals estimulats amb LPS i ATP.....	130
Figura 51: Efecte de l'OT sobre l'alliberament de citocines proinflamatòries en macròfags peritoneals estimulats amb LPS i ATP.	131
Figura 52: Inhibició de l'activació de caspasa-1 per l'osteostatina en macròfags peritoneals estimulats amb LPS i ATP.....	133

Figura 53: Efecte d'OT sobre l'alliberament d'LDH en macròfags peritoneals estimulats amb LPS i ATP.....	134
Figura 54: Efecte de l'OT sobre la fosforilació de la subunitat p-p65 d'NF- κ B en macròfags peritoneals estimulats per LPS i ATP.....	135
Figura 55: Efecte de l'OT sobre l'estrès oxidatiu en macròfags peritoneals estimulats amb TPA.....	137
Figura 56: Efecte de la OT en la producció de ROS mitocondrials en macròfags peritoneals estimulats amb LPS i ATP	138
Figura 57: Efecte de l'OT en la translocació de l'Nrf2 al nucli cel·lular de macròfags peritoneals estimulats amb LPS i ATP	140
Figura 58: Efecte de l'OT sobre la migració cel·lular en la bossa d'aire.	142
Figura 59: Efecte de l'OT sobre l'activitat MPO en l'exsudat de la bossa d'aire.....	143
Figura 60: Efecte de l'OT sobre l'alliberament de citocines proinflamatòries en el sobrenedant de l'exsudat de la bossa d'aire ..	144
Figura 61: Efecte d'OT sobre l'activació de la caspasa-1 en el model de bossa d'aire	146
Figura 62: Inhibició de l'activació de l'NF- κ B en la bossa d'aire.....	147
Figura 63: Estudi tempsdependent de l'efecte de l'OT sobre l'edema en el model d'artritis gotosa	149
Figura 64: Efecte de l'OT sobre l'activitat MPO en els homogeneïtzats de pota en el model d'artritis gotosa.....	150
Figura 65: Efecte de l'OT sobre l'alliberament de citocines proinflamatòries en el model d'artritis gotosa	152
Figura 66: Efecte de l'osteostatina en l'activació de la caspasa-1 en el model d'artritis gotosa per cristalls d'MSU	153
Figura 67: Inhibició de la fosforilació de l'NF- κ B per l'osteostatina en el model d'artritis gotosa per MSU	155

Discussió:

Figura 68: Característiques estructurals relacionades amb l'efecte antiinflamatori de CH.....163

Figura 69: Mecanismes implicats en l'efecte antiinflamatori de la calcona i de l'osteostatina.....169

2. LLISTA DE TAULES:

Material i mètodes:

Taula 1: ELISA comercials emprats en la present Tesi Doctoral 76

Taula 2: Solucions, tampons i gels emprats per al Western Blot 80

Taula 3: Anticossos primaris utilitzats per al Western Blot..... 82

3. AUTORITACIONS DEL PROCEDIMENTS



GENERALITAT
VALENCIANA

CONSELLERIA DE AGRICULTURA, MEDIU AMBIENT,
CANVIU CLIMÀTIC I DESARROLLO RURAL

DIRECCIÓ GENERAL DE AGRICULTURA,
GANADERIA I PESCA



Unión Europea

AUTORIZACION PROCEDIMIENTO 2017/VSC/PEA/00150

Vista la solicitud realizada en fecha 14/07/17 con nº reg. entrada 31435 por D/D^a. **Pilar Campins Falcó**, Vicerrectora de Investigación y Política Científica, centro usuario **ES460780001001**, para realizar el procedimiento:

"Mecanismo antiinflamatorio de las chalconas en macrofagos peritoneales"

Teniendo en cuenta la documentación aportada, según se indica en el artículo 33, punto 5 y 6, y puesto que dicho procedimiento se halla sujeto a autorización en virtud de lo dispuesto en el artículo 31 del Real Decreto 53/2013, de 1 de febrero,

Vista la propuesta del jefe del servicio de Producción y Sanidad Animal.

AUTORIZO:

la realización de dicho procedimiento al que se le asigna el código: **2017/VSC/PEA/00150** tipo **2**, de acuerdo con las características descritas en la propia documentación para el número de animales, especie y periodo de tiempo solicitado. Todo ello sin menoscabo de las autorizaciones pertinentes, por otras Administraciones y entidades, y llevándose a cabo en las siguientes condiciones:

Usuario: **Universitat de Valencia**

Responsable del proyecto: **María Luisa Ferrándiz Manglano**

Establecimiento: **Sección de Producción Animal SCIE-Campus Burjassot**

Necesidad de evaluación retrospectiva:

Condiciones específicas:

Observaciones:

Valencia a, fecha de la firma electrónica

El director general de Agricultura, Ganadería y Pesca



Signat per Rogelio Llanes Ribas el
21/09/2017 11:13:59
Càrrec: Direcció General

CSV:4TD92RGP-GPZAVLXV-5K19X2S8 URL de validació:<https://www.transita.gva.es/csv-font/index.faces?cadena=4TD92RGP-GPZAVLXV-5K19X2S8>



GENERALITAT
VALENCIANA

CONSELLERIA DE AGRICULTURA, MEDIO AMBIENTE,
CAMBIO CLIMÁTICO Y DESARROLLO RURAL

DIRECCIÓN GENERAL DE AGRICULTURA,
GANADERÍA Y PESCA



Unión Europea

AUTORIZACION PROCEDIMIENTO 2017/VSC/PEA/00151

Vista la solicitud realizada en fecha 14/07/17 con nº reg. entrada 31437 por D/D^a. **Pilar Campins Falcó**, Vicerrectora de Investigación y Política Científica, centro usuario **ES460780001001**, para realizar el procedimiento:

"Efecto NaHS en MAP en ratones C57BL/6 inducido por CPPD"

Teniendo en cuenta la documentación aportada, según se indica en el artículo 33, punto 5 y 6, y puesto que dicho procedimiento se halla sujeto a autorización en virtud de lo dispuesto en el artículo 31 del Real Decreto 53/2013, de 1 de febrero,

Vista la propuesta del jefe del servicio de Producción y Sanidad Animal.

AUTORIZO:

la realización de dicho procedimiento al que se le asigna el código: **2017/VSC/PEA/00151** tipo 2, de acuerdo con las características descritas en la propia documentación para el número de animales, especie y periodo de tiempo solicitado. Todo ello sin menoscabo de las autorizaciones pertinentes, por otras Administraciones y entidades, y llevándose a cabo en las siguientes condiciones:

Usuario: **Universitat de Valencia**

Responsable del proyecto: **Maria Luisa Ferrándiz Manglano**

Establecimiento: **Sección de Producción Animal SCIE-Campus Burjassot**

Necesidad de evaluación retrospectiva:

Condiciones específicas:

Observaciones:

Valencia a, fecha de la firma electrónica

El director general de Agricultura, Ganadería y Pesca



GENERALITAT
VALENCIANA
Signat per Rogelio Llanes Ribas el
21/09/2017 11:13:59
Carrec: Dirección General

CSV:570FNIGP-GP4JX7N-3TYV77BE URL de validació: <https://www.tramita.gva.es/csv-front/index.faces?cadena=570FNIGP-GP4JX7N-3TYV77BE>



**Direcció General de Agricultura,
Ganaderia y Pesca**

Ciutat Administrativa 9 d'Octubre
Calle de La Democracia, 77 - Edif. B3 P2
46018 Valencia

AUTORIZACION PROCEDIMIENTO 2019/VSC/PEA/0137

Vista la solicitud realizada en fecha **22/05/19** con nº reg. entrada **361468** por D/D^a. **Carlos Hermenegildo Caudevilla, Vicerrector de Investigación y Política Científica**, centro usuario **ES460780001001**, para realizar el procedimiento:

"Efecto antiinflamatorio de las Chalconas en el modelo de artritis gotosa producido por MSU."

Teniendo en cuenta la documentación aportada, según se indica en el artículo 33, punto 5 y 6, y puesto que dicho procedimiento se halla sujeto a autorización en virtud de lo dispuesto en el artículo 31 del Real Decreto 53/2013, de 1 de febrero,

Vista la propuesta del jefe del servicio de Producción y Sanidad Animal.

AUTORIZO:

la realización de dicho procedimiento al que se le asigna el código: **2019/VSC/PEA/0137** tipo **2**, de acuerdo con las características descritas en la propia documentación para el número de animales, especie y período de tiempo solicitado. Todo ello sin menoscabo de las autorizaciones pertinentes, por otras Administraciones y entidades, y llevándose a cabo en las siguientes condiciones:

Usuario: **Universitat de Valencia**

Responsable del proyecto: **M.ª Luisa Ferrándiz Manglano**

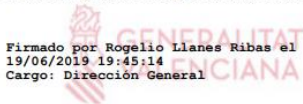
Establecimiento: **Sección de Producción Animal SCIE-Campus Burjassot**

Necesidad de evaluación retrospectiva:

Condiciones específicas:

Observaciones:

Valencia a, fecha de la firma electrónica
El director general de Agricultura, Ganadería y Pesca


Firmado por Rogelio Llanes Ribas el
19/06/2019 19:45:14
Cargo: Dirección General



AUTORIZACION PROCEDIMIENTO 2019/VSC/PEA/0138

Vista la solicitud realizada en fecha **22/05/19** con nº reg. entrada **361559** por D/D^a. **Carlos Hermenegildo Caudevilla, Vicerrector de Investigación y Política Científica**, centro usuario **ES460780001001**, para realizar el procedimiento:

"Efecto antiinflamatorio de la osteostatin en el modelo de artritis gotosa producido por MSU."

Teniendo en cuenta la documentación aportada, según se indica en el artículo 33, punto 5 y 6, y puesto que dicho procedimiento se halla sujeto a autorización en virtud de lo dispuesto en el artículo 31 del Real Decreto 53/2013, de 1 de febrero,

Vista la propuesta del jefe del servicio de Producción y Sanidad Animal.

AUTORIZO:

la realización de dicho procedimiento al que se le asigna el código: **2019/VSC/PEA/0138** tipo **2**, de acuerdo con las características descritas en la propia documentación para el número de animales, especie y periodo de tiempo solicitado. Todo ello sin menoscabo de las autorizaciones pertinentes, por otras Administraciones y entidades, y llevándose a cabo en las siguientes condiciones:

Usuario: **Universitat de Valencia**

Responsable del proyecto: **M.^a Luisa Ferrándiz Manglano**

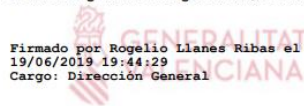
Establecimiento: **Sección de Producción Animal SCIE-Campus Burjassot**

Necesidad de evaluación retrospectiva:

Condiciones específicas:

Observaciones:

Valencia a, fecha de la firma electrónica
El director general de Agricultura, Ganadería y Pesca


Firmado por Rogelio Llanes Ribas el
19/06/2019 19:44:29
Cargo: Dirección General

