

# Identificación de moléculas reguladoras del envejecimiento articular para el tratamiento de la artrosis

MEMORIA PRESENTADA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR INTERNACIONAL

Uxía Nogueira Recalde

---

Tesis doctoral

2019

Directores: Dra. Beatriz Caramés Pérez y Dr. Francisco Javier Blanco García

Tutor/a: Dr. Francisco Javier Blanco García

Programa de doctorado en Ciencias de la Salud



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

La **Dra. Beatriz Caramés Pérez** y el **Dr. Francisco Javier Blanco García**, del Grupo de Investigación de Reumatología del Instituto de Investigación Biomédica de A Coruña (INIBIC),

**CERTIFICAN:**

Que Dña. **Uxía Nogueira Recalde**, Licenciada en Farmacia por la Universidad de Santiago de Compostela, realizó bajo nuestra supervisión el trabajo que lleva por título **“Identificación de moléculas reguladoras del envejecimiento articular para el tratamiento de la artrosis”**. Dicho trabajo reúne las condiciones necesarias de originalidad y rigor científico para ser defendido públicamente y optar al grado de doctor internacional en Ciencias de la Salud.



Fdo. Beatriz Caramés Pérez



Fdo. Francisco J. Blanco García

En A Coruña, 23 de Julio de 2019

A **Dra. Beatriz Caramés Pérez** e o **Dr. Francisco Javier Blanco García**, do Grupo de Investigación de Reumatoloxía do Instituto de Investigación Biomédica de A Coruña (INIBIC),

**CERTIFICAN:**

Que Dna. **Uxía Nogueira Recalde**, Licenciada en Farmacia pola Universidade de Santiago de Compostela, realizou baixo a nosa supervisión o traballo que leva por título “**Identificación de moléculas reguladoras del envejecimiento articular para el tratamiento de la artrosis**”. Dito traballo reúne as condicións necesarias de orixinalidade e rigor científico para ser defendido públicamente e optar ao grado de doutor internacional en Ciencias da Saúde.



Asdo. Beatriz Caramés Pérez



Asdo. Francisco J. Blanco García

En A Coruña, 23 de Xullo de 2019



Durante el desarrollo de la presente Tesis Doctoral se realizó una estancia predoctoral, con la obtención de una beca INDITEX-UDC durante el año académico 2017/2018, en *The Scripps Research Institute* de Jupiter-Florida-EEUU bajo la supervisión del Dr. Paul D. Robbins director del *Center on Aging and Professor of Molecular Medicine*.

## RESUMO

Os fallos nos mecanismos de homeostase relacionados coa idade, como o defecto de autofaxia e a acumulación de células senescentes, contribúen á dexeneración da cartilaxe e á artrose (OA), para a cal no existen fármacos modificadores da enfermidade. O noso obxectivo desta Tesis Doutoral foi identificar compostos reguladores de ambos procesos para o tratamento da OA. Para iso, os condrocitos humanos foron tratados con IL-6, unha citoquina pro-inflamatoria presente no secretoma das células en estado de senescencia, para inducir senescencia e inhibir o fluxo de autofaxia. Para a realización dun cribado de alto rendemento con compostos da quimioteca de reposicionamento Prestwick de medicamentos aprobados, a actividade asociada á senescencia  $\beta$ -Galactosidasa ( $\beta$ -Gal) e o marcador LC3 foron empregados como marcadores de senescencia e de fluxo de autofaxia, respectivamente. Como resultado identificáronse 14 compostos con actividade senoterapéutica e pro-autofáxica, dos cales escolleuse para a súa confirmación o Fenofibrato (FN), un fibrato e agonista PPAR $\alpha$  empregado no tratamento das dislipemias en humanos, para a súa confirmación dada a relevancia do seu mecanismo de acción metabólico. Modelos preclínicos celulares, tisulares e de sangue de pacientes artrósicos e envellecidos foron empregados para testar a eficacia e a relevancia de activar PPAR $\alpha$  para o tratamento da OA. Os resultados mostraron que o FN eliminou selectivamente as células senescentes a través da vía de apoptose, incrementou o fluxo de autofaxia e protexeu fronte a degradación da cartilaxe. Ademais, a expresión de PPAR $\alpha$  redúxse en ratóns envellecidos e artrósicos e en sangue e na cartilaxe procedente de pacientes con OA de rodilla. É importante destacar que nun estudio retrospectivo en pacientes con OA de rodilla procedentes da cohorte americana Osteoarthritis Initiative (OAI), o tratamento con fibratos mellorou significativamente as condicións clínicas. Estes resultados demostran que os fibratos, fármacos aprobados para o tratamento de alteracións no metabolismo lipídico, poderían ter unha inmediata utilidade clínica para o tratamento do envellecemento articular e da OA.

Palabras chave: senescencia, autofaxia, cribado, terapéutica, envellecemento, artrose.

## RESUMEN

Los fallos en los mecanismos de homeostasis relacionados con la edad, como el defecto de autofagia y la acumulación de células senescentes, contribuyen a la degeneración del cartílago y a la artrosis (OA), para la cuál no existen fármacos modificadores de la enfermedad. Nuestro objetivo es esta Tesis Doctoral fue identificar compuestos reguladores de ambos procesos para el tratamiento de la OA. Para ello, los condrocitos humanos fueron tratados con IL-6, una citoquina proinflamatoria presente en el secretoma de las células en estado de senescencia, para inducir senescencia e inhibir el flujo de autofagia. Para la realización de un cribado de alto rendimiento con compuestos de la quimioteca de reposicionamiento Prestwick de medicamentos aprobados, la actividad asociada a senescencia  $\beta$ -Galactosidasa (SA- $\beta$ -Gal) y el marcador LC3 fueron empleados como marcadores de senescencia y de flujo de autofagia, respectivamente. Como resultado se identificaron 14 compuestos con actividad senoterapéutica y pro-autofágica, de los cuales se escogió el Fenofibrato (FN), un fibrato y agonista PPAR $\alpha$  empleado en el tratamiento de las dislipemias en humanos, para su confirmación dada la relevancia de su mecanismo de acción metabólico. Modelos preclínicos celulares, tisulares y de sangre de pacientes artrósicos y envejecidos fueron empleados para testar la eficacia y la relevancia de activar PPAR $\alpha$  para el tratamiento de la OA. Los resultados mostraron que el FN eliminó selectivamente las células senescentes a través de la vía de apoptosis, incrementó el flujo de autofagia y protegió frente a la degradación del cartílago. Además, la expresión de PPAR $\alpha$  se redujo en ratones envejecidos y artrósicos y en sangre y en cartílago procedente de pacientes con OA de rodilla. Es importante destacar que en un estudio retrospectivo en pacientes con OA de rodilla procedentes de la cohorte americana Osteoarthritis Initiative (OAI), el tratamiento con fibratos mejoró significativamente las condiciones clínicas. Estos resultados demuestran que los fibratos, fármacos aprobados para el tratamiento de alteraciones en el metabolismo lipídico, podrían tener una inmediata utilidad clínica para el tratamiento del envejecimiento articular y la OA.

Palabras clave: senescencia, autofagia, cribado, terapéutica, envejecimiento, artrosis.

## ABSTRACT

Ageing-related failure of homeostasis mechanisms, such as defects of autophagy and accumulation of senescent cells, contributes to articular cartilage degeneration and osteoarthritis (OA), for which disease-modifying treatments are not available. Our objective in this Thesis Doctoral was to identify compounds to prevent OA by regulating chondrocyte senescence and autophagy. For that, human chondrocytes were treated with IL-6, a proinflammatory cytokine present in the secretome of senescent cells, to induce senescence and inhibit autophagy flux. For high-throughput screening with compounds from the Prestwick Chemical Library of approved drugs, the activity of senescence associated  $\beta$ -Galactosidase (SA- $\beta$ -gal) and LC3 marker were used as marker of senescence and autophagic flux, respectively. As a result, 14 compounds were identified with senotherapeutic and pro-autophagic activity, of which Fenofibrate (FN), a fibrate and PPAR $\alpha$  agonist used in the treatment of dyslipidemia in humans, was chosen for confirmation given the relevance of its mechanism of metabolic action. Preclinical cellular, tissue and blood from OA and blood from OA and ageing models were used to test the efficacy and relevance of activating PPAR $\alpha$  for the treatment of OA. The results showed that FN selectively eliminated senescent cells via apoptosis, increased autophagic flux and protected against cartilage degradation. Moreover, PPAR $\alpha$  expression was reduced through both ageing and OA in mice and also in blood and cartilage from knees of OA patients. Remarkably, in a retrospective study, in human patients with knee OA from the Osteoarthritis Initiative (OAI) Cohort, fibrate treatment improved OA clinical conditions. These results demonstrate that fibrates, approved drugs targeting lipid metabolism, could have immediate clinically utility for age-related cartilage degeneration and OA treatment.

Keywords: senescence, autophagy, screening, therapeutic, aging, osteoarthritis.

## ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS.....	I
ÍNDICE DE INFORMACIÓN SUPLEMENTARIA.....	III
ÍNDICE DE TABLAS.....	IV
ÍNDICE DE ABREVIATURAS.....	V
INTRODUCCIÓN.....	2
<b>1. LA ARTICULACIÓN.....</b>	<b>2</b>
<b>2. EL CARTÍLAGO ARTICULAR.....</b>	<b>3</b>
2.1. Componentes del cartílago articular.....	4
2.1.1. Los condrocitos.....	4
2.1.2. La matriz extracelular.....	5
2.1.2.1. Organización de la matriz extracelular.....	5
2.1.2.2. Composición de la matriz extracelular.....	6
<b>3. LA DEGRADACIÓN DEL CARTÍLAGO ARTICULAR.....</b>	<b>9</b>
<b>4. LA ARTROSIS.....</b>	<b>10</b>
4.1. Definición de artrosis.....	10
4.2. Factores de riesgo de la artrosis.....	12
4.3. Mecanismos patofisiológicos de la artrosis.....	13
4.4. Tratamiento farmacológico actual y nuevas estrategias terapéuticas.....	16
<b>5. LA SENESCENCIA CELULAR.....</b>	<b>18</b>
5.1. Programas de senescencia celular.....	19
5.2. Marcadores de senescencia.....	26
5.2.1. Vías de señalización como marcadores de senescencia.....	27
5.2.2. Alteraciones morfológicas como marcadores de senescencia.....	31
<b>6. LA AUTOFAGIA.....</b>	<b>34</b>
6.1. Definición de autofagia.....	34
6.2. Tipos de autofagia.....	35
6.3. Maquinaria autofágica.....	36
6.4. Regulación de la autofagia.....	39
6.4.1. Reguladores <i>upstream</i> de mTORC1.....	40
6.4.2. Reguladores <i>downstream</i> de mTORC1.....	41
<b>7. LOS RECEPTORES NUCLEARES.....</b>	<b>43</b>
7.1. Receptor activado por proliferadores del peroxisome (del inglés <i>Peroxisome Proliferator Activated Receptors</i> , PPARs).....	44
7.2. Clasificación y función de los PPARs.....	45
<b>8. SENESCENCIA, AUTOFAGIA Y RECEPTORES NUCLEARES EN LA ENFERMEDAD DE ARTROSIS.....</b>	<b>50</b>
8.1. Artrosis y senescencia celular.....	50
8.1.1. Nuevas estrategias terapéuticas en el campo de la senescencia celular.....	51
8.1.1.1. Fármacos senolíticos en artrosis.....	53



8.2. Artrosis y autofagia.....	54
8.2.1.Reguladores del proceso de autofagia.....	55
8.2.2.Terapias actuales moduladoras del proceso de autofagia.....	56
8.3. Metabolismo y receptors nucleares en la enfermedad de artrosis.....	58
<b>9. CRIBADO DE ALTO RENDIMIENTO.....</b>	<b>60</b>
<b>10. REPOSICIONAMIENTO DE FÁRMACOS.....</b>	<b>63</b>
<b>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....</b>	<b>65</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>68</b>
<b>1. IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS SENOTERAPÉUTICOS Y MODULADORES DE AUTOFAGIA MEDIANTE TÉCNICAS DE CRIBADO DE ALTO RENDIMIENTO.....</b>	<b>69</b>
1.1. Librería química de compuestos <i>Prestwick</i> .....	69
1.1.1.Estímulos usados en cribado de alto rendimiento.....	70
1.2. <i>Screening</i> primario: identificación de Senoterapeúticos.....	71
1.2.1.Cultivo de líneas celulares en monocapa.....	71
1.2.2.Metodología técnica.....	72
1.2.3.Diseño del ensayo de senescencia.....	73
1.2.4.Cuantificación de la actividad $\beta$ -galactosidasa asociada a senescencia.....	73
1.2.5.Análisis estadístico del ensayo de senescencia correspondiente al <i>screening</i> primario.....	76
1.3. <i>Screening</i> secundario: identificación de moduladores de autofagia.....	76
1.3.1.Desarrollo de una línea celular estable en condrocitos para la monitorización del flujo de autofagia: T/C28a2-EGFP-mCherry-LC3.....	76
1.3.2.Cultivo de líneas celulares en monocapa.....	77
1.3.3.Diseño del ensayo de autofagia.....	77
1.3.4.Cuantificación del flujo de autofagia.....	78
1.3.5.Análisis estadístico del flujo de autofagia correspondiente al <i>screening</i> secundario.....	80
<b>2. ESTUDIOS DE CONFIRMACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DEL FENOFIBRATO.....</b>	<b>80</b>
2.1. Estímulos usados en ensayos de confirmación de la actividad biológica.....	81
2.2. Aislamiento y cultivo de condrocitos humanos primarios.....	82
2.3. Ensayos de apoptosis.....	83
2.4. Caracterización del efecto senoterapéutico.....	84
2.4.1.Modelos celulares en monocapa.....	85
2.4.2.Cuantificación del número de células senescentes.....	85
2.5. Caracterización del efecto proautofágico.....	88
2.5.1.Cultivo de líneas celulares en monocapa.....	88
2.5.2.Cuantificación del flujo de autofagia por citometría de flujo.....	88
2.6. Extracción de ARN y PCR a tiempo real.....	89
2.6.1.Extracción y cuantificación del Ácido Ribonucleico (ARN).....	89
2.6.2.Retrotranscripción.....	89
2.6.3.Cuantificación de expresión génica por PCR cuantitativa (qPCR).....	90

2.6.4. Estudios de silenciamiento génico.....	93
<b>3. EVALUACIÓN DE LA EFICACIA TERAPÉUTICA DEL FENOFIBRATO.....</b>	<b>94</b>
3.1. Estímulos usados en los ensayos de evaluación de la eficacia terapéutica.....	94
3.2. Extracción y análisis de proteínas mediante técnicas de Western Blot.....	94
3.3. Tinción de Safranina O- <i>Fast Green</i> .....	97
3.4. Cuantificación de la liberación de óxido nítrico.....	98
<b>4. PAPEL DEL RECEPTOR NUCLEAR PPAR<math>\alpha</math> EN MODELOS PRECLÍNICOS DE ENVEJECIMIENTO ARTICULAR Y ARTROSIS.....</b>	<b>99</b>
4.1. Técnicas histológicas.....	99
4.1.1. Análisis histológicos.....	99
4.1.2. Inmunohistoquímica.....	99
4.1.3. Cuantificación de la inmunohistoquímica.....	100
4.2. Extracción de ARN a partir de muestras de sangre.....	100
4.2.1. Retrotranscripción de ARN obtenido a partir de sangre.....	101
4.3. Análisis de pacientes con artrosis de rodilla tratados con fibratos procedentes de la cohorte <i>Osteoarthritis Initiative</i> (OAI).....	101
4.3.1. Medidas clínicas.....	102
4.3.2. Análisis estadísticos.....	103
<b>5. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS.....</b>	<b>104</b>
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>105</b>
<b>1. IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS SENOTERAPÉUTICOS Y MODULADORES DE AUTOFAGIA MEDIANTE TÉCNICAS DE CRIBADO DE ALTO RENDIMIENTO.....</b>	<b>106</b>
1.1. La IL-6 induce senescencia y disminuye el flujo de autofagia en condrocitos humanos.....	106
1.2. Identificación de compuestos senoterapéuticos mediante técnicas de imagen.....	110
1.2.1. Desarrollo de ensayo.....	110
1.2.2. Screening primario.....	112
1.3. Identificación de compuestos moduladores de autofagia mediante técnicas de imagen.....	114
1.3.1. Desarrollo de ensayo.....	114
1.3.2. Screening secundario.....	116
1.4. Compuestos y dianas terapéuticas identificadas a partir de un screening de reposicionamiento.....	118
<b>2. CONFIRMACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DEL FENOFIBRATO.....</b>	<b>120</b>
2.1. El FN reduce la senescencia celular y activa el flujo de autofagia en condrocitos humanos tratados con IL-6.....	120
2.2. El FN no afecta a la viabilidad de los condrocitos.....	123
2.3. Caracterización del efecto senoterapéutico en condrocitos humanos.....	125
2.3.1. La activación de PPAR $\alpha$ presenta un efecto senolítico.....	125
2.3.2. Los agonistas del receptor nuclear PPAR $\alpha$ eliminan los condrocitos senescentes a través de la vía de apoptosis.....	128
2.4. Efecto de los agonistas del receptor nuclear PPAR $\alpha$ en el proceso de autofagia.....	130

2.4.1. La activación de PPAR $\alpha$ incrementa el flujo de autofagia en respuesta a IL-6.....	130
2.4.2. Los agonistas PPAR $\alpha$ regulan marcadores de homeostasis.....	131
2.4.3. PPAR $\alpha$ participa en la regulación de la homeostasis del condrocito.....	132
2.5. Implicación del receptor PPAR $\alpha$ en el metabolismo del condrocito.....	133
<b>3. EVALUACIÓN DE LA EFICACIA TERAPÉUTICA DEL FENOFIBRATO.....</b>	<b>135</b>
3.1. El FN es un agonista PPAR $\alpha$ en condrocitos humanos.....	135
3.2. El FN ejerce un efecto protector sobre el cartílago articular enfermo.....	136
3.3. El FN regula los procesos de senescencia, autofagia e inflamación en condrocitos humanos artrósicos y envejecidos.....	138
<b>4. PAPEL DEL RECEPTOR NUCLEAR PPAR<math>\alpha</math> EN MODELOS PRECLÍNICOS DE ENVEJECIMIENTO ARTICULAR Y ARTROSIS.....</b>	<b>140</b>
4.1. PPAR $\alpha$ está disminuido en envejecimiento articular y en la artrosis.....	140
4.2. PPAR $\alpha$ está disminuido en sangre y en cartílago de pacientes con artrosis de rodilla.....	142
4.3. La activación farmacológica de PPAR $\alpha$ mejora las condiciones clínicas en pacientes artrósicos.....	144
<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>146</b>
1. Identificación de compuestos senoterapéuticos y moduladores de autofagia mediante técnicas de cribado de alto rendimiento.....	147
2. Confirmación de la actividad biológica del fenofibrato.....	149
3. Evaluación de la eficacia terapéutica del fenofibrato.....	153
4. Papel del receptor nuclear PPAR $\alpha$ en modelos preclínicos de envejecimiento articular y artrosis.....	154
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>155</b>
<b>CONCLUSIONS.....</b>	<b>158</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>160</b>
<b>INFORMACIÓN SUPLEMENTARIA.....</b>	<b>177</b>
1. Parámetros estadísticos del <i>screening</i> primario.....	178
2. Parámetros estadísticos del <i>screening</i> secundario.....	180
3. Los agonistas del receptor nuclear PPAR $\alpha$ presentan un efecto senolítico en las células humanas de pulmón IMR90.....	181
4. Los agonistas del receptor nuclear PPAR $\alpha$ presentan un efecto senolítico en los fibroblastos embrionarios de ratón MEFs Erc1 <sup>-/-</sup> .....	184
5. La activación farmacológica de PPAR $\alpha$ mejora las condiciones clínicas en pacientes artrósicos.....	186
6. El Fenofibrato presenta efecto senolítico y pro-autofágico en condrocitos.....	187
<b>PUBLICACIONES.....</b>	<b>189</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Imagen de la articulación sinovial
- Figura 2.** Zonas de la MEC que rodean a los condrocitos
- Figura 3.** Representación esquemática de las capas en las que se divide el cartílago
- Figura 4.** Organización molecular del cartílago articular
- Figura 5.** Representación de las alteraciones que ocurren en la articulación artrósica
- Figura 6.** Imagen de la estructura del telómero humano
- Figura 7.** Estructura de la telomerasa
- Figura 8.** Potencial dañino de los factores SASP que secretan las células senescentes
- Figura 9.** Vías que regulan el SASP a nivel transcripcional en respuesta a inductores de senescencia
- Figura 10.** Representación de la respuesta al daño en el ADN
- Figura 11.** Los complejos Cdk/Cyclin regulan la progresión del ciclo celular
- Figura 12.** Alteraciones morfológicas de las células senescentes
- Figura 13.** Representación de la participación de la mitocondria en el proceso de senescencia
- Figura 14.** Tres principales tipos de autofagia
- Figura 15.** Proceso de la autofagia
- Figura 16.** Esquema de las vías de señalización que intervienen en la regulación de mTORC1
- Figura 17.** Esquema gráfico de la estructura de los receptores nucleares
- Figura 18.** Mecanismo de transcripción génica mediado por los PPARs
- Figura 19.** Integración metabólica de los PPARs
- Figura 20.** Papel que desempeña PPAR $\alpha$  en el metabolismo lipídico como respuesta adaptativa al ayuno
- Figura 21.** Proceso de investigación farmacológica y desarrollo del descubrimiento de fármacos
- Figura 22.** Métodos de reposicionamiento enfocados a diferentes orientaciones
- Figura 23.** Representación de las clases terapéuticas (A) y tipos de dianas (B) a las que van dirigidas las moléculas que componen la quimioteca Prestwick
- Figura 24.** Ilustración del concepto de senolítico y senomórfico
- Figura 25.** Descripción gráfica de los pasos de la retrotranscripción de ARN obtenido a partir de células
- Figura 26.** Descripción gráfica de los pasos correspondientes a la retrotranscripción de ARN obtenido a partir de sangre
- Figura 27.** La IL-6 incrementó la actividad de la enzima SA- $\beta$ -Galactosidasa en condrocitos humanos
- Figura 28.** La IL-6 disminuyó el flujo de autofagia en condrocitos humanos
- Figura 29.** La IL-6 incrementó la expresión de marcadores de senescencia y de inhibición de autofagia en condrocitos humanos
- Figura 30.** Etapas del *Screening* primario
- Figura 31.** Representación de *scatter plot* correspondiente al *Screening* primario

- Figura 32.** Etapas del *Screening* secundario
- Figura 33.** Representación de *scatter plot* correspondiente al *Screening* secundario
- Figura 34.** El FN disminuyó la actividad de la enzima  $\beta$ -Galactosidasa
- Figura 35.** El FN incrementó el flujo de autofagia en respuesta a IL-6
- Figura 36.** El FN no induce muerte celular por apoptosis en condrocitos humanos
- Figura 37.** La activación de PPAR $\alpha$  presenta un efecto senolítico en condrocitos humanos
- Figura 38.** Los agonistas de PPAR $\alpha$  eliminan los condrocitos senescentes a través de la vía de apoptosis
- Figura 39.** Los agonistas PPAR $\alpha$  modulan el proceso de autofagia
- Figura 40.** Los agonistas PPAR $\alpha$  regulan marcadores de homeostasis celular
- Figura 41.** El receptor nuclear PPAR $\alpha$  participa en la regulación de la homeostasis del condrocito
- Figura 42.** Implicación del receptor PPAR $\alpha$  en el metabolismo lipídico del condrocito
- Figura 43.** El FN es un agonista PPAR $\alpha$  en condrocitos humanos
- Figura 44.** El FN ejerce un efecto protector sobre el cartílago articular enfermo
- Figura 45.** El FN regula los procesos de senescencia, autofagia e inflamación en condrocitos OA y envejecidos
- Figura 46.** PPAR $\alpha$  está disminuido en rodillas de ratón con envejecimiento espontáneo
- Figura 47.** PPAR $\alpha$  está disminuido en rodillas de ratón sometidas a artrosis experimental
- Figura 48.** PPAR $\alpha$  está disminuido en sangre y cartílago de pacientes con artrosis de rodilla

## ÍNDICE DE INFORMACIÓN SUPLEMENTARIA

**Figura 49.** Representación gráfica del factor  $Z'$  obtenido en el *screening* primario

**Figura 50.** Representación gráfica del factor  $Z'$  obtenido en el *screening* secundario

**Figura 51.** Los agonistas PPAR $\alpha$  son senolíticos en las células de pulmón IMR90

**Figura 52.** Los agonistas PPAR $\alpha$  son senolíticos en las células MEFs *Ercc1*<sup>-/-</sup>

**Figura 53.** Estratificación de los pacientes que toman fibratos procedentes de la cohorte OAI

**Figura 54.** El Fenofibrato se comporta como senolítico y pro-autofágico en condrocitos

## ÍNDICE DE TABLAS

**Tabla 1.** Factores SASP secretados por células senescentes en tejido artrósico y fluido sinovial

**Tabla 2.** Concentraciones de trabajo, casa comercial, referencia y disolvente de los estímulos empleados en HTS

**Tabla 3.** Concentraciones de trabajo empleadas para determinar la actividad SA-β-Gal

**Tabla 4.** Condiciones de lectura con el sustrato fluorescente C<sub>12</sub>FDG

**Tabla 5.** Condiciones de lectura en el proceso de autofagia

**Tabla 6.** Concentraciones de trabajo, casa comercial, referencia y disolvente de los estímulos empleados en ensayos de confirmación

**Tabla 7.** Condiciones de lectura en el proceso de senescencia

**Tabla 8.** Volumen de reactivos empleados en la retrotranscripción de ARN a partir de células

**Tabla 9.** Lista de sondas empleadas para cuantificar a tiempo real niveles de expresión génica

**Tabla 10.** Secuencia de los oligos del gen de referencia

**Tabla 11.** Volúmenes y concentración de los reactivos empleados en los ensayos de qPCR con sondas TaqMan® MGB

**Tabla 12.** Condiciones de lectura de qPCR

**Tabla 13.** Concentraciones de trabajo, casa comercial, referencia y disolvente de los estímulos empleados en ensayos de confirmación

**Tabla 14.** Descripción de las soluciones tampón utilizadas en Western Blot

**Tabla 15.** Lista de anticuerpos empleados en Western Blot

**Tabla 16.** Volumen de reactivos para la retrotranscripción de ARN a partir de muestras de sangre

**Tabla 17.** Valor de los parámetros estadísticos obtenidos en el *screening* primario

**Tabla 18.** Valor de los parámetros estadísticos obtenidos en el *screening* secundario

**Tabla 19.** Lista de compuestos y sus correspondientes dianas identificadas en el *screening* primario y secundario

**Tabla 20.** Análisis longitudinal de las subcategorías que forman la escala WOMAC en pacientes que toman fibratos

**ÍNDICE ABREVIATURAS**

ACD	Adrenocortical <i>displasia</i>
ACR	American College of Rheumatology
ACTD	Actinomicina D
ADAMTS	A Disintegrin and Metalloproteinase with Thrombosponfin Motifs 5
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
AF2	Dominio de función de activación transcripcional 2
AGEs	Productos finales de una glicación avanzada
AINEs	Antiinflamatorios no esteroideos
AMPK	Adenosine monophosphate-activated protein kinase
AP-1	Activator protein-1
apoA-I	Apolipoproteína I
apoA-II	Apolipoproteínas II
AR	Receptor de andrógenos
ARF	Alternate Reading Frame
ARN	Ácido Ribonucleico
ATCC	American Type Culture Collection
ATG	Autophagy
ATM	Ataxia telangiectasia mutated
ATR	ATM and Rad-3 related
BCA	Ácido bicinconínico
BMPs	Bone morphogenic proteins
BSA	Albúmina Sérica Bovina
°C	Grados centígrados
CDKs	Cyclin-dependent kinase
CDKis	Cyclin-dependent kinase inhibitor
CDMPs	Cartilage-derived morphogenic proteins
C/EBP	CCAT/Enhancer Binding Protein
C <sub>12</sub> FDG	5-dodecanoylamino fluorecein di-β-D-galactopyranoside
CHK1	Checkpoint-1
CHK2	Checkpoint-2
CILP	Intermediate-layer protein
CMA	Autofagia Mediada por Chaperonas
CMP	Cartilage matrix protein ó matrilin-1
COMP	Cartilage oligomeric matrix protein
COX-2	Ciclooxigenasa-2
cPGI	Carbaprostaciclina
CPT-I	Carnitina palmitoil transferasa I



CP	CP775146
CQ	Cloroquina
Ct	Cycle Threshold
CTGF	Connective-tissue growth factor
CV	Coeficiente de Variación
DBD	Dominio de unión al ADN
DDR	DNA damage response
DE	Desviación estándar
DEPC	Dietil Pirocarbonato
DEPTOR	DEP domain containing mTOR-interacting <i>protein</i>
DFCP1	Double FYVE domain-containing protein 1
DKC1	Dyskerin pseudouridine synthase 1
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's
DMOADs	Disease-modifying osteoarthritis drugs
DMSO	Dimetil Sulfóxido
DNMT1	Metil transferasa del DNA
D+Q	Dasatinib + Quercetina
EFNB1	Receptores efrina B1
EFNB3	Receptores efrina B3
EMA	European Medicines Agency
EMEM	Eagle's Minimum Essential Medium
Ep300/Crebbp	P300/CREB binding protein
ER	Receptor de estrógenos
ETYA	Ácido eicosatetranoico
FDA	Food and Drug Administration
FGF	Fibroblast growth factor
FIP200	Family Interacting Protein of 200 KDa
FKBP12	FK506-binding protein 12-kDa
FN	Fenofibrato
Fox	Forkhead box
GAP	GTPase-activating protein
GDF5	Growth/differentiation factor 5
GEE	Generalized estimating equations
GLUT1	Membrane glucose transporter 1
GPCRs	Receptores acoplados a proteínas G
GR	Receptor de glucocorticoides
GSK3-β	Glycogen synthase kinase 3β
GW	GW7647
h	Hora
HCS	High Content Imaging System

HDL	High density lipoprotein
HGF	Hepatocyte growth factor
HGPS	Síndrome de Hutchinson-Gilford
HIF1 $\alpha$	Hypoxia inducible factor 1 $\alpha$
HOPS	Homotypic fusion and vacuole protein sorting complex
HREs	Hormone response elements
HTS	High Throughput Screening
IGFs	Insulin-like growth factors
IGF1	Insuline-like growth factor 1
IKK $\beta$	Quinasa IkappaB
IL-1	Interleuquina-1
IL-6	Interleuquina-6
IL-17	Interleuquina-17
IL-18	Interleuquina-18
IMC	Índice de masa corporal
iNOS	Inducible nitric oxide synthase
IP	Ioduro de Propidio
JNK	c-Jun N-terminal kinase
kg	Kilogramos
KL	Kellgren y Lawrence
LBD	Dominio de unión al ligando
LC3	Light Chain 3
LDL	Low density lipoprotein
LIF	Leukemia inhibitory factor
LTB4	Leucotrieno B4
LXR	Receptor X del hígado
MAP1LC3B	Microtubule-Associated Protein 1 Light Chain 3 $\beta$
MAPK	Mitogen-induced protein kinase
MEC	Matriz extracelular
$\mu$ l	Micro litro
mLST8	Mammalian lethal with sec-13 protein 8
mm	Milímetros
$\mu$ M	Micro molar
MMPs	Metaloproteasas
MR	Receptor mineralocorticoide
mSin1	Mammalian stress-activated map kinase-interacting protein 1
MT-MMP	Membrana tipo MMP
mTOR	Mammalian Target of Rapamycin
mTORC1	mTOR Complex 1
mTORC2	mTOR Complex 2

NEAA	Non Essential Amino Acids Solution
ng	Nanogramos
NINDS	National Institute of Neurological Disorders and Stroke
NLS	Secuencia de localización nuclear
NO	Óxido nítrico
NRBF2	Nuclear receptor binding factor 2
NT	No transfectada
OA	Osteoarthritis
OAI	Cohorte Osteoarthritis Initiative
OARSI	Osteoarthritis Research Society International
OIS	Oncogene-induced senescence
PAI-2	Inhibidor del activador de plasminógeno 2
PASE	Physical Activity Scale for the Elderly
PBS	Tampón fosfato salino
PE	Phosphatidylethanolamine
PETG	Phenylethyl $\beta$ -D-thiogalactopyranoside
PFA	Paraformaldehido
PGA <sub>1/2</sub>	Prostaglandina A
PGB <sub>2</sub>	Prostaglandina B
PGI <sub>2</sub>	Prostacyclin I <sub>2</sub>
PGJ	Prostacyclin J
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase
PI3K III	Class III phosphatidylinositol 3-kinase
PI3KR4	Phosphoinositide-3-kinase regulatory subunit 4
PI3P	Phosphatidylinositol triphosphate
PIK3C3	Phosphatidylinositol 3-kinase catalytic subunit type 3
PINK1	PTEN-induced putative protein kinase 1
PLEKHM1	Pleckstrin homology domain containing protein family receptor 1
POT1	Telomere single-stranded binding protein
PPARs	Receptores activados por proliferadores de peroxisomas
PP2A	Fosfatasa 2A
PR	Receptor de progesterona
PRAS40	Proline-rich Akt substrate 40 kDa
prbS6	Phospho-ribosomal protein S6
PRELP	Proline- and arginin-rich end leucine-rich repeat protein
PROCOAC	Cohorte Prospectiva de Artrosis de A Coruña
protor1/2	Protein observed with rictor 1 and 2
P/S	Penicilina/Estreptomina
PTEN	Tumor supresor phosphate and tensin
PVDF	Polivinildeno de difluorido

p62/SQSTM1	Sequestosome 1/p62-like family proteins
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa
Rapa	Rapamicina
Raptor	Regulatory-associated protein of mammalian target of rapamycin
RAR	Receptor del ácido retinoico
REDD1	DNA damage response 1
Rheb	Ras homolog enriched in brain
Rictor	Rapamycin-insensitive companion of mTOR
ROS	Especies reactivas de oxígeno
r.p.m	Revoluciones por minutos
RT	Retrotranscripción
RT-PCR	Real time-quantitative polymerase chain reaction
RXR	Receptor X del retinoide
SA-β-Gal	Senescence associated β-Galactosidase
SAMD	Senescence-associated mitochondrial dysfunction
SASP	Senescence-associated secretory phenotype
S/B	Signal to Background
SBF	Suero bovino fetal
SCAPs	Senescent Cell Anti-apoptotic Pathways
SDC4	Syndecan-4
SDS	Dodecilsulfato Sódico
SEM	Error estándar de la media
siRNA	Silenciamiento del ARN pequeño de interferencia
SNAREs	N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptors
SREBP1/2	Sterol regulatory element-binding protein 1/2
STAT	Signal transducer and activator of transcription
STF	Suero ternera fetal
S6K1	S6 kinase 1
T <sup>a</sup>	Temperatura
TBS-T	Tampón de Lavado
TERC	Telomerase RNA component
TERT	Enzima reverso transcriptasa telomerasa
TGF-β	Transforming growth factor beta
TIF-1A	Tripartite motif-containing protein-24
TINF2	Interacting nuclear factor 2
TNFα	Tumor necrosis factor-α
TR	Receptor de la hormona tiroidea
TRPV1	Receptor de potencial transitorio V1
TRF1	Telomeric repeat-binding factor 1
TRF2	Telomeric repeat-binding factor 2

TSC1	Tuberous sclerosis complex 1
TSC2	Tuberous sclerosis complex 2
TTD	Therapeutic Target Database
TZD	Tiazolidindionas
T2DM	Diabetes mellitus tipo 2
ULK1	Uncoordinated-51-Like Kinase 1
UVB	Luz ultravioleta B
UVRAG	UV radiation resistance associated gene protein
V	Voltios
VCAM-1	Vascular cell adhesion molecule 1
VLDL	Very low density lipoprotein
VPS34	Vesicular Protein Sorting 34
WIPI	WD-repeat-interacting phosphoinositide proteins
WOMAC	Western Ontario McMaster Osteoarthritis Index
X-gal	5-bromo-4-chloro-3-indoyl $\beta$ -D-galactopyranoside
YY1	Ying-Yang 1
4E-BP1	Eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein
8-HEPE	8- ácido hidroxieicosapentanoico
8-(R)HETE	8-(R)-ácido hidroxieicosapentanoico
8-(S)HETE	8-(S)-ácido hidroxieicosapentanoico
12-HETE	12-ácido hidroxieicosatetranoico
9-(R/S)HODE	9-(R/S)-ácido hidroxioctadecadienoico
13-(R/S)HODE	13-(R/S)-ácido hidroxioctadecadienoico
20,8,9-HEET	20,8,9-ácido hidroxiepoxieicosatrienoico
20,11,12-HEET	20,11,12-ácido hidroxiepoxieicosatrienoico
20,14,15-HEET	20,14,15-ácido hidroxiepoxieicosatrienoico
15d-PGI <sub>2</sub>	15d-Prostacyclin I <sub>2</sub>

# **INTRODUCCIÓN**

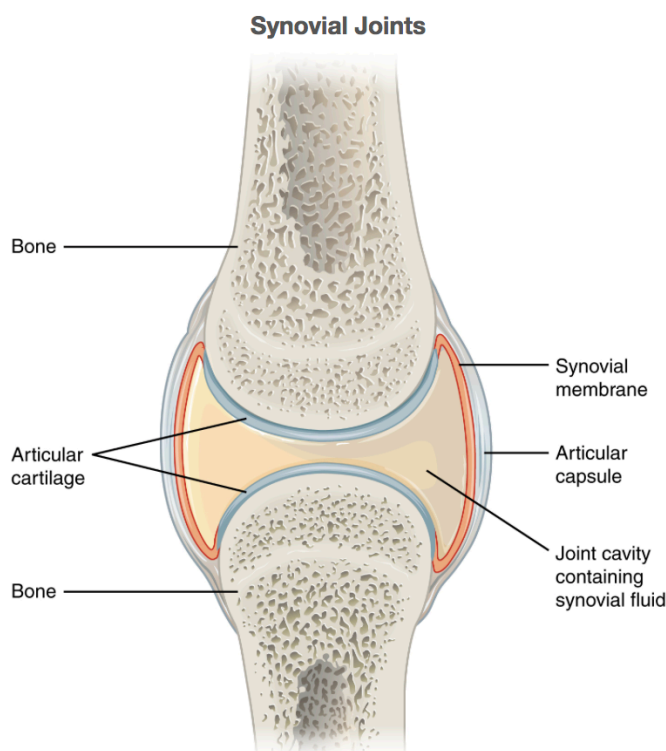
## 1. LA ARTICULACIÓN

La articulación es el punto de unión de dos huesos que permite estabilidad y genera movimientos suaves con mayor facilidad. Los tipos de articulación se clasifican en base a dos criterios correlacionados entre sí, histológicos basados en el tipo de tejido conectivo y funcionales según el movimiento producido entre los huesos que forman la articulación (1).

La principal articulación funcional del cuerpo humano es la articulación sinovial que permite un movimiento libre (diartrosis) sin producir dolor. Su cavidad articular está formada por los siguientes componentes (2):

- **La cápsula articular.** Está integrada por tejido conectivo fibroso que rodea a la cavidad articular y que se une al periostio.
- **El líquido sinovial.** Fluido secretado por la membrana sinovial, que rellena la cavidad para mantener lubricada la articulación y proporciona nutrición al cartílago articular.
- **El cartílago articular hialino.** Recubre toda la superficie articular de cada hueso. Aporta la capacidad funcional de la articulación proporcionando una superficie de carga con movimientos libres de dolor.
- **La membrana sinovial.** Fina capa que recubre la parte interna de la cápsula articular y produce el líquido sinovial.

La articulación sinovial además de estos elementos presenta otros como los ligamentos, músculos y tendones que proporcionan un soporte adicional a la estructura. Otro criterio de clasificación de la articulación sinovial es según el movimiento que permite a los huesos, por lo tanto se habla de la articulación en bisagra característica de la rodilla, la articulación condílea presente en la mano, la articulación en silla de montar propia del pulgar, la articulación plana común de la región acromioclavicular, la articulación en pivote en la zona atlantoaxial y la articulación esférica característica de la cadera (1, 3, 4).



**Figura 1. Imagen de la articulación sinovial.** Representación de los principales componentes que la forman. (Disponible en <https://cnx.org/contents/bFtYymxt@4/Synovial-Joints>)

## 2. EL CARTÍLAGO ARTICULAR

El cartílago articular es un tejido conectivo especializado de las articulaciones diartrodiales que a diferencia de la mayoría de tejidos es avascular, aneural y alinfático, y que se nutre por difusión a partir del líquido sinovial (5). En humanos existen tres tipos de cartílago articular, el hialino, el fibroso y el elástico siendo el primero el más común. El cartílago hialino se caracteriza por tener un espesor muy fino, de entre 2 a 4 mm de grosor y se encuentra en articulaciones sinoviales y en otras partes del cuerpo como en las costillas, en la nariz, en la tráquea, en los bronquios y en la laringe (6, 7).

La función y las propiedades del cartílago están relacionadas con la composición y estructura de la matriz extracelular (MEC), uno de los principales componentes de este tejido. Proporciona una superficie lisa y lubricada en la articulación para permitir una movilidad con bajo coeficiente de fricción, facilitando la absorción y disipando la carga mecánica y minimizando la erosión entre los elementos óseos.



## **2.1. Componentes del cartílago articular**

El cartílago articular está formado por un único tipo celular - los condrocitos - embebidos en una abundante MEC que proporciona el soporte estructural y bioquímico.

### **2.1.1. Los condrocitos**

Los condrocitos representan el 2-5% del volumen total de tejido y son los responsables de la síntesis, mantenimiento y degradación de la MEC en un estado de equilibrio de bajo recambio. Los condrocitos adultos apenas presentan actividad mitótica y mantienen un equilibrio constante entre los procesos anabólicos y catabólicos al menos que el proceso sea interrumpido. El metabolismo de los condrocitos funciona con una baja tensión de oxígeno, oscilando desde el 10% en la zona superficial a menos del 1% en las zonas profundas. La principal fuente de energía es la glucosa, precursor esencial para la síntesis de los glucosaminoglicanos y obtenida a partir de la vía glucolítica. El bajo número de células que componen el cartílago, la ausencia de aporte vascular e inervación hacen que el condrocito presente una capacidad limitada para regenerar la arquitectura de la matriz (3, 8).

En el entorno más cercano a los condrocitos existen tres regiones pertenecientes a la MEC que se clasifican en función de la proximidad a las células del cartílago, composición, diámetro y organización de las fibras de colágeno. La matriz pericelular es una fina capa que envuelve de forma individual a cada condrocito y está formada por microfibrillas de colágeno tipo VI que interactúan con hialuronano, con pequeños proteoglicanos y moléculas de la superficie celular para mantenerlos unidos, mantenerlos en un estado diferenciado de baja renovación y protegerlos de la interacción con los componentes de la matriz de la zona interterritorial (3, 8). Alrededor de la matriz pericelular se encuentra la matriz territorial que contiene una densa red de fibras de colágeno formando una estructura tipo cápsula proporcionando protección a los condrocitos del estrés mecánico (5). La última capa es la matriz interterritorial, una región más grande compuesta por una red de colágeno fibrilar (tipo II, IX, XI) asociada a proteoglicanos pequeños y agreganos contribuyendo a las propiedades bioquímicas de la matriz (8).

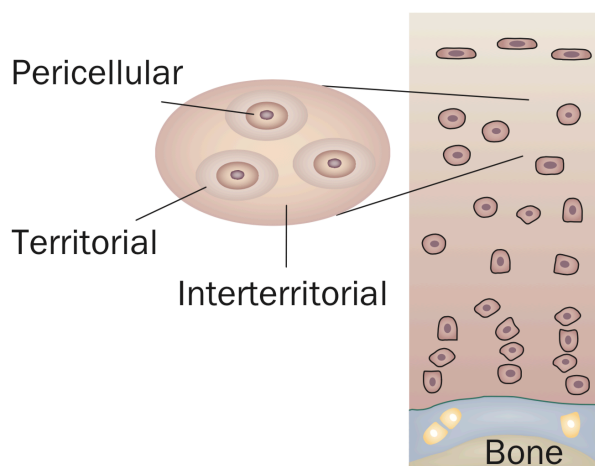


Figura 2. Zonas de la MEC que rodean a los condrocitos (9)

## 2.1.2. La matriz extracelular

### 2.1.2.1. Organización de la matriz extracelular

La MEC, que proporciona el soporte estructural y bioquímico en el cartílago, se divide en cuatro zonas diferenciadas entre sí según la organización celular, la arquitectura de las fibras de colágeno y el contenido de proteoglicanos y agua, siendo esta última de baja concentración en las capas más profundas (3, 5).

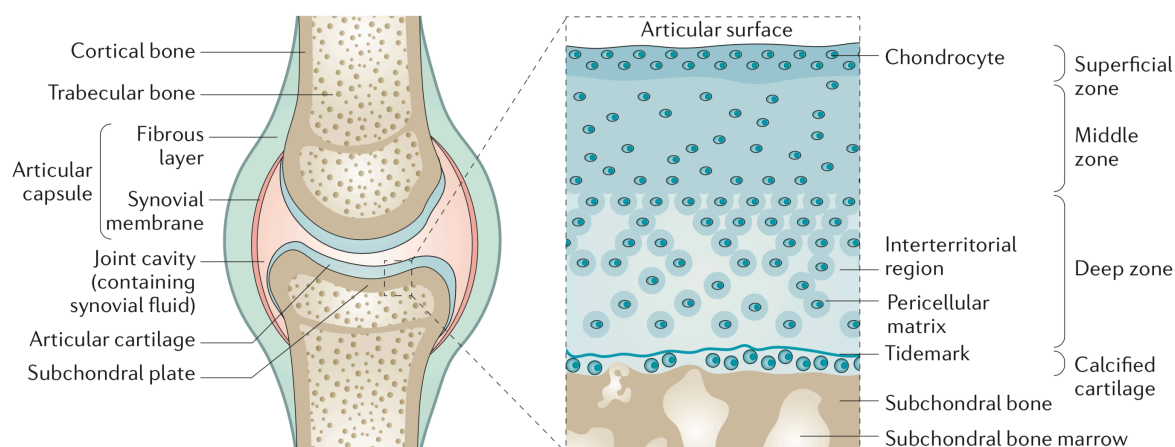
- **Zona superficial ó tangencial.** Es la capa superficial del cartílago que entra en contacto con el fluido sinovial. Ocupa entre 10-20% del espesor del tejido articular. Está formada principalmente por un elevado número de condrocitos con morfología alargada y alineados paralelamente a la superficie y por fibras de colágeno tipo II y IX con orientación tangencial organizadas de forma compacta y firme. Esta zona es responsable de resistir las fuerzas de tensión y presión características de una articulación para proteger a las capas más profundas.

- **Zona media ó de transición.** Está localizada en la zona inmediata inferior a la capa superficial. Representa entre el 40-60% del volumen total del cartílago. Contiene proteoglicanos y densas fibras de colágeno organizadas de forma oblicua. El número de condrocitos es menor a la zona superficial y su forma es esférica. Se considera la primera línea de resistencia a las fuerzas de compresión.

- **Zona profunda.** Está situada entre la zona media y la *tidemark*. Representa el 30% del volumen total del cartílago. Su principal función es proporcionar la mayor resistencia a las fuerzas de presión debido a la organización de fibras de colágeno de mayor diámetro distribuidas perpendicularmente a la superficie articular. Incluye mayor

contenido de proteoglicanos y los condrocitos se organizan en orientación columnar, paralelos a las fibras de colágeno y perpendiculares a la línea articular.

- **Tidemark y zona calcificada.** El *tidemark* es la zona de transición entre el cartílago y la zona calcificada, la cual entra en contacto con el hueso subcondral. La zona calcificada presenta una población celular escasa y condrocitos hipertróficos sin presencia de proteoglicanos. Se encarga de proporcionar un apoyo firme entre las fibras de colágeno del tejido articular y el hueso subcondral.



**Figura 3. Representación esquemática de las capas en las que se divide el cartílago (3)**

### 2.1.2.2. Composición de la matriz extracelular

En el cartílago articular normal los componentes de la MEC se dividen en cinco grupos: agua, colágeno, proteoglicanos, proteínas no colágenas y glicoproteínas.

- **Agua.** Es el componente más abundante en el cartílago representando hasta un 80% del peso húmedo. El 30% de este volumen se reparte entre el espacio intrafibrilar del colágeno con aspecto de gel y en menor medida en los espacios intracelulares y porosos de la matriz. El contenido del agua presenta disueltos iones inorgánicos como el sódico, cálcico, clorhídrico y potásico. Su concentración desciende en las capas inferiores, siendo alrededor de un 80% en la zona superficial y de un 65% en la zona profunda. El flujo del agua es distribuido según gradiente de presión a través del cartílago permitiendo transportar y repartir nutrientes a los condrocitos y proporcionar función lubricante en la zona superficial. Su interacción con las macromoléculas de la matriz influye sustancialmente en soportar significativas cargas mecánicas (6).

- **Colágeno.** Macromolécula estructural más importante de la MEC representando el 60% del peso seco del cartílago. El colágeno tipo II es el más abundante y constituye el endoesqueleto del cartílago al encontrarse entrelazado formando fibrillas y fibras con agregados de proteoglicanos. En su superficie presenta siete sitios de entrecruzamiento con moléculas de colágeno tipo IX unidas por enlaces covalentes. Formando parte del armazón de las fibrillas de colágeno tipo II también se encuentran entrecruzadas moléculas del tipo XI. Otros tipos de colágeno (I, III, IV, V, VI, XII y XIV) están presentes en menor proporción y participan en la estabilización y formación de la red del colágeno tipo II (6, 10, 11).

Los miembros de la familia del colágeno forman una triple hélice compuesta por tres cadenas polipeptídicas (cadenas  $\alpha$ ) cuya composición amino-acídica consiste en glicina, prolina, hidroxiprolina e hidroxilisina que mediante puentes de hidrógeno en la glicina y enlaces covalentes en la hidroxilisina estabilizan las tres cadenas polipeptídicas (12).

La estructura tridimensional del colágeno proporciona al cartílago articular propiedades de tensión y resistencia a la fricción.

- **Proteoglicanos.** Son macromoléculas formadas por dos componentes, una proteína central con varios dominios globulares a la que se unen mediante enlaces covalentes largas cadenas de polisacáridos, los glucosaminoglicanos. Son el segundo grupo más abundante de moléculas presentes en la MEC representando entre el 10-15% del peso. El cartílago articular presenta varios tipos de proteoglicanos necesarios para su función, como el agrecano, la decorina, el biglicano y la fibromodulina. El más abundante y de mayor tamaño es el agrecano que posee un centro proteico con tres dominios globulares al que se le unen cadenas de condroitín sulfato y queratán sulfato. Uno de sus dominios posee la capacidad de agregarse a través de la proteína de unión con el hialuronato y formar el complejo agrecano-hialuronato dentro de la red de colágeno de la MEC. Los tres principales agrecanos son el condroitín sulfato, el queratán sulfato y el dermatán sulfato, siendo el primero el más abundante (9).

Además del agrecano, existen otros proteoglicanos de menor tamaño como la decorina, el biglicano y la fibromodulina que están presentes en la MEC del cartílago. Difieren entre ellos en la composición y la función de los glucosaminoglicanos. Mientras que la decorina y el biglicano tienen unidas una y dos cadenas de dermatán sulfato, respectivamente, la fibromodulina posee varias cadenas de queratán sulfato. Los proteoglicanos que interactúan con el colágeno tipo II y ayudan a estabilizar la red

son la decorina y la fibromodulina, y por el contrario, el biglicano interactúa con el colágeno tipo VI y se localiza alrededor de los condrocitos.

No sólo el entramado fibrilar tridimensional del colágeno le otorga al cartílago la capacidad de soportar grandes presiones, sino también los proteoglicanos con carga aniónica que ocupan los espacios entre las fibras de colágeno. Las cargas negativas de los proteoglicanos atraen cationes, repelen aniones y esto se ve acompañado por el movimiento del agua debido al hinchamiento de los proteoglicanos que al permanecer en la red de colágeno la expanden, concediéndole al cartílago elasticidad, resistencia y capacidad de amortiguar los esfuerzos mecánicos.

- **Proteínas no colágenas y glicoproteínas.** Otras moléculas que juegan un papel importante en la organización y proporcionan estabilidad al cartílago articular son las proteínas no colágenas y las glicoproteínas. Las proteínas no colágenas que se incluyen en la MEC son la COMP (del inglés *cartilage oligomeric matrix protein*), la CMP (del inglés *cartilage matrix protein* ó *matrilin-1*), la CILP (del inglés *intermediate-layer protein*), la PRELP (del inglés *proline- and arginin-rich end leucine-rich repeat protein*), Fibronectina y proteoglicanos de heparán sulfato de la superficie celular como el Syndecan-4 (SDC4). Entre las glicoproteínas destaca la Lubricin (PRG4) en la zona superficial ayudando a reducir la fricción entre las superficies (7).

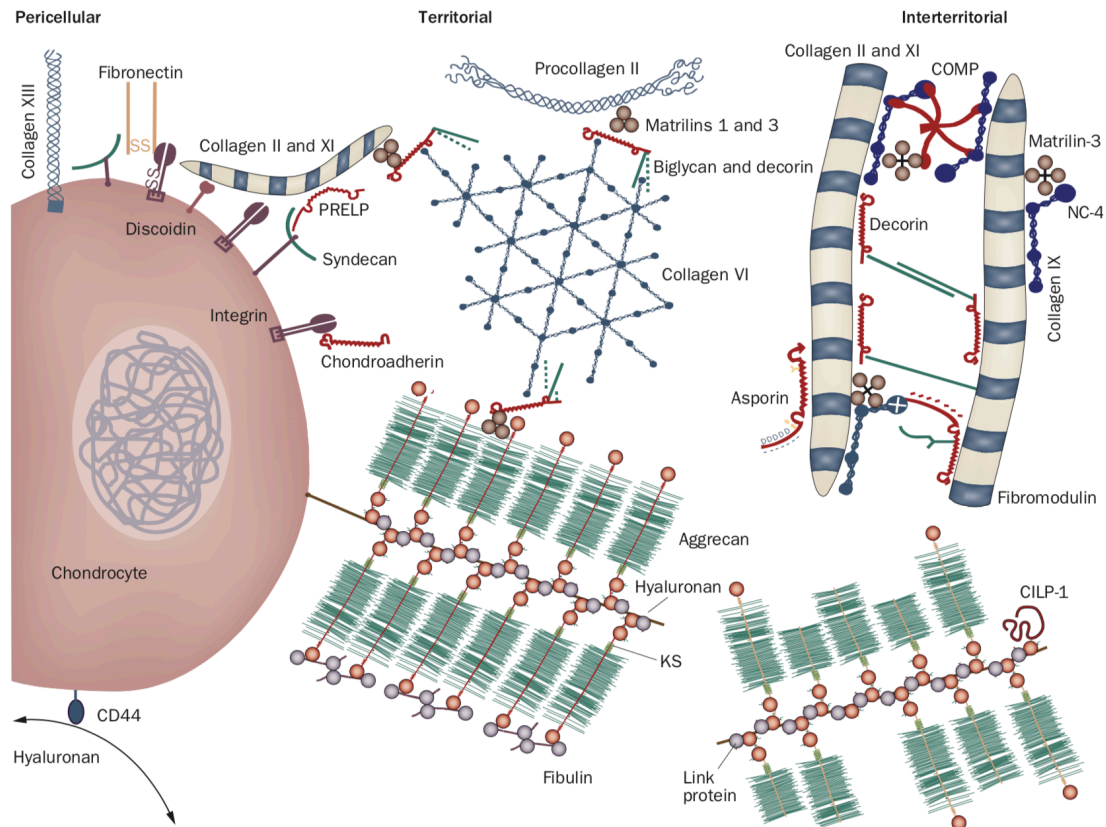


Figura 4. Organización molecular del cartílago articular (9)

### 3. LA DEGRADACIÓN DEL CARTÍLAGO ARTICULAR

Los condrocitos son el elemento principal del cartílago articular ya que son los responsables de la síntesis y mantenimiento de los componentes de la MEC. En condiciones fisiológicas, los condrocitos adultos no exhiben actividad mitótica detectable, permanecen en un estado quiescente y en respuesta a estímulos externos como la carga mecánica, mantienen un equilibrio entre los procesos anabólicos y catabólicos reemplazando los componentes de la MEC (13). En este sentido, renuevan las fibras de colágeno tipo II, los glucosaminoglicanos que se unen a los proteoglicanos y producen sustancias lubricantes como lubricina y ácido hialurónico proporcionando una superficie articular lisa de bajo coeficiente de fricción durante el movimiento (14). La organización espacial de todos estos componentes de la matriz ayudan al cartílago a desempeñar su principal función de absorción y disipación de las cargas mecánicas (15).

Estos estímulos externos se consideran necesarios para mantener la homeostasis del cartílago. Se promueve el movimiento del líquido sinovial que entra en contacto

con el cartílago facilitando su nutrición (16) y se induce la eliminación de los productos no deseados. Sin embargo, este estado fisiológico se puede ver alterado por diversos factores como el envejecimiento, alteraciones de la integridad de los tejidos articulares o un exceso anormal de carga mecánica provocando alteraciones en la composición y estructura de la MEC. La perturbación del equilibrio conduce a un aumento de los procesos catabólicos frente a los anabólicos, con mayor pérdida de proteoglicanos y erosión de la red de colágeno desregulándose la función del condrocito. Una de las enfermedades más comunes que presentan un desequilibrio en los mecanismo de compensación y alteraciones en los tejidos articulares es la artrosis (3).

## 4. LA ARTROSIS

### 4.1. Definición de artrosis

La *Osteoarthritis Research Society International* (OARSI) ha proporcionando un concepto unificado de la definición de artrosis como “un desorden de las articulaciones móviles caracterizado por estrés celular y degradación de la matriz extracelular iniciado por una micro o macro lesión que activa la respuesta de reparación maladaptativa incluyendo a vías pro-inflamatorias de la inmunidad innata. Esta enfermedad se manifiesta primero con alteraciones moleculares (metabolismo anormal del tejido tisular) seguido por cambios anatómicos y/o fisiológicos (caracterizados por degradación del cartílago, remodelaje del hueso, formación de osteofitos, inflamación articular y pérdida de la función normal articular) que puede culminar en enfermedad” (17).

La artrosis ha sido caracterizada de diversas maneras en la literatura combinando métodos de imagen con identificación radiográfica y métodos clínicos. Los métodos de imagen visualizan las estructuras con más detalle para su evaluación y determinan los grados de severidad en la escala de Kellgren y Lawrence (KL) que oscilan de 0 a 4 y que están relacionados con la aparición secuencial de osteofitos, estrechamiento del espacio articular y esclerosis (18). Los métodos clínicos siguen los criterios de diagnóstico asignados por la *American College of Rheumatology* (ACR) desarrollados para cadera, rodilla y manos según un examen sintomatológico (dolor, rigidez matinal y limitaciones funcionales) y un examen físico (crepitación, movimiento restringido, sensibilidad articular y agrandamiento ósea) (19-21).

La artrosis está considerada como una de las causas de discapacidad más importantes en la población mundial. La combinación de los efectos del envejecimiento y de un incremento de la obesidad provoca un aumento en su prevalencia informando

que actualmente están afectadas 250 millones de personas. Los estudios de prevalencia realizados en Europa, América del Norte, Asia y Oceanía muestran que la rodilla y las manos son las articulaciones más afectadas seguido de la cadera aumentando el diagnóstico en mujeres más que en hombres. Para el 2032, se estima que se incremente la prevalencia de padecer artrosis de rodilla, manos y cadera en la población con edad superior a los 45 años (22). Los datos actuales que existen de la incidencia son los registrados en los estudios realizados en España y Reino Unido. En ambas publicaciones se informa de picos de incidencia alrededor de los 75 años con una prevalencia del 4-5% para artrosis de manos, 6% para artrosis de cadera y 16-17% para artrosis de rodilla (4, 23).

La artrosis es la forma más común de artritis, una enfermedad del sistema musculoesquelético que afecta a las articulaciones de rodilla, cadera, columna, manos y pies y es la principal causa de dolor y discapacidad en personas adultas (24). Se considera una enfermedad de toda la articulación en la que se incluyen diversos cambios patológicos como la degradación del cartílago articular, formación de osteofitos, espesor del hueso subcondral, inflamación sinovial, degeneración de ligamentos, menisco e hipertrofia de la cápsula articular (25).

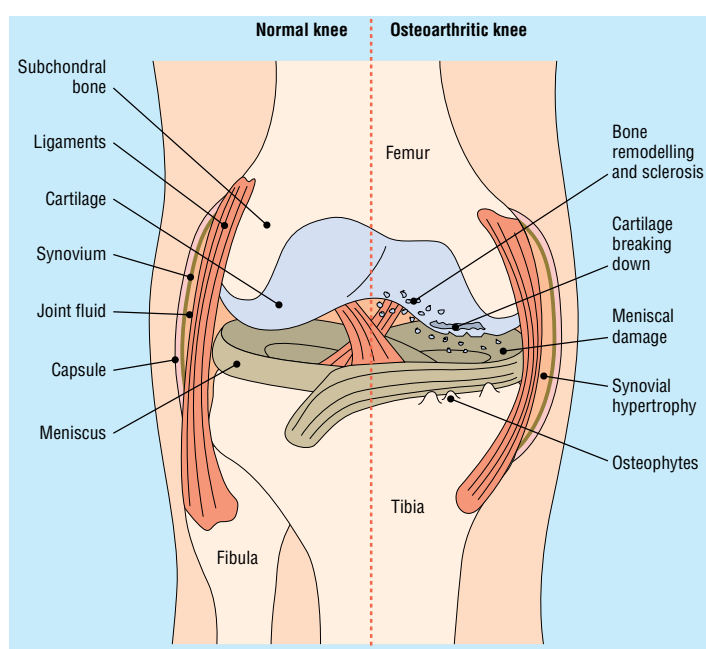


Figura 5. Representación de las alteraciones que ocurren en la articulación artrosica (24)



## 4.2. Factores de riesgo de la artrosis

La artrosis es una enfermedad multifactorial y se puede clasificar según los agentes que la desencadenan en artrosis primaria o idiopática y artrosis secundaria. La artrosis primaria resulta de una combinación de factores de riesgo como la edad, la obesidad o la genética. En cambio, causas de origen articular como traumatismos, intervenciones o anomalías en el nacimiento de las estructuras articulares se consideran principales desencadenantes de la artrosis secundaria (3). A su vez, los factores de riesgo asociados con el inicio y la progresión de la artrosis se dividen en dos grupos, según las características personales de cada individuo (edad, género, obesidad, genética y dieta) y factores que actúan directamente a nivel articular (daños, cargas anormales y malformaciones estructurales en la articulación) (26).

### - Factores de riesgo según las características personales de cada individuo

- ❖ **Edad.** Se considera el principal factor de riesgo de la artrosis con mayor incidencia en su desarrollo después de los 50 años (27). Dado que es multifactorial, existen muchos elementos partícipes en su desarrollo como el daño oxidativo, la senescencia celular, el estrechamiento del cartílago o la debilidad muscular (26).
- ❖ **Género.** Estudios epidemiológicos publicaron diferencias en la progresión de la artrosis entre hombres y mujeres, hallándose en estas últimas mayor prevalencia de artrosis de rodilla, cadera y manos y mostrando picos de mayor incidencia en la época menopáusica (4, 26). Estos argumentos sugieren una posible relación entre artrosis y factores hormonales, sin embargo, existe una gran controversia del papel del estrógeno en la artrosis. Algunos estudios justifican la disparidad de género por diferencias en la fortaleza y alineación ósea, laxitud del ligamento, embarazo o fuerza neuromuscular (28).
- ❖ **Obesidad.** Tanto la obesidad (Índice de masa corporal =  $IMC > 30\text{kg/m}^2$ ) como el sobrepeso ( $IMC = 25\text{ kg/m}^2$ ) representan un factor de riesgo importante para la artrosis de rodilla (29) y en menor grado para la de cadera (28). En cuanto a la artrosis de manos, hay autores que describen una relación con la obesidad debido a su efecto inflamatorio sistémico y metabólico (30). La artrosis relacionada con la obesidad no sólo se produce por estrés mecánico provocado por el peso que soportan las articulaciones sino que existe un componente metabólico sistémico. En el concepto de artrosis metabólica se incluyen además de la obesidad otros desórdenes que forman el síndrome metabólico como la diabetes mellitus tipo 2, dislipemia ó hipertensión. Defectos en el metabolismo lipídico, glucídico y los mediadores solubles liberados desde el tejido adiposo a la circulación sistémica

alteran la homeostasis del cartílago. Se crea un ambiente de inflamación crónica y los condrocitos secretan citoquinas pro-inflamatorias y mediadores responsables de la degradación de la matriz del cartílago (31).

- ❖ **Genéticos.** La artrosis es genéticamente heterogénea. Diversos estudios identifican genes envueltos en los mecanismos moleculares implicados en la patogénesis de la enfermedad. Un ejemplo de ello es el gen *GDF5* (*growth/differentiation factor 5*) asociado con el riesgo de artrosis de rodilla (32).
- ❖ **Dieta.** Bajos niveles de vitamina D, C y K pueden incrementar el desarrollo de artrosis. Sin embargo, son necesarios más estudios que establezcan una asociación sólida entre artrosis y factores dietéticos (28).

#### - Factores de riesgo que actúan directamente en la articulación

- ❖ **Daño articular.** En el contexto de la artrosis los daños más importantes son aquellos que resultan en la rotura del ligamento anterior cruzado, lo cual va acompañado con daño en el cartílago articular, en el hueso subcondral y en el menisco. Con el tiempo, estos daños están relacionados con un incremento en el riesgo de sufrir artrosis de rodilla (26, 28).
- ❖ **Carga anormal.** El uso repetitivo de un exceso de carga en las articulaciones está asociado con un incremento de riesgo de artrosis. Condiciones como trabajar más tiempo agachado, de pie o con las manos incrementan el riesgo de padecer artrosis de rodilla, cadera ó manos, respectivamente. La actividad física también puede presentar connotaciones negativas si hay una carga indebida o alto impacto en la articulación a pesar de fortalecer los músculos periarticulares que estabilizan la articulación (26, 28).
- ❖ **Malformación estructural.** Alteraciones en la alineación de los huesos puede provocar una distribución anormal de la carga y dar inicio a la degradación estructural articular (26, 28).

#### 4.3. Mecanismos patofisiológicos de la artrosis

Como se ha definido anteriormente, la artrosis se considera una enfermedad de toda la articulación y los cambios patológicos que se producen en los elementos que la integran afectan a la estructura articular resultando en dolor, deformidad y pérdida de la función (27, 33).

La progresión patológica de la artrosis sigue un patrón caracterizado por la presencia de cambios en la superficie del cartílago en las fases iniciales y como respuesta compensatoria se produce un incremento de la actividad anabólica, de

captación de agua y de producción de colágeno tipo II y proteoglicanos (34). La región que primero se perturba en el cartílago es la matriz pericelular, la cual rodea al condrocito y al verse alterada provoca la exposición de estas células a los componentes de la matriz inter-territorial a través de la activación de los receptores celulares que presentan en su superficie (25). Todo ello desregula la función de las células y se potencia el proceso catabólico asociado con un incremento de la producción de proteinasas, de citoquinas inflamatorias y de quimioquinas que actúan sobre la matriz (35). Estos cambios van acompañados y reforzados por una alteración del estado de los condrocitos. A diferencia del estado quiescente con bajo flujo de renovación que los caracteriza en un cartílago normal, en el tejido articular artrósico se encuentran en una fase activada de proliferación celular con formación de *clusters* (14). Al interrumpirse esta fase de reposo, el ratio de pérdida de colágeno y proteoglicanos excede al ratio de deposición de nuevas moléculas sintetizadas por los condrocitos estimulándose la producción de las enzimas que degradan la matriz y como consecuencia se activan programas de recompensa para su remodelación que conducen a cambios fenotípicos celulares hacia un estado hipertrófico seguido de calcificación del cartílago (25, 36).

A medida que el proceso patológico continúa, la matriz no resiste el estrés y se desarrollan fisuras profundas que derivan en una etapa final de destrucción del cartílago. Teniendo en cuenta que la artrosis es considerada una enfermedad que afecta a toda la articulación, la pérdida de cartílago también se ve agravada por los mediadores inflamatorios liberados de la inflamación sinovial y que alcanzan el tejido a través de la sinovia (3, 34, 37).

En la pérdida de integridad y organización estructural de los constituyentes de la MEC la disfuncionalidad de los condrocitos provoca una alteración del balance entre la síntesis y la degradación superando los factores catabólicos a los anabólicos en el desgaste progresivo del cartílago.

Los factores anabólicos son factores de crecimiento de naturaleza polipeptídica responsables de la síntesis de la MEC y de mantener la homeostasis del cartílago y/o estimular la reparación del mismo. Los más destacados en el contexto del tejido articular son *transforming growth factor beta* (TGF- $\beta$ ), *bone morphogenic proteins* (BMPs), *cartilage-derived morphogenic proteins* (CDMPs), *insulin-like growth factors* (IGFs), *connective-tissue growth factor* (CTGF), *hepatocyte growth factor* (HGF), *fibroblast growth factor* (FGF) y proteínas relacionadas con la lectina que poseen propiedades similares a los factores de crecimiento (5).

Los factores catabólicos que participan en la degradación del cartílago se agrupan en cuatro grupos: proteasas, fibronectina, neuromediadores y factores inflamatorios (5).

- **Proteasas.** Son una clase importante de enzimas que participan en el desarrollo de la artrosis y se conocen bajo el nombre de metaloproteasas (MMPs). Las MMPs se clasifican según la especificidad del sustrato y la localización celular en adamalisina (ADAM y el subgrupo ADAMTS), colagenasas, estromelisinias, gelatinasas y membrana tipo MMP (MT-MMP).

❖ **Adamalisina.** Las proteasas más representativas de este grupo son las metaloproteasas zinc-dependientes pertenecientes a la familia *A Disintegrin and Metalloproteinase with Thrombosponfin Motifs 5* (ADAMTS) (38). Ejercen su función en las fases tempranas de la artrosis ya que son responsables de degradar el agrecano. Son varios miembros los que forman la familia ADAMTS (ADAMTS-1, -4, -5, -8, -9, -15, -16, -18) pero las agrecanasas más implicadas en la patogénesis de la artrosis son las ADAMTS-4 y ADAMTS-5 (35, 39).

❖ **Colagenasas.** Son las MMPs que se anclan a la triple hélice del colágeno tipo I, II y III. Las MMP-1 y -8 están localizadas en la zona superficial y son específicas del colágeno tipo III y I, respectivamente. La MMP-13 está localizada en la zona profunda y presenta más preferencia sobre el colágeno tipo II (38). La degradación de la red de colágeno ocurre después de la degradación del agrecano, ya que éste tiene como función proteger al colágeno del proceso degradativo (35).

❖ **Estromelisinias.** En tejidos humanos se diferencian tres tipos, MMP-3, -10 y -11. Son específicas de proteoglicanos, fibronectina, elastina y laminina. La MMP-3 se encuentra aumentada en la artrosis temprana y actúa sobre el colágeno tipo IX. En las etapas más avanzadas hay estudios que informan de un aumento de la MMP-11 (5).

❖ **Gelatinasas.** En tejido articular se diferencian dos clases, MMP-9 y -2. Presentan preferencia por el colágeno tipo IV y V (5).

❖ **Membrana tipo MMP (MT-MMP).** Existen varios tipos de MT-MMP pero está documentado que la MT1-MMP juega un papel importante en la artrosis porque posee actividad colagenolítica y agrecanasa (5, 38).

- **Fibronectina.** Glicoproteína dimérica de adhesión localizada en la MEC del cartílago. La fibronectina no tiene efecto catabólico pero son los fragmentos obtenidos tras la degradación por acción de proteasas los que presentan actividad catalítica. Estos fragmentos potencian la pérdida de los proteoglicanos, incrementan la producción de

varias MMPs, de óxido nítrico (NO) en asociación con la *inducible nitric oxide synthase* (iNOS) y en asociación con la activación de otras quinasas (MAK, ERK, p38 y JNK) (5).

- **Neuromediadores.** Diferentes mediadores endocrinos como la leptina y algunos neuropéptidos pueden contribuir a la patogénesis de la artrosis. Algunos estudios demuestran una asociación con el estado inflamatorio que caracteriza a esta enfermedad articular (5).

- **Factores inflamatorios.** Aunque la destrucción del cartílago es el principal marcador de la artrosis y la degradación de colágeno tipo II es un hecho que determina la progresión irreversible, es importante destacar el componente inflamatorio que existe en dicha enfermedad y en el que intervienen otros tejidos articulares.

No se conocen con exactitud los mecanismos por los cuales el proceso inflamatorio es iniciado en artrosis pero sí se sugiere una implicación de la carga biomecánica anormal y del estrés oxidativo. Los condrocitos y las células de otros tejidos pueden responder a estas perturbaciones produciendo citoquinas inflamatorias como interleuquina-1 (IL-1) y *tumor necrosis factor- $\alpha$*  (TNF $\alpha$ ). Estos factores se sinergizan con otros promoviendo la síntesis de MMPs, agregasas y otras citoquinas proinflamatorias como la interleuquina-6 (IL-6), *leukemia inhibitory factor* (LIF), interleuquina-17 (IL-17), interleuquina-18 (IL-18) y quimioquinas potenciando el proceso catabólico en el cartílago (40).

Las principales vías que regulan el proceso inflamatorio son la vía NF $\kappa$ B y la *mitogen-induced protein kinase* (MAPK), las cuales están sobre-activadas en los condrocitos artrósicos. La vía NF $\kappa$ B se conoce como el principal regulador de inflamación de las acciones catabólicas inducidas por citoquinas. Por otro lado, la vía MAPK es activada en condrocitos por estímulos mecánicos e inflamatorias a través de otras enzimas como ERK, c-Jun N-terminal kinase (JNK) y p38. La activación de estas cascadas regula la expresión de genes implicados en los procesos catabólicos e inflamatorios (40).

#### 4.4. Tratamiento farmacológico actual y nuevas estrategias terapéuticas

Actualmente no existen fármacos modificadores del transcurso de la enfermedad y el tratamiento farmacológico disponible sólo es moderadamente efectivo para paliar el dolor. Engloba a antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) administrados tanto por vía oral o tópicamente, analgésicos como el paracetamol, opioides como el tramadol, la duloxetina que ejerce efectos antidepresivos por ser un inhibidor de la recaptación de serotonina pero que también actúa como analgésico a nivel central, glucosamina y

condroitínsulfato, terapias intra-articulares de ácido hialurónico y glucocorticoides y tratamientos biológicos basados en el uso de plasma rico en plaquetas. Además de estas medidas farmacológicas, las organizaciones centradas en estudiar la artrosis y otras enfermedades reumáticas ofrecen otras pautas como las no farmacológicas (programas de ejercicio y pérdida de peso) e intervenciones quirúrgicas (41). Las nuevas estrategias terapéuticas centradas en la búsqueda de nuevos fármacos para el tratamiento de la artrosis se dividen en dos grupos, por un lado identificar fármacos modificadores de la enfermedad (del inglés *disease-modifying osteoarthritis drugs*, DMOADs) y por otro moléculas más eficaces para combatir el dolor. Entre las nuevas moléculas DMOADs que están siendo investigadas destaca el compuesto UBX0101 que está en fase 1 de ensayos clínicos. Se trata de un agente senolítico que actúa sobre el proteína p53 y cuyo objetivo es eliminar selectivamente las células senescentes (ClinicalTrials.gov Número Indentificador: NCT03513016; última actualización con fecha del 13/05/2019). Otra molécula en fase 1 es el anticuerpo anti-ADAMTS-5 (M6495) dirigido al factor catabólico ADAMTS-5 perteneciente al grupo de las proteasas y participa en la degradación del cartílago (ClinicalTrials.gov Número Indentificador: NCT03224702; última actualización con fecha del 02/05/2019). En fase 2 de ensayos clínicos también se está estudiando la eficacia de otro agente que actúa sobre la proteasa ADAMTS-5 pero con actividad inhibidora (GLGP1972) (ClinicalTrials.gov Número Indentificador: NCT03595618; última actualización con fecha del 06/05/2019). Otra molécula que está en fase 2 es el inhibidor de la catepsina K (MIV-711), una proteasa que participa en la degradación de la estructura articular (ClinicalTrials.gov Número Indentificador: NCT03037489; última actualización con fecha del 18/03/2019). En fase 3 de estudios clínicos se encuentran varios agentes como el Lorecivint (SM04690) que actúa como inhibidor de la vía Wnt (ClinicalTrials.gov Número Indentificador: NCT03706521; última actualización con fecha del 10/05/2019), Sprifermin, un factor de crecimiento recombinante fibroblasto 18 (ClinicalTrials.gov Número Indentificador: NCT01919164; última actualización con fecha del 19/06/2018) y el Tissuegene-C, un factor de crecimiento transformante- $\beta$  (ClinicalTrials.gov Número Indentificador: NCT02072070; última actualización con fecha del 17/11/2017). Por otro lado, las nuevas investigaciones centradas en la sintomatología engloban a un conjunto de compuestos en fase 3 de ensayos clínicos, un inhibidor del receptor de la capsaicina y un grupo de agentes biológicos. En cuanto al primero, se trata de la molécula CNTX-4975, un inhibidor del receptor de potencial transitorio V1 (TRPV1) que es activado por la capsaicina y que está implicado en la transmisión y modulación del dolor (ClinicalTrials.gov Número Indentificador: NCT03660943; última actualización con fecha del 10/06/2019). Por otro lado, el grupo

de agentes biológicos incluye tres anticuerpos monoclonales anti-factor de crecimiento nervioso (del inglés *anti-Nerve Growth Factor*) como el Tanezumab (ClinicalTrials.gov Número Identificador: NCT00809783; última actualización con fecha del 3/06/2019), Filiranumab (ClinicalTrials.gov Número Identificador: NCT02289716; última actualización con fecha del 14/09/2017 y Fasinumab (ClinicalTrials.gov Número Identificador: NCT03161093; última actualización con fecha del 4/06/2019) (41, 42).

## 5. LA SENESCENCIA CELULAR

Un importante contribuyente al envejecimiento y a las enfermedades relacionadas con el envejecimiento es el proceso de senescencia celular y en consecuencia los efectos provocados por la presencia de células senescentes. *López-Otín et al.* (43) la clasificaron junto a la inestabilidad genómica, el acortamiento telomérico, las alteraciones epigenéticas, la pérdida de proteostasis, la desregulación de la detección de los nutrientes, la disfunción mitocondrial, el agotamiento de células madre y la alteración de la comunicación intercelular como uno de los nueve marcadores del envejecimiento.

La senescencia celular se caracteriza por la detención permanente del ciclo celular. Causa un descenso del potencial regenerativo y funcional de los tejidos y promueve la aparición de un fenotipo asociado a la senescencia conocido con el nombre de SASP (del inglés *senescence-associated secretory phenotype*) caracterizado por la capacidad que presentan las células senescentes de secretar factores pro-inflamatorios y moléculas que degradan la matriz. Representa una barrera importante para la tumorigénesis por limitar el crecimiento de las células cancerosas (44, 45).

Este fenómeno fue descrito por primera vez en 1961 por Leonard Hayflick y Paul Moorhead tras observar en cultivo *in vitro* que fibroblastos humanos normales presentaban capacidad limitada para replicarse. Aproximadamente después de 55 pases celulares alcanzaban un número finito de divisiones y entraban en un estado permanente de detención del ciclo celular dando inicio al proceso de senescencia (46, 47).

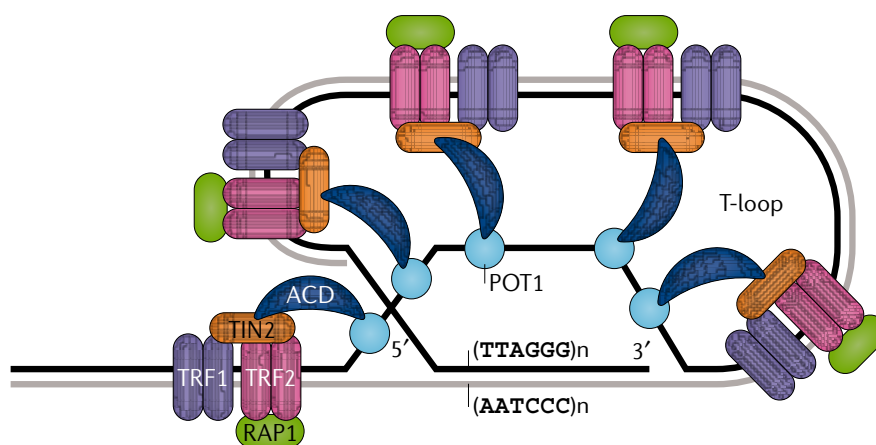
El término descrito por Hayflick y Moorhead en fibroblastos refleja sólo un tipo de senescencia celular debiendo su origen al acortamiento telomérico generado después de la división celular en ausencia de la actividad telomerasa (48, 49). En cambio, la investigación actual informa de varios estímulos independientes del proceso telomérico que son responsables de desencadenar el fenómeno de senescencia.

### 5.1. Programas de senescencia celular

Son varios los elementos estresores que provocan daño en el ácido desoxirribonucleico (ADN) y desencadenan diferentes programas de senescencia.

- **Senescencia replicativa.** En los procesos de mitosis ocurre un acortamiento progresivo de los telómeros que resulta en la detención del crecimiento celular. Este fenómeno natural puede cambiar la fisiología celular y afectar a enfermedades asociadas con el envejecimiento antes de llegar a ser terminalmente cortos y sin inducir una señal de daño en el ADN.

Los telómeros son estructuras situadas en los extremos de los cromosomas formados por la unión entre ADN no codificante cuya secuencia es 5'-TTAGGG-3' y por un complejo proteico formado por seis miembros denominado *shelterin*. Las proteínas que lo constituyen son esenciales tanto para la función como para proteger los telómeros de ser reconocidos como ADN dañado que se necesita reparar. Los miembros que forman el complejo son: POT1 (*telomere single-stranded binding protein*), TRF1 (*telomeric repeat-binding factor 1*), TRF2 (*telomeric repeat-binding factor 2*), TIN2 también conocida como TINF2 ó TRF1-interacting nuclear factor 2 y ACD también conocida como TPP1, PIP1 ó PTP (adrenocortical displasia protein homologue) (50, 51).



**Figura 6. Imagen de la estructura del telómero humano.** Representación de la secuencia repetitiva de ADN en el extremo de los cromosomas y de las proteínas que forman el complejo *shelterin* que protegen a los telómeros de la degradación de las nucleasas (50, 51).

El principal mecanismo para elongar a los telómeros son las telomerasas, enzimas formadas por un complejo ribonucleoproteico con actividad polimerasa que sintetizan nuevas repeticiones del telómero para compensar el acortamiento que ocurre de forma natural en cada división celular. Están formadas por tres componentes (50):



- enzima reverso transcriptasa telomerasa (del inglés *telomerase reverse transcriptase*, TERT): componente catalítico de las telomerasas que sintetiza ADN a partir de un molde ARN.
- la molécula de ARN asociada a la telomerasa (del inglés *telomerase RNA component*, TERC): es el componente ARN para la extensión telomérica durante la síntesis *de novo*.
- grupo de proteínas accesorias que estabilizan el complejo telomerasa: *dyskerin pseudouridine synthase 1* (DKC1), TCAB1, NHP2, NOP10, GAR1.

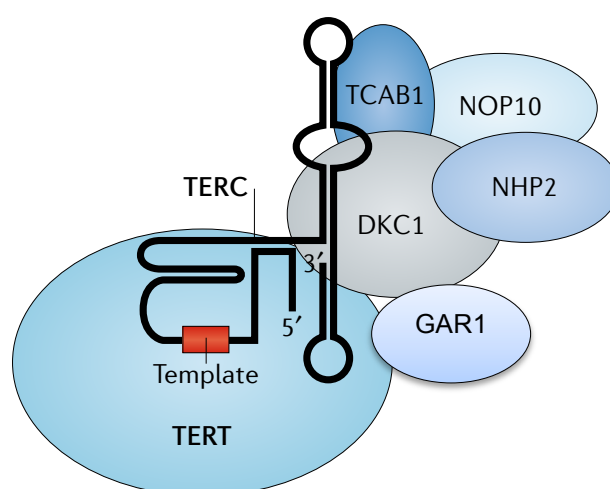


Figura 7. Estructura de la telomerasa. Modificado de (50).

Perturbaciones en la actividad endógena de las telomerasas, agentes que dañan el ADN (52) y el envejecimiento normal (53) ocasionan erosión de los telómeros durante la división celular agravado además por la incapacidad de las polimerasas de replicar completamente el ADN. La pérdida progresiva de los telómeros limita el crecimiento de las células normales en cultivo dando comienzo al fenómeno conocido como senescencia replicativa o límite de Hayflick (54).

- **Senescencia inducida por daño en el ADN.** Agentes como la  $\gamma$ -irradiación o la luz ultravioleta B (UVB) son empleados en cultivos *in vitro* para dañar el ADN y desencadenar los mecanismos de respuesta al daño en el ADN (del inglés *DNA damage response*, DDR). Hay autores que clasifican a las vías que tienen lugar en la DDR como marcadores de senescencia (*ver apartado 5.2*). En este modelo se engloban otros dos tipos de senescencia celular, la **senescencia inducida por quimioterápicos** y la **inducida por estrés oxidativo**. En ambos casos se conduce al daño en el ADN y por consiguiente se promueve senescencia a través de los

mecanismo de reparación del daño en el ADN. En el primer ejemplo se usan fármacos anticancerígenos o inhibidores de las quinasas dependientes de ciclina (del inglés *cyclin-dependent kinase inhibitor*, CDKis) (abemaciclib o palbociclib) (55) y en el segundo tipo cobran protagonismo los agentes oxidativos como H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> o productos oxidantes que dependiendo de la dosis promueven senescencia o apoptosis (56).

- **Senescencia inducida por oncogenes (OIS del inglés *Oncogene-induced senescence*)**. Diferentes estímulos oncogénicos pueden inducir un estado de senescencia actuando por diferentes vías. La sobreexpresión del oncogen Ras durante los periodos iniciales de hiperproliferación daña el ADN (57) y desencadena la activación de otros efectores moleculares para provocar la detención del ciclo celular. Por diferentes cascadas, el oncogén Ras actúa sobre las proteínas ARF (*Alternate Reading Frame* perteneciente al locus CDKN2a) y ATM (*Ataxia telangiectasia mutated*) y sobre el oncogén BRAF<sup>V600E</sup> activando a dianas comunes de senescencia como p53 y p16<sup>INK4a</sup>. Este último oncogén además está implicado en el aumento de la expresión de IL-6 e IL-8, citoquinas secretadas por las células senescentes (58). La pérdida del *tumor supresor phosphate and tensin* en el cromosoma 10 (PTEN) induce senescencia a través de las quinasas AKT (*Protein kinase B*) y de *mammalian Target of Rapamycin* (mTOR) (cascada PTEN-PI3K-AKT-mTOR) confluyendo en la activación de los CDKis e inhibiendo la proliferación celular (59).

- **Senescencia asociada al fenotipo secretor (*Senescence-associated secretory phenotype* SASP)**. Uno de los aspectos que caracteriza a la senescencia celular es la secreción de factores y la reactivación de la expresión de múltiples genes pro-inflamatorios en muchos tipos celulares. Esto da nombre a la *Senescence-associated secretory phenotype* conocida con las siglas SASP o también con el término de *Senescence-messaging secretome* (60). Este tipo de senescencia está definida por la capacidad que presentan las células senescentes de expresar y de secretar una variedad de moduladores extracelulares que incluyen citoquinas, quimioquinas, proteasas y factores de crecimiento (61).

Las células senescentes tienden a acumularse en los tejidos con el envejecimiento, son metabólicamente activas y con la producción de estos factores y enzimas que degradan la matriz extracelular se promueve el desarrollo de un estado de inflamación crónica conocido con el término de *inflammaging*. El ambiente inflamatorio es una de las características propias del SASP y su presencia altera la estructura tisular y la función celular potenciando el proceso de envejecimiento (62). Esta relación recíproca está implicada en el desarrollo de patologías relacionadas con

el envejecimiento como el cáncer, aterosclerosis, enfermedad de Alzheimer y artrosis.

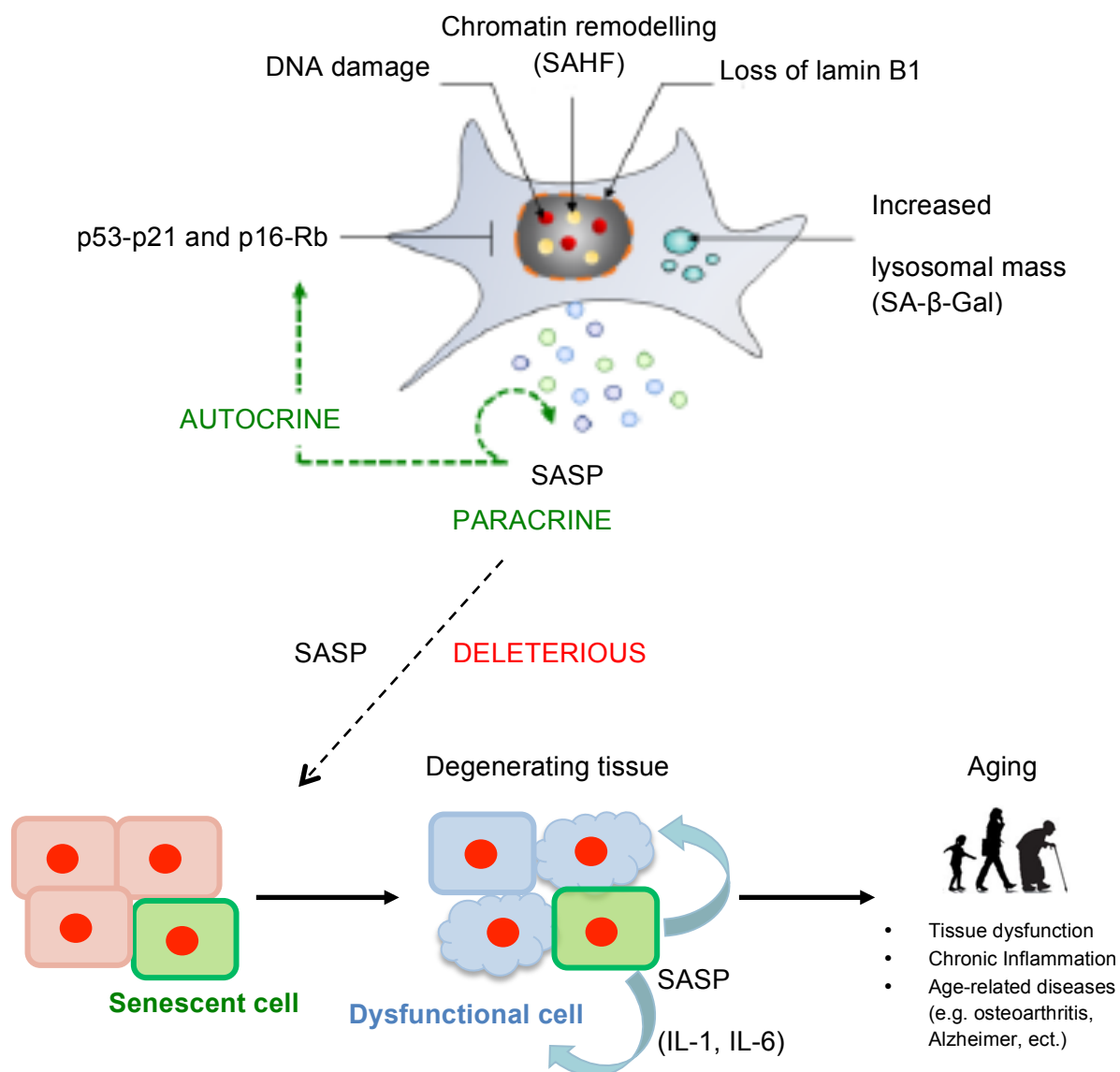
En la artrosis los cambios asociados al envejecimiento como el estado de *inflammaging* y el incremento de los componentes del SASP promueven el desarrollo de esta patología provocando un estado catabólico acompañado de la destrucción del tejido articular y un defecto en su reparación por daños en la matriz (63, 64).

Los factores que acentúan el fenotipo pro-inflamatorio de las células senescentes y que agravan la homeostasis del tejido fueron divididos por *Coppé et al.* (65) en factores solubles, proteasas, factores solubles no proteicos y factores insolubles. Por otro lado, *Freund et al.* (63) los clasificaron según sus niveles secretados. Los factores SASP producidos a niveles altos e intermedios por las células senescentes y encontrados en tejido artrósico y en fluido sinovial se resumen en la **Tabla 1**.

Tabla 1. Factores SASP secretados por células senescentes en tejido artroscico y fluido sinovial

<b>Factores SASP – Niveles altos</b>	<b>Naturaleza de los factores</b>
<b>GM-CSF</b>	Factores solubles - Quimioquina
<b>GRO<math>\alpha,\beta,\gamma</math></b>	Factores solubles - Quimioquina
<b>IGFBP-7</b>	Factores solubles – Factor de crecimiento
<b>IL-1<math>\alpha</math></b>	Factores solubles - Interleuquina
<b>IL-6</b>	Factores solubles - Interleuquina
<b>IL-7</b>	Factores solubles - Interleuquina
<b>IL-8</b>	Factores solubles - Interleuquina
<b>MCP-1</b>	Factores solubles - Quimioquina
<b>MCP-2</b>	Factores solubles - Quimioquina
<b>MIP1<math>\alpha</math></b>	Factores solubles - Quimioquina
<b>MMP-1</b>	Factores solubles - Proteasas
<b>MMP-10</b>	Factores solubles - Proteasas
<b>MMP-3</b>	Factores solubles - Proteasas
<b>Factores SASP – Niveles intermedios</b>	<b>Naturaleza de los factores</b>
<b>ICAM-1</b>	Factores solubles - Proteasas
<b>IL-1 <math>\beta</math></b>	Factores solubles - Interleuquina
<b>MCP-4</b>	Factores solubles - Quimioquina
<b>MIF</b>	Factores solubles – Otros factores pro-inflamatorios
<b>MMP-13</b>	Factores solubles - Proteasas
<b>Oncostatin M</b>	Factores solubles – Otros factores pro-inflamatorios
<b>RANTES</b>	Factores solubles - Quimioquina
<b>TIMP-2</b>	Factores solubles - Proteasas

Es muy característico que los componentes del SASP transmitan senescencia a las células vecinas no senescentes, un fenómeno conocida como senescencia paracrina causando un efecto dañino y alterando la homeostasis del tejido (66) (67).



**Figura 8. Potencial dañino de los factores SASP que secretan las células senescentes.** Con la edad se incrementa el número de células senescentes y como consecuencia se potencia la secreción de factores bioactivos. Estos factores pueden alterar o inhibir la capacidad funcional de las células vecinas, se provoca más daño y se promueve un estado catalítico de la estructura tisular. (Modificado de (68, 69).

La regulación del SASP se produce en múltiples niveles. Numerosos estímulos inducen senescencia celular lo que promueve la activación de una red de vías interconectadas que convergen en la activación de factores de transcripción necesarios para la expresión de los genes SASP que codifican a los factores pro-inflamatorios que posteriormente serán secretados (63, 68) (**Figura 9**)

Hay dos principales factores de transcripción que permiten la activación del SASP en respuesta a los inductores de senescencia: C/EBP y NFκB:

- **NFκB.** Está considerado como el principal regulador de la expresión del ARNm de la mayoría de los factores SASP (IL-6, IL-8, CXCL1, GM-CSF, ICAM-1) en varios tipos de senescencia como la replicativa, la inducida por radiación ionizante o la inducida por oncogenes (61, 68).

En condiciones normales, NFκB está inhibido debido a su interacción con IκB en el citoplasma celular lo que previene su translocación nuclear. En cambio, en respuesta a estrés, la quinasa IκappaB (IKK) desencadena la degradación de IκB lo que permite la acumulación nuclear y la activación de NFκB. Además, p65 ó RelA , subunidades de este factor de transcripción, juegan un papel importante en su función ya que varios estudios muestran que la depleción génica de las mismas reduce la expresión de algunos componentes pro-inflamatorios del SASP (70, 71).

A su vez, el SASP es regulado por otros mecanismos moleculares como p38MAPK, GATA4 (72), IL-1α y microARNs que contribuyen a la senescencia activando el factor de transcripción NFκB y por consiguiente modulando la expresión de citoquinas pro-inflamatorias propias del SASP (IL-1, IL-6, IL-8, TNFα) (63, 68, 73).

- **C/EBP.** Es un factor de transcripción perteneciente a la familia *CCAT/Enhancer Binding Protein* que presenta seis isoformas: C/EBPα, β, γ, δ, ε y ζ. Se ha demostrado que la isoforma C/EBPβ es la que participa en la regulación de muchas citoquinas y factores que contribuyen al SASP tales como IL-1β, IL-8, IL-6 y quimioquinas como GROα y NAP2 (61). Además otros estudios demostraron que existe sobre-expresión de C/EBPβ en la senescencia inducida por oncogenes y un aumento en la unión al promotor de IL-6 (58).

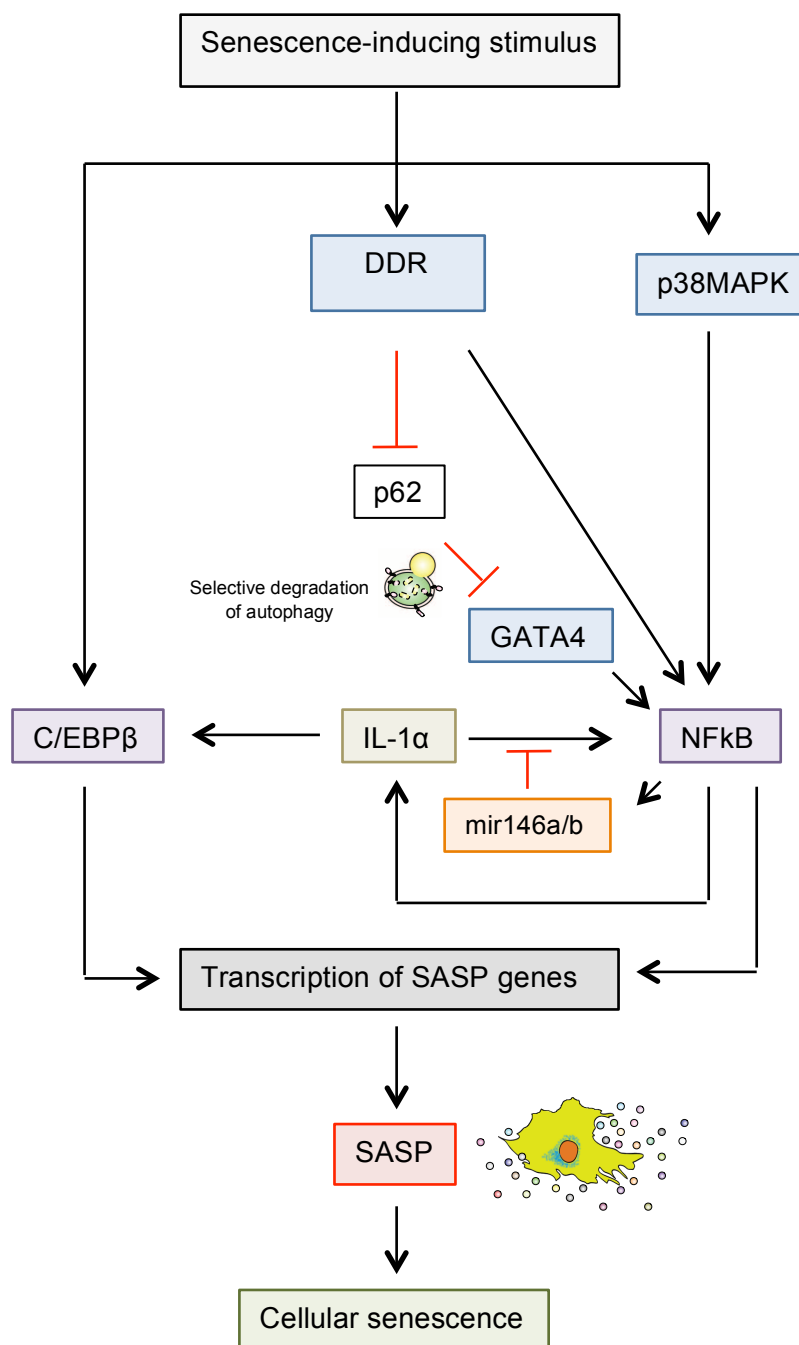


Figura 9. Vías que regulan el SASP a nivel transcripcional en respuesta a inductores de senescencia (Modificado de (63, 72))

## 5.2. Marcadores de senescencia

Identificar y caracterizar las células senescentes es una tarea compleja debido a la no existencia de marcadores específicos con los que detectar todos los programas que desencadenan la senescencia, existiendo variación en la expresión de cada uno de ellos dependiendo del tipo celular. *Hernández-Segura et al.* (45) engloban en dos

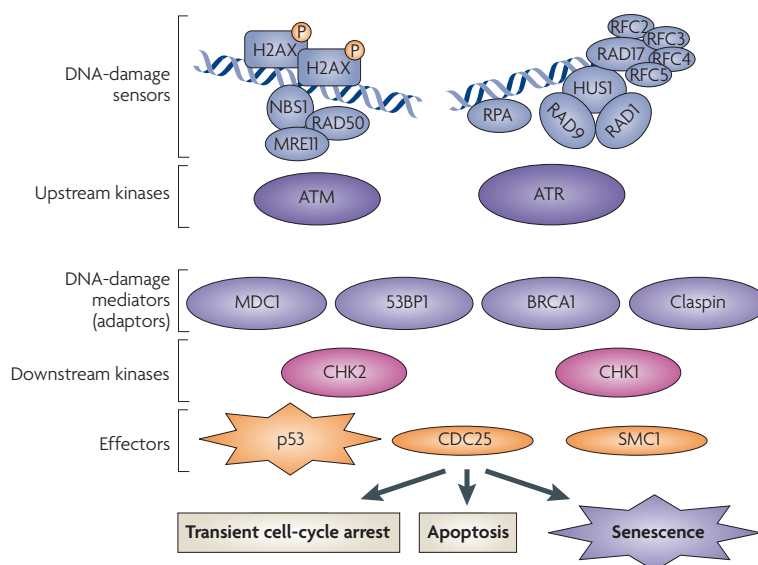
grupos los principales marcadores para estudiar este proceso: vías de señalización y alteraciones morfológicas.

### 5.2.1. Vías de señalización como marcadores de senescencia

- **Respuesta al daño en el ADN (DDR).** La activación de la senescencia a través de estresores genotóxicos, acortamiento y disfunción telomérica, fármacos citotóxicos, radiación, activación de oncogenes y estrés oxidativo dañan el ADN. Como respuesta a ello las células activan una cascada de eventos que se conoce como respuesta al daño en el ADN cuya finalidad es coordinar su reparación e inhibir la proliferación celular. Si el daño persiste las células pueden entrar en apoptosis o en senescencia (71, 74). Los marcadores de la DDR son proteínas que participan en dicho proceso de reparación y que están presentes en las células senescentes.

Cuando el daño es detectado, varios complejos proteicos activan las proteínas quinasas ATM y ATR (*ATM and Rad-3 related*) y se desencadena la fosforilación de la histona H2AX ( $\gamma$ H2AX). En el proceso también participan otras proteínas mediadoras del daño conocidas como adaptadoras, entre las que se incluyen MDC1, 53BP1, BRCA1 y Claspin, que intervienen en organizar el reclutamiento de proteínas que responden al daño y en la función de proteínas quinasas como las CHK1 (*Checkpoint-1*) y CHK2 (*Checkpoint-2*). Estas últimas propagan la señal del daño hacia los efectores moleculares p53, CDC25 y SMC1 los cuales median la respuesta al daño a través de la detención temporal de la progresión del ciclo celular ó bien por procesos de senescencia ó de apoptosis (69).





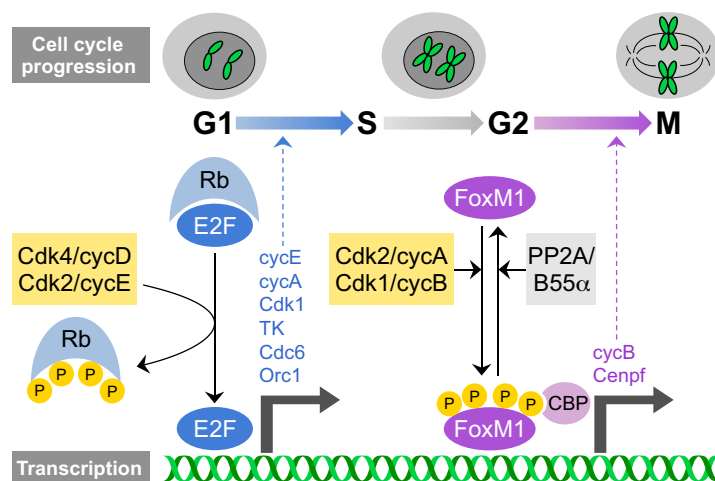
**Figura 10. Representación de la respuesta al daño en el ADN.** El daño es detectado por sensores proteicos y la señal es transducida por proteínas adaptadoras hacia los efectores, los cuales median la respuesta celular del daño (69).

#### - Detención del ciclo celular e inhibidores de quinasas dependientes de ciclina.

En el control de la proliferación celular juegan un papel importante las quinasas dependientes de ciclina (del inglés *cyclin-dependent kinase*, CDKs), quinasas serina/treonina formadas por la asociación entre la subunidad catalítica CDK y la subunidad reguladora ciclina que proporciona dominios esenciales para la actividad enzimática. Las células humanas contienen más de 20 CDKs y 29 ciclinas implicadas en múltiples funciones como la regulación del ciclo celular, siendo una de las más importantes por su relación con el proceso de senescencia (75-77).

Las dos vías que controlan la proliferación celular son la vía Rb/E2F y la vía FoxM1. En la ruta Rb/E2F, Rb hace referencia a las proteínas del retinoblastoma que en condiciones fisiológicas están fosforiladas por los complejos Cdk4/6-Ciclina D y Cdk2-Ciclina E que activan al factor de transcripción E2F permitiendo la activación de los genes necesarios para promover la fase S del ciclo celular y sintetizar el ADN (78). La otra vía que regula el ciclo celular y se encarga de controlar el cambio de fase G2 a fase M es la ruta FoxM1. FoxM1 es un miembro de la familia de los factores de transcripción *forkhead box* (Fox). Es fosforilado por los complejos Cdk2-Ciclina A y Cdk1-Ciclina B que conducen a su autoinhibición y al reclutamiento de un co-activador transcripcional, la histona deacetilasa *p300/CREB binding protein* (Ep300/Crebbp). Este complejo activa la expresión de los genes responsables de la ejecución de la fase

de mitosis. Para evitar la activación prematura de las Cdks sobre FoxM1, la fosforilación de FoxM1 puede estar revertida por la fosfatasa 2A (PP2A) y su unidad reguladora B55 $\alpha$  (76).



**Figura 11. Los complejos Cdk/Cyclin regulan la progresión del ciclo celular.** Durante la fase G1 los complejos Cdk4-Ciclina D y Cdk2-Ciclina E fosforilan la proteína RB conduciendo a la activación de las proteínas E2F y se permite la activación de los genes necesarios para promover la fase G1/S. Durante la fase G2/M los complejos Cdk2-Ciclina A y Cdk1-Ciclina B fosforilan a FoxM1 y se activan los genes reguladores de la fase M (76).

La vía más estudiada en la detención del ciclo celular es la vía Rb/E2F. Su desregulación es provocada por los CDKs que se subdividen en dos clases según su estructura y especificidad. La familia Ink4 está formada por cuatro miembros: p16<sup>INK4a</sup>, p15<sup>INK4b</sup>, p18<sup>INK4c</sup> y p19<sup>INK4d</sup> cuyas dianas son Cdk4 y Cdk6. La familia Cip/Kip está constituida por tres miembros, p21<sup>Cip1</sup>, p27<sup>Kip1</sup>, p57<sup>Kip2</sup>, que interfieren con las actividades de los CDKs acoplados a las ciclinas D, E, A y B (76). Los CDKs encargados de hipofosforilar Rb y como consecuencia bloquear a E2F son p16<sup>INK4a</sup> y p21<sup>CIP</sup>, ambos constituyen las dos principales vías responsables de provocar senescencia a través de la detención del ciclo celular (69).

- **Vía p16<sup>INK4a</sup>-pRb.** La proteína p16<sup>INK4a</sup> está codificada por el gen CDKN2A e inhibe las quinasas dependientes de ciclina CDK4 y CDK6. Son varios los inductores que actuando tanto a nivel epigenético como a nivel de estabilización proteica desencadenan un aumento de los niveles de p16<sup>INK4a</sup>. Entre los cambios epigenéticos presentan especial repercusión la demetilación del promotor p16<sup>INK4a</sup> a consecuencia de la inhibición de la metil transferasa del DNA (DNMT1) (79), activaciones transcripcionales del promotor de p16<sup>INK4a</sup> por acción de los factores

Sp1, Ets y AP1 (45, 80, 81) y la modificación de las histonas en el locus CDKN2A por los complejos del grupo Polycomb, que al ser represores directos de p16<sup>INK4a</sup> en células proliferativas su inactivación en células senescentes provoca una sobreexpresión de este inhibidor (82). Otros estímulos como el acortamiento telomérico, el estrés oxidativo, el daño en el ADN y la activación de oncogenes como el Ras también se consideran desencadenantes de la sobreactivación de p16<sup>INK4a</sup> ejerciendo como papel fisiológico la detención del ciclo celular.

- **Vía p53-p21<sup>CIP1</sup>-pRB.** La proteína p21<sup>CIP1</sup> está codificada por el gen CDKN1A e inhibe el complejo Cdk2-Ciclina E. La expresión de p21<sup>CIP1</sup> está regulada por la activación de la vía p53, otro regulador importante en programas de senescencia. La proteína supresora de tumor p53 está codificada por el gen TP53 y desempeña un papel fundamental en el proceso de senescencia. Su activación tiene lugar como respuesta al daño generado en el ADN por diferentes estímulos y es regulada en diferentes puntos de la cascada por las proteínas HDM2 y ARF. Su principal diana transcripcional es el CDKi p21<sup>CIP1</sup>, el cual actuará sobre la forma fosforilada RB.
- **Fenotipo secretor asociado a senescencia (*Senescence-Associated Secretory Phenotype SASP*).** El SASP desempeña una importante función en la actividad patofisiológica de las células senescentes por lo que puede ser clasificado como programa de senescencia o como marcador de este proceso (*ver apartado 5.1*).
- **Resistencia a la muerte celular por apoptosis.** Las células senescentes presentan la característica de ser resistentes a la apoptosis y muestran un incremento de la expresión de las vías de supervivencia (*Senescent Cell Anti-apoptotic Pathways SCAPs*) en las que participan los receptores efrina y sus ligandos EFNB1 ó EFNB3, PI3Kδ, p21, BCL-XL y el inhibidor del activador de plasminógeno 2 (PAI-2). Recientes estudios demostraron que al actuar selectivamente sobre los componentes de los mecanismos de supervivencia se provocaba la muerte de las células senescentes sin afectar a la proliferación de las no senescentes (83). Los receptores Efrina y sus ligandos pertenecen a la familia de las tirosín quinasas. Median contacto entre célula-célula a través de la interacción con los ligandos presentes en su superficie y controlan la morfología celular, la adhesión, proliferación, supervivencia y diferenciación (84). En células cancerosas, al silenciar la efrina EFNB3 se induce apoptosis y disminuye la regulación sobre Akt. Sobre esta quinasa también actúa otro componente de las vías de supervivencia, la enzima PI3K, a través de la vía PI3K-Akt-mTOR. PI3K activa a Akt y Akt ejerce una activación sobre mTOR y una inhibición sobre FOXO1, ambos reguladores de la homeostasis (85). A través de la proteína supresora de tumores p53

tiene lugar la activación de p21 que provoca una detención del ciclo celular y las células entran en un estado de senescencia que les confiere resistencia a la muerte celular vía JNK y caspasas (86, 87). La familia proteica BCL-2 también juega un papel en la regulación de la muerte celular por diversos mecanismos, incluyendo apoptosis y autofagia (88). Algunos miembros de la familia son las proteínas BCL2, BCL-W, Bcl-XL y MCL-1. Estudios recientes identificaron que el incremento de BCL-W y Bcl-XL estaban incrementados en células senescentes resistentes a la muerte celular por apoptosis y que dichas células se podrían eliminar bloqueando las proteínas anti-apoptóticas (89).

### 5.2.2. Alteraciones morfológicas como marcadores de senescencia

El fenómeno de senescencia celular está activado por diferentes estímulos y no sólo implica la detención de la división celular sino que va acompañado de otros fenómenos provocando cambios fenotípicos utilizados como marcadores de senescencia para su posterior identificación tanto *in vitro* como *in vivo* (Figura 12).

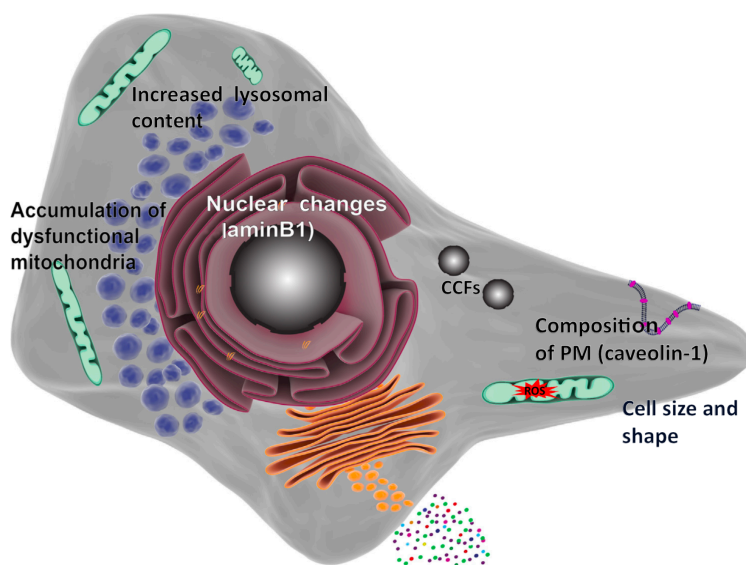


Figura 12. Alteraciones morfológicas de las células senescentes (45).

- **Incremento del contenido lisosomal.** Un biomarcador ampliamente utilizado para detectar senescencia en células es la actividad de la enzima  $\beta$ -galactosidasa asociada a senescencia (del inglés *Senescence associated  $\beta$ -Galactosidase*, SA- $\beta$ -Gal). Kurt *et al.* (90) observaron en cultivos celulares sometidos a más pases celulares y por tanto más senescentes que presentaban un incremento de la actividad enzimática  $\beta$ -

galactosidasa lisosomal debido a un aumento del número y contenido de lisosomas permitiendo su detección a pH=6.

Para explicar el origen lisosomal de la enzima  $\beta$ -galactosidasa que da nombre a un tipo de senescencia, evidencias genéticas proporcionaron información sobre el gen *GLB1*, el cual codifica a esta enzima. Células senescentes obtenidas de senescencia replicativa o inducida presentaban una acumulación de *GLB1* tanto a nivel de ARNm como proteico (91).

La proteína que sustenta la actividad de SA- $\beta$ -gal es la  $\beta$ -D-galactosidasa detectada en condiciones normales a pH=4. Cuando las células se vuelven senescentes y se incrementa la biogénesis lisosomal elevando el pH a 6 se alcanza un índice de alcalinidad adecuado para cuantificar el incremento de la actividad  $\beta$ -galactosidasa. El primer método de detección fue citoquímico y usó el sustrato cromogénico *5-bromo-4-chloro-3-indoyl  $\beta$ -D-galactopyranoside* (X-gal) que se anclaba a la enzima. El segundo método incluyó en un primer paso el empleo de inhibidores lisosomales como Cloroquina o Bafilomicina A1 para verificar el origen lisosomal de la SA- $\beta$ -gal concentrando en un ambiente básico estos orgánulos. El sustrato fluorescente utilizado fue *5-dodecanoylaminofluorecein di- $\beta$ -D-galactopyranoside* ( $C_{12}$ FDG) que también presentaba la capacidad de unirse a la enzima (92).

Aunque SA- $\beta$ -gal es un marcador ampliamente utilizado en estudios de senescencia celular no es específico de este fenómeno, por lo que la validación de este proceso se debe confirmar evaluando los niveles de otros marcadores.

**- Forma y tamaño celular.** Las células senescentes *in vitro* presentan cambios en su morfología llegando a ser más largas, aplanadas, engrosadas o multinucleadas. Su fenotipo depende del tipo de estímulos que inducen senescencia (93). Un contribuidor a la alteración de la forma celular asociada a la senescencia es la pérdida de integridad estructural del citoesqueleto, principalmente por los cambios en los filamentos de actina (94, 95). Asimismo, el crecimiento y el tamaño celular están regulados por varias cascadas de señalización siendo la mejor caracterizada la activación de la vía IGF/PI3K/AKT/mTOR. El mediador principal es mTORC1 que promueve múltiples procesos biológicos como la captación de nutrientes, la biosíntesis de lípidos y modula el metabolismo celular para promover la biogénesis. Está implicado en el proceso de autofagia actuando como un inhibidor de esta vía y actúa negativamente sobre la vía del receptor IGF para controlar la homeostasis del tamaño celular (45, 96).

- **Cambios en la arquitectura nuclear.** La organización dentro de los núcleos es importante para mantener una estabilidad celular ya que los defectos en la lamina nuclear pueden causar inestabilidad genómica. La deformación de la arquitectura nuclear podría ser una importante causa de senescencia celular. Mutaciones en los genes que codifican las proteínas de esta envoltura causan laminopatías que derivan en enfermedades de envejecimiento prematuro como el Síndrome de Hutchinson-Gilford (HGPS) (43).

El mecanismo molecular responsable del HGPS está activo en las células sanas que al sufrir un proceso de envejecimiento fisiológico adquieren defectos similares a los que tienen las células que sufren una inestabilidad genómica de la envoltura nuclear como modificaciones en las histonas e incremento del ADN dañado que resulta en un incremento de la sensibilidad de especies reactivas de oxígeno conduciendo a daño oxidativo (94, 97).

- **Composición de la membrana plasmática.** Durante la senescencia celular las células experimentan cambios en la composición proteica de la membrana plasmática lo que permite incorporar una nueva estrategia para identificar marcadores asociados con el proceso de senescencia.

La proteína de la membrana plasmática más estudiada en este tipo de alteración morfológica es la Caveolin-1. Su expresión se encuentra aumentada en las células senescentes, participa en la vía de la quinasa p38MAPK (98, 99) e incrementa la actividad de p53 a través de la ATM, los cuales son efectores positivos de múltiples estímulos en el proceso de senescencia (100, 101). En cambio, una deficiencia de esta proteína está relacionada con la senescencia prematura vía disfunción mitocondrial e inactivación de SIRT-1 (102).

Otras proteínas pertenecientes a la membrana plasmática y que experimentan cambios en las células senescentes son DEP1, B2MG y la forma oxidada de vimentina (45).

- **Acumulación de mitocondria.** Las células senescentes presentan un incremento del número de mitocondrias disfuncionales debido a que el proceso de reciclaje propio de estas organelas conocido con el nombre de mitofagia está alterado lo que contribuye a un tipo de senescencia asociada con la disfunción mitocondrial (del inglés *Senescence-associated mitochondrial dysfunction*, SAMD) (103).

La disfunción mitocondrial es un marcador del envejecimiento (43) y está ligada a la senescencia celular a través de la fosforilación de ATM y de la vía Akt/mTORC1. Se conocen por ser efectores que integran señales de la DDR promoviendo la activación

transcripcional del regulador de la biogénesis mitocondrial PGC-1 $\beta$ , contribuyen a la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y participan en la detención del ciclo celular. La producción de ROS mantiene la activación de las DDR lo que estabiliza la senescencia celular y el fenotipo pro-oxidante e inflamatorio (**Figura 13**) (104, 105). La degradación de las mitocondrias dañadas está mediada por *PTEN-induced putative protein kinase 1* (PINK1) y por la E3 ubiquitin-protein ligase Parkin. En las patologías relacionadas con el envejecimiento existe una pérdida de los genes *Pink1* y *Parkin* por lo que son los marcadores empleados para estudiar el proceso de mitofagia característico de la senescencia asociada a la disfunción mitocondrial.

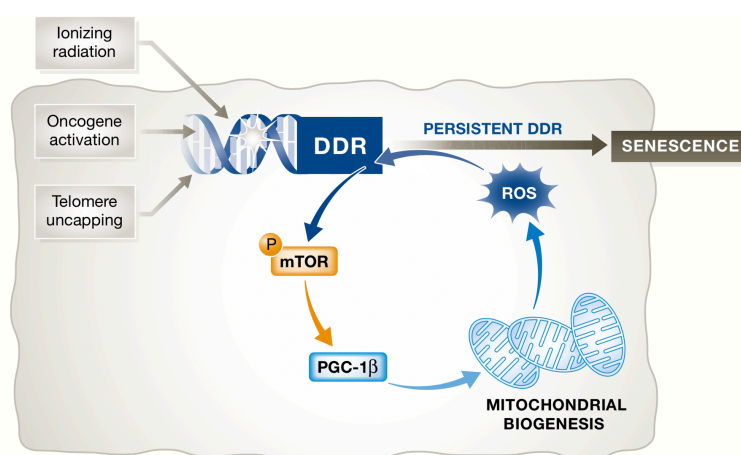


Figura 13. Representación de la participación de la mitocondria en el proceso de senescencia (104)

## 6. LA AUTOFAGIA

### 6.1. Definición de autofagia

La autofagia es un proceso catabólico que se conservó a lo largo de la evolución de los eucariotas y cuya respuesta funcional se centra en envolver el material citoplasmático (proteínas y organelas) y entregarlo a los lisosomas para su degradación con el posterior reciclaje en forma de aporte energético (106-108). La importancia de dicho proceso hizo que en 2016 Yoshinori Ohsumi recibiese el Premio Nobel de Medicina por la identificación temprana y caracterización de la maquinaria autofágica, en particular de los “*AuTophagy-related genes*” (ATG) en levaduras (109-111).

La autofagia ejerce un papel fundamental en muchas funciones biológicas. Su activación no sólo depende de la respuesta hormonal o falta de nutrientes, sino que este mecanismo está implicado en múltiples procesos, como en el control de calidad

de proteínas y organelas, en la respuesta celular al estrés, en el desarrollo, en la supresión de la tumorigénesis, en la eliminación de patógenos o en el envejecimiento. Debido a su participación en muchas funciones celulares, un defecto de este mecanismo se ha observado en diferentes enfermedades relacionadas con el envejecimiento, como las enfermedades neurodegenerativas, cardiovasculares, y metabólicas, en el cáncer o en enfermedades del sistema músculoesquelético, como la artrosis (109, 112, 113).

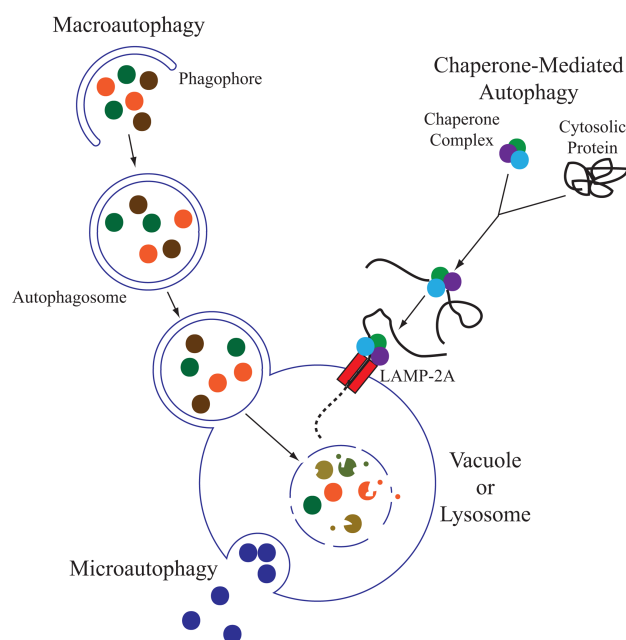
La autofagia junto con el sistema ubiquitín-proteasoma forman las dos vías proteolíticas que contribuyen al mantenimiento de la homeostasis celular. Todas las células dependen de estos mecanismos para controlar la calidad de sus proteínas y organelas y garantizar la eliminación o reparación de componentes intracelulares dañados (114, 115). La principal diferencia entre ambos sistemas radica en sus productos finales. El sistema ubiquitín-proteasoma resulta en péptidos cortos (8-12 residuos) y la degradación lisosomal cataboliza polipéptidos en sus correspondientes aminoácidos aprovechando dicha degradación para reacciones metabólicas o procesos de reparación (109).

## 6.2. Tipos de autofagia

Los mecanismos de entrega de la carga a los lisosomas varían en función de la naturaleza y estructura de las moléculas que cruzan la bicapa lipídica de los lisosomas dando nombre a los tres tipos de autofagia: Macroautofagia, Microautofagia y Autofagia Mediada por Chaperonas (CMA) (113, 116, 117).

- **La Macroautofagia.** Es el principal sistema de degradación de los componentes intracelulares de la propia célula (118). Su inicio tiene lugar cuando el fagóforo, una estructura formada a partir de la generación *de novo* de la membrana, secuestra las porciones del citosol para ser degradadas. Éste se elonga, se sella y se forman los autofagosomas, que son vesículas de doble membrana que se fusionan con los lisosomas para originar los autolisosomas, los cuales contienen las enzimas lisosomales encargadas de degradar la carga secuestrada (119, 120).
- **La Microautofagia.** Los componentes citoplasmáticos secuestrados son entregados vía invaginación directa de la propia membrana lisosomal formando vesículas en el lumen lisosomal (119, 120).
- **La Autofagia Mediada por Chaperonas (CMA).** Se necesita de un complejo proteico (complejo chaperona) para que el material citosólico entre en los lisosomas sin requerir de la formación de vesículas o deformación de la membrana (119, 120).





**Figura 14. Tres principales tipos de autofagia (113)**

La mayoría de los autores utilizan el término de autofagia para referirse a la Macroautofagia, la cual puede ser selectiva y no selectiva. La autofagia no selectiva implica la captación aleatoria de componentes citoplasmáticos iniciando el secuestro en los fagóforos como respuesta celular a la ausencia de nutrientes. En cambio, la autofagia selectiva es responsable de la eliminación específica de ciertas organelas endógenas como la mitocondria (mitofagia), peroxisomas (pexofagia), retículo endoplasmático (reticulofagia), fragmentos nucleares (nucleofagia), lisosomas (lisofagia), ribosomas (ribofagia), acúmulos lipídicos (lipofagia), agregados proteicos (agrefagia), proteína ferritina (ferritinofagia), glicógeno (glicofagia) y de sustratos exógenos como virus y bacterias (xenofagia viral y bacteriana) como resultado a la respuesta inmune (109, 121).

Los estudios realizados en esta Tesis Doctoral se centraron en la contribución del sistema lisosomal a través de la autofagia y en concreto a través de la Macroautofagia para mantener la homeostasis celular y tisular en el cartílago articular.

### **6.3. Maquinaria autofágica**

La maquinaria molecular que ejecuta y regula la autofagia está controlada por los genes Atg, los cuales son imprescindibles en cada una de las fases que engloban este proceso. Originalmente se identificaron más de 30 genes Atg en levaduras que en su mayoría conservan secuencias ortólogas en los mamíferos (119, 122, 123).

La respuesta eficiente de la autofagia se consigue completando una secuencia de cinco etapas: iniciación, nucleación, elongación, maduración y degradación. A continuación se detallan cada una de las fases de la vía de señalización.

1. **Etapa de iniciación.** El inicio del proceso está marcado por la participación del complejo quinasa *serine/threonine Uncoordinated-51-Like Kinase 1* (ULK1). Consiste en un ensamblaje multiproteico formado por Atg13, Atg101, ULK1 y *Family Interacting Protein of 200 KDa* (FIP200) también conocida como *RB1 inducible coiled-coil 1*. Dentro de este complejo ocurren reacciones de fosforilación y defosforilación de estas unidades proteicas (124) resultando en el paso inicial para la biogénesis del autofagosoma. El complejo ULK1 es diana de las enzimas mTOR y AMPK, las cuales regulan el inicio del proceso de autofagia tras su inhibición y activación, respectivamente. Entre los inhibidores de mTOR destacan la deprivación de nutrientes, Rapamicina y Torin1. En cuanto a los activadores de AMPK el más importante es la Metformina (112, 119, 125).
  
2. **Etapa de nucleación y formación del fagóforo.** Está controlada por el complejo *Class III phosphatidylinositol 3-kinase* (PI3K III), el cual está formado por Beclin 1, *phosphatidylinositol 3-kinase catalytic subunit type 3* (PIK3C3) también conocida como *Vesicular Protein Sorting 34* (VPS34), la *phosphoinositide-3-kinase regulatory subunit 4* (PI3KR4) también conocida como VPS15, el sensor de la curvatura de la membrana Atg14 y el *nuclear receptor binding factor 2* (NRBF2) (126). Durante la activación, la interacción entre VPS34 y Beclin 1 promueve su actividad catalítica e incrementa los niveles del sustrato *phosphatidylinositol triphosphate* (PtdIns3p ó PI3P), el cual es una molécula esencial para reclutar otras proteínas Atg y efectores específicos de autofagia como *WD-repeat-interacting phosphoinositide proteins* (WIPI) y *double FYVE domain-containing protein 1* (DFCP1), necesarios para la nucleación del fagóforo (117, 123, 127-129).
  
3. **Etapa de elongación y secuestro de la carga citoplasmática.** La elongación del fagóforo es mediada por dos sistemas de conjugación, Atg12 y *Microtubule-Associated Protein 1 Light Chain 3 beta* (LC3 ó MAP1LC3B), un homólogo de la proteína Atg8 en levaduras. Otro participante importante en la expansión es la proteína transmembrana Atg9 (124).
  - **Sistema de conjugación Atg12.** Consiste en la formación del complejo Atg12-Atg5-Atg16L situado en la parte externa de la membrana de aislamiento y asociado a la extensión del fagóforo. Su creación tiene lugar

cuando la proteína Atg12 es activada ATP dependiente por Atg7 (homólogo a la enzima ubiquitina E1) y es trasladada a Atg10 (homólogo a la enzima ubiquitina E2) para formar el complejo Atg12-Atg5. Finalmente, éste se conjuga con el dímero Atg16L dando lugar a Atg12-Atg5-Atg16L seguido de una dimerización e interacción con el complejo *PI3P-binding* sintetizado en la etapa anterior (123, 125, 130, 131).

- **Sistema de conjugación LC3.** La activación de este sistema necesita de la contribución del complejo Atg12-Atg5-Atg16L (*E3-like ligase*) para promover la conjugación de LC3 (129). Para ello, tras la inducción de la autofagia, la forma no procesada de LC3 es escindida proteolíticamente por Atg4 creando la forma soluble y citosólica LC3-I, la cual se conjuga con *phosphatidylethanolamine* (PE) para formar LC3-II que es incorporado a las membranas pre-autofagosomal y autofagosomal (parte externa e interna) pudiendo interactuar con los receptores de la carga como el *sequestosome 1/p62-like family proteins* (p62/SQSTM1) (130). En esta fase de lipidación se requiere de la participación de otras proteínas Atg como son las Atg7 y Atg3. Las proteínas LC3-II de la membrana externa de los autofagosomas son eliminadas por Atg4 a través de la escisión de PE devolviéndolas al citosol para reusarlas. Por otro lado, LC3-II situada en la parte interna se digiere con la carga proporcionando un marcador ampliamente usado en la identificación de los autofagosomas en las células (123, 125, 129).
4. **Etapa de maduración ó formación de autolisosomas.** Una vez que los autofagosomas secuestraron la carga se fusionan con los lisosomas para formar los autolisosomas, vesículas autofágicas de una sola membrana. La maquinaria molecular responsable de regular esta unión engloba una serie de proteínas como las presentes en el complejo PI3K III de la etapa de nucleación a excepción de la Atg14 que es reemplazada por *UV radiation resistance associated gene protein* (UVRAG), las proteínas *N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptors* (SNAREs), las proteínas Rab, pequeñas GTPases pertenecientes a la familia del oncogén Ras, el efector proteico de RAB7 (*Pleckstrin homology domain containing protein family receptor 1*, PLEKHM1) que interactúa directamente con el *homotypic fusion and vacuole protein sorting complex* (HOPS) y facilita la fusión entre la membrana autofagosomal con la lisosómica a través de la unión LC3 y Rab7/HOPS. La etapa de formación de autolisosomas puede ser inhibida por moléculas como la Cloroquina ó la Bafilomicina A1. Esta última además de intervenir a este nivel

del proceso autofágico actúa en la etapa anterior bloqueando la fusión entre autofagosomas con los lisosomas (109, 117, 119, 130, 132).

- 5. Etapa de degradación.** La degradación autolisosomal es la última fase del proceso autofágico. Los lisosomas son organelas con una membrana limitante compuesta por una bicapa monolípida. Contienen varias enzimas hidrolasas (proteasas, lipasas, glicinas y nucleotidasas) (114) encargadas de degradar el material celular y que presentan un lumen ácido ( $\text{pH}=5$ ) cuya generación y mantenimiento requiere de la actividad de la bomba de protones ATP-dependiente comúnmente conocida con el nombre de *V-type ATPase*. Como resultado de la fragmentación de la carga se generan sus componentes individuales, aminoácidos, ácidos nucleicos, ácidos grasos libres, colesterol, azúcares, etc. que son reciclados hacia el citoplasma para ser usadas por las células en reacciones anabólicas o procesos de reparación (133).

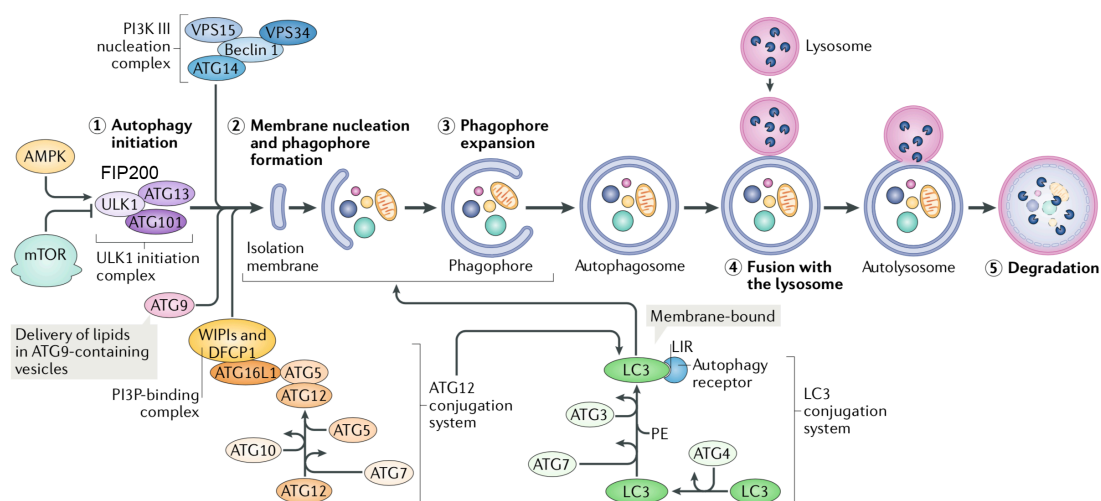


Figura 15. Proceso de la autofagia (125)

#### 6.4. Regulación de la autofagia

La autofagia es un proceso de regulación dinámica con baja actividad en condiciones basales. La falta de nutrientes u otras señales fisiológicas como las hormonales, factores de crecimiento e infecciones a patógenos se consideran inductores del proceso. El principal regulador de la señalización de nutrientes es mTOR, proteína sobre la que convergen las señales de los aminoácidos, factores de crecimiento e insulina (106).

mTOR es una quinasa serina/treonina que pertenece a la familia de quinasas *phosphoinositide 3-kinase* (PI3K) y forma dos complejos denominados mTOR *Complex 1* (mTORC1) y mTOR *Complex 2* (mTORC2). Es la principal diana de Rapamicina, un macrólido producido por varias especies *actinomyce* poseedor de una amplia variedad de actividades biológicas como antitumorales, neuroprotectoras, antienvjecimiento y aumento de la esperanza de vida (134). Rapamicina inhibe mTOR a través de la unión con su receptor intracelular *FK506-binding protein 12-kDa* (FKBP12) cuando el dominio mTOR forma parte de mTORC1 y no de mTORC2 (134, 135). Ambos complejos comparten la unidad catalítica mTOR y algunos componentes proteicos como *mammalian lethal with sec-13 protein 8* (mLST8, también conocida como GβL), *DEP domain containing mTOR-interacting protein* (DEPTOR) y el complejo Tti1/Tel2. En cambio, cada uno de ellos presentan sus integrantes específicos. Por un lado, mTORC1 está conformado por *regulatory-associated protein of mammalian target of rapamycin* (raptor) y *proline-rich Akt substrate 40 kDa* (PRAS40), mientras que *rapamycin-insensitive companion of mTOR* (riCTOR), *mammalian stress-activated map kinase-interacting protein 1* (mSin1) y *protein observed with rictor 1 and 2* (protor1/2) son constituyentes de mTORC2 (135).

#### 6.4.1. Reguladores *upstream* de mTORC1

mTORC1 es el complejo más descrito de los dos que forman mTOR. En su regulación participan señales como los factores de crecimiento, el estrés, el estado energético, los niveles de oxígeno, la disponibilidad de nutrientes y otros estresores como el daño en el ADN. Cuando está activo promueve los procesos de crecimiento celular, de proliferación, de síntesis proteica, lipogénesis y metabolismo energético. En cambio, su inhibición favorece la autofagia y la biogénesis lisosomal (135, 136).

El principal regulador *upstream* de mTORC1 es el heterodímero formado por *Hamartin* ó *Tuberous sclerosis complex 1* (TSC1) y *Tuberin* ó *Tuberous sclerosis complex 2* (TSC2). El complejo TSC1/2 interactúa con la proteína *GTPase-activating protein* (GAP) llamada *Ras homolog enriched in brain* (Rheb) y promueve la conversión de Rheb-GTP (forma activa) a Rheb-GDP (forma inactiva). La unión GTP-Rheb interactúa directamente con mTORC1 estimulando su actividad quinasa (135, 137).

El complejo TSC1/2 transmite muchas de las señales que impactan en él. Los factores de crecimiento como la insulina ó *insuline-like growth factor 1* (IGF1) regulan mTORC1 estimulando las vías PI3K/Akt y a través de los efectores extracelular-signal-regulated kinase ½ (ERK1/2) y ribosomal S6 kinase (RSK). Éstos fosforilan a TSC1/2 y

de este modo se activa mTORC1. Las citoquinas proinflamatorias como *Tumor Necrosis Factor- $\alpha$*  (TNF- $\alpha$ ) actúan a través de la fosforilación que produce IKK $\beta$  en TSC1 causando la inhibición del complejo y resultando en la activación de mTORC1. A través de la vía Wnt, el principal regulador del crecimiento celular, proliferación, polaridad, diferenciación y desarrollo se inhibe *glycogen synthase kinase 3 $\beta$*  (GSK3- $\beta$ ), la cual fosforila a TSC2 y promueve la activación de mTORC1 (135). En estados de hipoxia o de baja energía se activa la enzima *Adenosine monophosphate-activated protein kinase* (AMPK), la cual fosforila a TSC2 ó por otra vía independiente fosforila a raptor e inhibe directamente mTORC1. Además, el estado de hipoxia puede conectar con mTORC1 por medio del *DNA damage response 1* (REDD1). El daño en el ADN es otra de las señales estresoras que interactúan con mTORC1 a través de múltiples mecanismos pero todos dependientes de p53. El mecanismo molecular por el cual los aminoácidos actúan en mTORC1 es poco conocido. Se sabe que se requiere de las proteínas Rag GTPases que en mamíferos forman dos heterodímeros, RagA/B y RagC/D. Los aminoácidos promueven la unión de RagA/B a GTP lo que potencia la interacción del heterodímero con el componente raptor de mTORC1 (135, 137)

#### **6.4.2. Reguladores *downstream* de mTORC1**

mTORC1 regula un amplio número de procesos biológicos. La maquinaria de síntesis proteica es regulada a través de la fosforilación de los sustratos *eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein* (4E-BP1) y *S6 kinase 1* (S6K1) y de otras vías en las que participan *tripartite motif-containing protein-24* (TIF-1A) y Maf1. En la síntesis de lípidos mTORC1 actúa a través del factor de transcripción *sterol regulatory element-binding protein 1/2* (SREBP1/2), el cual controla la expresión de numerosos genes envueltos en la síntesis de ácidos grasos y colesterol, promueve la expresión y actividad de PPAR $\gamma$ , el principal regulador de la adipogénesis e incrementa el flujo glucolítico actuando a través del regulador positivo de los genes glucolíticos *hypoxia inducible factor 1  $\alpha$*  (HIF1 $\alpha$ ). mTORC1 incrementa el contenido del ADN mitocondrial y la expresión de los genes que participan en el metabolismo oxidativo, en parte mediado por una asociación nuclear entre PPAR- $\gamma$  coactivator 1  $\alpha$  (PGC1 $\alpha$ ) y el factor de transcripción Ying-Yang 1 (YY1) (119, 135, 137).

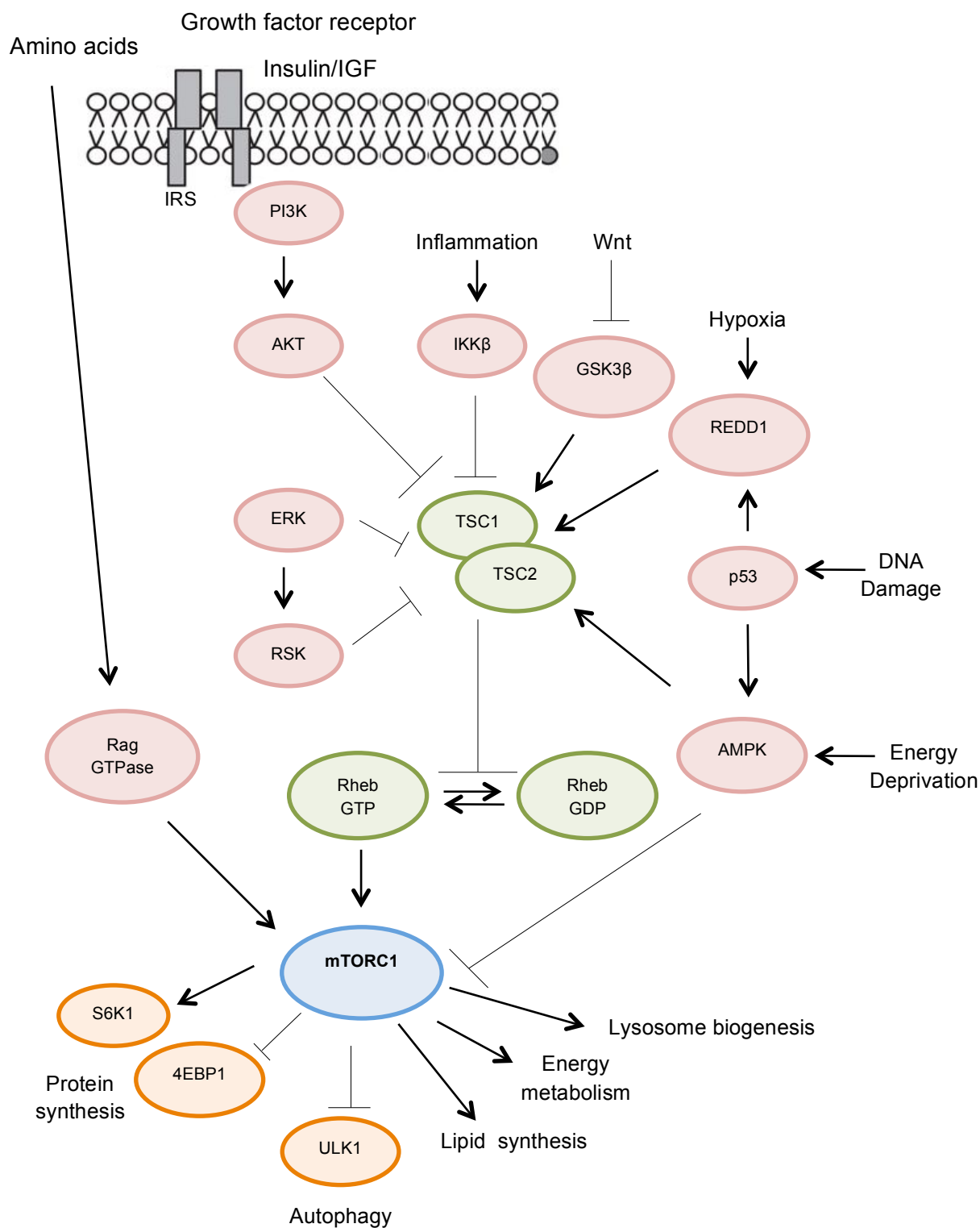


Figura 16. Esquema de las vías de señalización que intervienen en la regulación de mTORC1 (Modificado de (135, 137))

## 7. LOS RECEPTORES NUCLEARES

Los receptores nucleares constituyen una amplia familia de factores de transcripción que presentan la capacidad de interactuar directamente con el ADN y regular la expresión de un gran número de genes. La regulación se produce cuando el ligando está presente y activa o reprime la expresión génica. Controlan de este modo procesos biológicos como el crecimiento, el desarrollo, la homeostasis o el metabolismo (138, 139).

En el genoma humano se han identificado 48 receptores nucleares, de los cuales 24 regulan la expresión génica de manera dependiente de ligando por responder directamente a una larga variedad de sustancia hormonales y metabólicas y desencadenar cambios de conformación y de comportamiento dinámico. La familia de receptores nucleares se clasifica en cuatro grupos: (139-141).

**Grupo 1. Receptores de hormonas esteroideas**, que incluyen al receptor de estrógenos (ER), al receptor de progesterona (PR), al receptor de andrógenos (AR), al receptor mineralocorticoide (MR) y al receptor de glucocorticoides (GR).

**Grupo 2. Receptores de ligandos no esteroideos**, que incluye al receptor de la hormona tiroidea (TR) y al receptor del ácido retinoico (RAR).

**Grupo 3. Receptores que se unen a productos del metabolismo lipídico**, que engloban a los receptores activados por proliferadores de peroxisomas (PPARs) cuyos ligandos son los ácidos grasos y las protaglandinas y el receptor X del hígado (LXRs) que interacciona con los derivados del colesterol como los oxisteroles.

**Grupo 4. Receptores Huérfanos.** No se conocen ligandos fisiológicos y ni farmacológicos específicos. Algunas de las subfamilias a las que pertenecen son factor de crecimiento nervioso similar a IB, factor esteroideogénico y factor nuclear similar a células germinales (140, 142).

Los receptores nucleares presentan una estructura modular formada por dominios conservados comprendidos entre el extremo N-terminal y C-terminal (138, 143):

- **Región A/B ó región amino terminal:** contiene un dominio de activación transcripcional AF-1 cuya secuencia y longitud es variable en los diferentes miembros y es reconocido por los cofactores u otros factores de transcripción.
- **Región C ó dominio de unión al ADN (DBD):** presenta una estructura común formada por dos dedos zinc a través de los cuales los receptores se unen a secuencias específicas del ADN denominadas *hormone response elements* (HREs).



- **Región D ó zona bisagra:** se caracteriza por ser puente de unión entre la región C y E. Contiene una secuencia de localización nuclear (NLS).
- **Región E/F ó dominio de unión al ligando (LBD):** exhibe una arquitectura conservada entre los miembros de la familia de receptores nucleares y contiene un segundo dominio de función de activación transcripcional 2 (AF2) cuya acción es dependiente de la interacción con el ligando y contribuye al cambio conformacional del receptor, al reclutamiento de los co-activadores y a la liberación de los co-represores. La región F sólo está presente en algunos receptores nucleares.

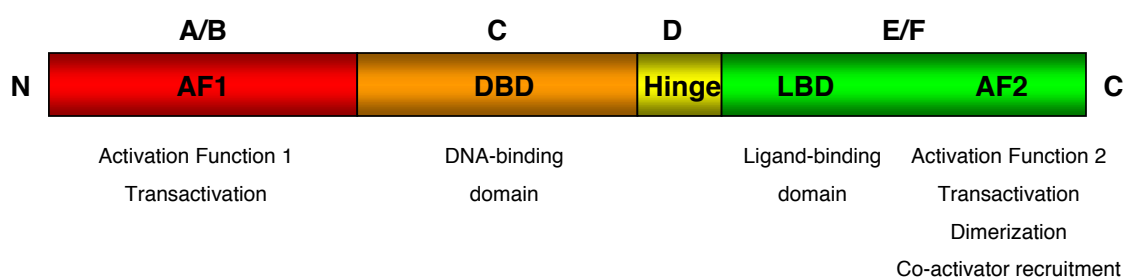


Figura 17. Esquema gráfico de la estructura de los receptores nucleares (144)

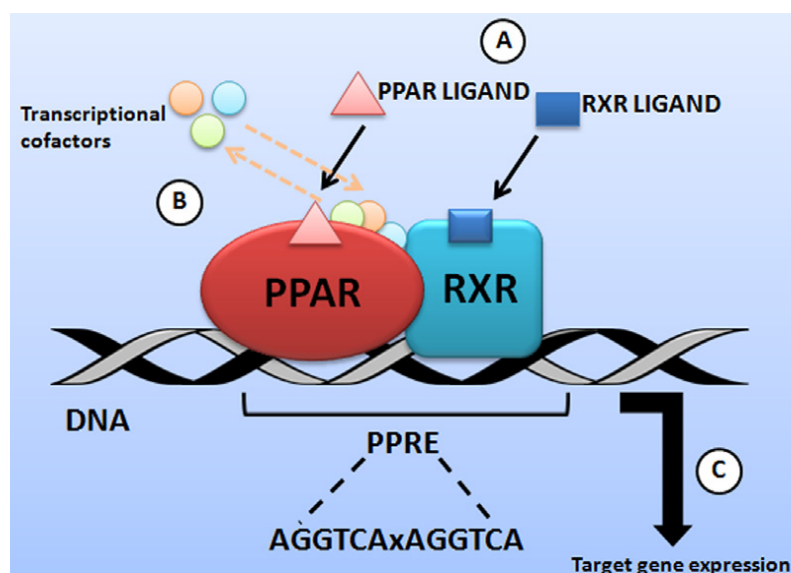
### 7.1. Receptor activado por proliferadores del peroxisome (del inglés *Peroxisome Proliferator Activated Receptors, PPARs*)

Los estudios de esta tesis se centraron en el receptor nuclear PPAR $\alpha$ , subgrupo perteneciente a la familia de PPAR.

Los receptores nucleares PPAR son factores de transcripción activados por un ligando que regulan los genes importantes en la diferenciación celular (144) y de varios procesos metabólicos especialmente la homeostasis de lípidos y de glucosa. Ejercen un papel en numerosas enfermedades como la diabetes, aterosclerosis, dislipemias y poseen propiedades antiinflamatorias (145, 146).

En su estructura presentan el dominio de unión al ADN en el extremo N-terminal y el dominio de unión al ligando en el extremo C-terminal de la región E/F. Después de su interacción con los agonistas, los PPARs son translocados al núcleo y heterodimerizan con el receptor X del retinoide (RXR). Este complejo reconoce secuencias específicas de ADN en los promotores de los genes diana denominadas PPRES. Tras la unión, la conformación del PPAR se altera, se estabiliza y se crea una

hendidura de unión y se produce el reclutamiento de co-activadores o co-represores transcripcionales los cuales modulan la señal resultando en un aumento ó una inhibición de la transcripción de los genes (145, 147, 148).



**Figura 18. Mecanismo de transcripción génica mediado por los PPARs.** En el punto A se representa la unión de los ligandos al heterodímero PPAR/RXR. En el punto B tiene lugar el reclutamiento de los cofactores transcripcionales (coactivadores ó corepresores). En el punto C se muestra que tras la activación del complejo transcripcional se provoca la expresión de los genes diana (149)

## 7.2. Clasificación y función de los PPARs

La familia de PPAR está formada por tres miembros: PPAR $\alpha$ , PPAR $\gamma$  y PPAR $\delta$ . A este último también se le conoce con el nombre de PPAR $\beta$ . De las tres clases identificadas los PPAR $\alpha$  fueron los primeros descritos y su término debe su origen a la capacidad que presentan por unirse a sustancias químicas que inducen la proliferación de los peroxisomas, organelas encargadas de oxidar los ácidos grasos (146).

Los tres isotipos de la familia PPAR difieren en la función fisiológica, en los ligandos específicos y presentan un patrón de distribución diferente aunque están caracterizados en regular la homeostasis lipídica y de la glucosa a través de las actividades coordinadas entre el hígado, músculo y tejido adiposo (**Figura 19**).

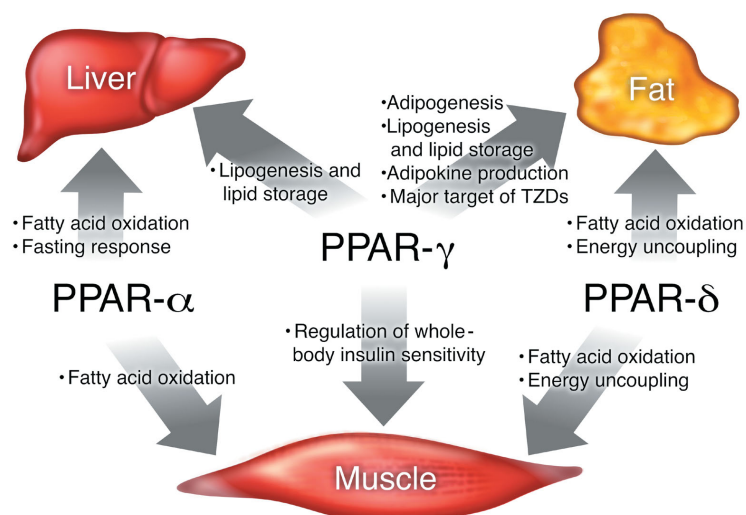
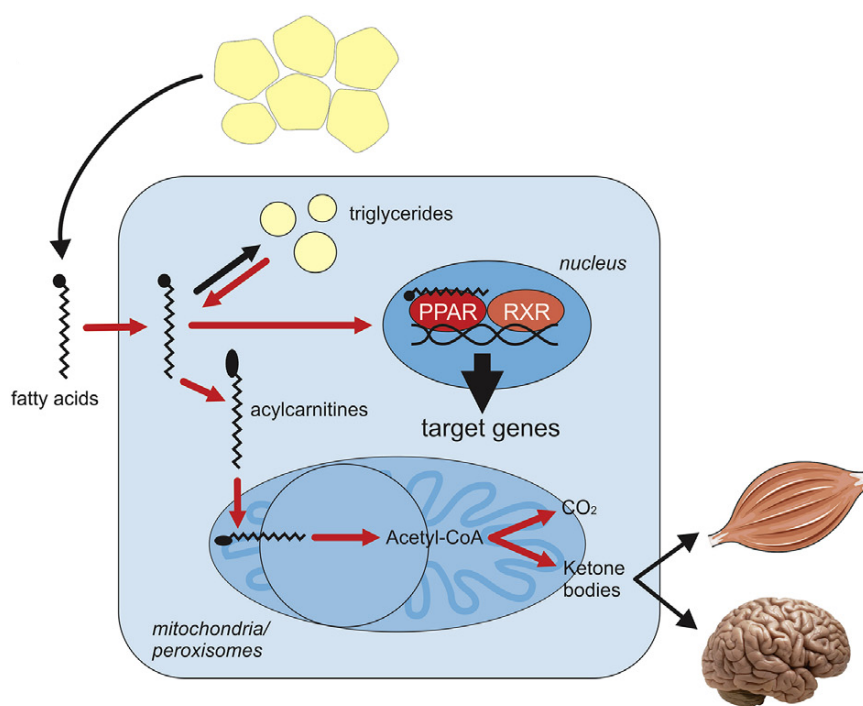


Figura 19. Integración metabólica de los PPARs (150)

**PPAR $\alpha$ .** Es el receptor nuclear que media el efecto de los ligandos lipídicos a nivel transcripcional. Controla procesos biológicos alterando la expresión de numerosos genes diana por lo que su papel funcional está directamente relacionado con la función biológica de ellos. Está localizado principalmente en el hígado y tejido adiposo marrón aunque está presente en otros tejidos como el corazón, riñón, músculo esquelético e intestino. Sus funciones se centran en captar y oxidar los ácidos grasos, interviene en el metabolismo lipoproteico y activa la autofagia hepática (151-153).

El factor de transcripción PPAR $\alpha$  se considera el principal regulador del metabolismo hepático cuando se experimenta un estado de ayuno (154). Como respuesta adaptativa se activa la lipólisis de los triglicéridos en el tejido adiposo formándose ácidos grasos y glicerol. Los ácidos grasos entran en las células hepáticas a través de las proteínas transportadoras para ser reestirificados a triglicéridos y secretados como partículas lipoproteicas de muy baja densidad (del inglés *very low density lipoprotein*, VLDL) u oxidados vía  $\beta$ -oxidación mitocondrial. La mayoría de los ácidos grasos son oxidados y activados a su forma activa acil-CoA e introducidos en la mitocondria a través de un sistema de transporte dependiente de carnitina integrado por varias enzimas entre las cuales destaca la carnitina palmitoil transferasa I (CPT-I) codificada por el gen *Cpt1a*. En la mitocondria tienen lugar varios ciclos de  $\beta$ -oxidación que generan acetil-CoA, un sustrato que puede participar en el ciclo del ácido cítrico, ser exportado al citosol para sintetizar ácidos grasos o ser convertido en cuerpos cetónicos para proporcionar energía a los tejidos de la periferia. Para que tenga lugar la oxidación de los ácidos grasos, el factor de transcripción PPAR $\alpha$  regula la expresión de la mayoría de los genes que codifican las proteínas

implicadas en su transporte y captación al interior de la mitocondria para que se oxiden vía  $\beta$ -oxidación (**Figura 20**) (150, 151, 154).



**Figura 20. Papel que desempeña PPAR $\alpha$  en el metabolismo lipídico como respuesta adaptativa al ayuno (151)**

En humanos, el receptor nuclear PPAR $\alpha$  es activado por ligandos naturales y sintéticos también denominados fibratos. El grupo de ligandos endógenos está formado por ácidos grasos [ácido palmítico, ácido esteárico, ácido oleico, ácido petroselinico, ácido linoleico, ácido  $\alpha$ -linolénico, ácido  $\gamma$ -linoléico, ácido ditomo- $\gamma$ -linoleico, ácido araquidónico, ácido docosahexanoico, ácido eicosapentanoico, C6-C18, ácido eicosatetranoico (ETYA)], por eicosanoides [leucotrieno B4 (LTB4), 8-HEPE, 8-(R)HETE, 8-(S)HETE siendo HEPE ácido hidroxieicosapentanoico, 12-HETE siendo HETE ácido hidroxieicosatetranoico, 9-(R/S)HODE, 13-(R/S)HODE siendo HODE ácido hidroxioctadecadienoico, 20,8,9-HEET, 20,11,12-HEET, 20,14,15-HEET siendo HEET ácido hidroxiepoxieicosatrienoico, 15d-PGI<sub>2</sub>, PGJ<sub>2</sub>, PGI<sub>2</sub> (Prostacyclin), PGA<sub>1/2</sub> (Prostaglandina A), PGB<sub>2</sub> (Prostaglandina B)], los fosfolípidos oxidados y el 1-Palmitoil-2-oleoil-*sn*-glycerol-3-fosfolina (16:0/18:1 GPC). En el grupo de los ligandos sintéticos se incluyen GW7647, WY14643, Clofibrato, Fenofibrato, Ciprofibrato, Gemfibrozilo, Carbaprostaciclina (cPGI), Pema fibrato (K-877, fase III, ClinicalTrials.gov Número Identificador: NCT03071692; última actualización con

fecha del 21/02/2019) y LY518674 (fase II, ClinicalTrials.gov Número Identificador: NCT00374855; última actualización con fecha del 15/05/2017) (155, 156).

Actualmente los fibratos son utilizados en el tratamiento de las dislipemias y de las hipertrigliceridemias. Para ejercer un efecto hipotriglicéridémico inducen la expresión de la enzima lipasa e inhiben la expresión de la apolipoproteína III (apoC-III), un inhibidor de la lipasa. Disminuyen los niveles en suero de los triglicéridos a través de un incremento de la expresión de los genes implicados en la  $\beta$ -oxidación y de un descenso de la expresión génica de la apoC-III en hígado. Al reducir la síntesis de la apoC-III se potencia el catabolismo de las partículas VLDL encargadas de transportar a los triglicéridos. Por otro lado, el efecto dislipémico se produce al incrementar los niveles circulatorios del colesterol de alta densidad (del inglés *high density lipoprotein*, HDL) por inducir la transcripción de las apolipoproteínas apoA-I y apoA-II. A nivel intestinal, la activación de este factor de transcripción reduce la esterificación y absorción del colesterol e incrementa la secreción de HDL por la inducción de APOA1 y ABCA1 (157-159).

El perfil lipídico caracterizado por niveles bajos de HDL y altos de triglicéridos es definido como dislipemia aterogénica y es una característica del síndrome metabólico y está asociado con riesgo cardiovascular. Los pacientes con diabetes tipo 2 o síndrome metabólico exhiben una dislipemia aterogénica asociada con inflamación crónica. Aunque las estatinas reducen el riesgo cardiovascular en morbilidad y mortalidad en pacientes con diabetes tipo 2 por disminuir los niveles de las partículas de baja densidad (del inglés *low density lipoprotein*, LDL), los agonistas PPAR $\alpha$  pueden completar esta terapia reduciendo la inflamación y normalizando el perfil aterogénico al disminuir los triglicéridos y aumentar el colesterol HDL (155, 160, 161). Algunos ejemplos de las propiedades antiinflamatorias de PPAR $\alpha$  en la patogénesis de la aterosclerosis se observaron en los vasos sanguíneos. En las paredes aórticas de ratones delecionados en PPAR $\alpha$  el tratamiento con fibratos redujo los niveles del ARNm de IL-6 y la transcripción génica de la enzima ciclooxigenasa-2 (COX-2) a través de la vía NF $\kappa$ B (162). En las células humanas del endotelio vascular la activación de este receptor nuclear evitó la expresión de *vascular cell adhesion molecule 1* (VCAM-1) inducida por la citoquina proinflamatoria TNF $\alpha$  (163).

El mecanismo mejor conocido por el cual PPAR $\alpha$  ejerce efectos beneficiosos en el proceso de inflamación es la transrepresión génica. Al ser un factor de transcripción regula de forma negativa la expresión de los genes pro-inflamatorios ejerciendo un antagonismo sobre las actividades de otros reguladores del proceso como NF $\kappa$ B, AP-1 (*activator protein-1*), STAT (*signal transducer and activator of transcription*) y C/EBP $\beta$ .

Otro de los mecanismos por el cual PPAR $\alpha$  interfiere en la inflamatoria está mediado por la retención citosólica que ejerce sobre NF $\kappa$ B lo que previene su translocación al núcleo y el desarrollo de respuestas inflamatorias (164). Las propiedades antiinflamatorias del receptor PPAR $\alpha$  se observaron también en modelos de ratón para estudiar otras enfermedades como la colitis, dermatitis ó endefalomielitis en las cuales tras activar el receptor se disminuía la secreción de citoquinas y factores proinflamatorios como IL-17, IFN- $\gamma$ , IL-1, IL-6, TNF $\alpha$  y NO. Una de las características de la expresión de PPAR $\alpha$  es el descenso de su expresión con el envejecimiento. Durante este proceso fisiológico los marcadores inflamatorios están incrementados y la actividad del receptor nuclear está disminuída. En estudios realizados en hígado se observó una reducción de la actividad de NF $\kappa$ B y de citoquinas proinflamatorias después del tratamiento con activadores (165).

**PPAR $\gamma$ .** Es un miembro de la familia de receptores nucleares PPAR. Está altamente expresado en tejido adiposo aunque también está presente en células endoteliales, células del músculo liso, macrófagos, hígado, músculo esquelético y corazón. Es un factor de transcripción activado por ligandos endógenos como los ácidos grasos saturados, monoinsaturados y poliinsaturados y por agonistas sintéticos como las Tiazolidindionas (TZD). Juega un papel importante en el control de la expresión de genes ligados a una amplia variedad de procesos fisiológicos.

El isotipo PPAR $\gamma$  es considerado como el principal regulador de la adipogénesis en tejido adiposo. Participa en la diferenciación y maduración de los adipocitos siendo considerado el último efector de la cascada transcripcional en la que participan otros factores de transcripción pertenecientes a la familia C/EBP. PPAR $\gamma$  presenta un papel importante en el metabolismo. Es diana terapéutica para las TZD, Rosiglitazona y Pioglitazona, las cuales son fármacos antidiabéticos que mejoran la sensibilidad a la insulina y la hiperglicemia en la diabetes mellitus tipo 2 (T2DM). Además de contribuir en la regulación de la adipogénesis y controlar la homeostasis de la glucosa intervienen en el metabolismo de los lípidos. Disminuye los niveles de ácidos grasos libres en plasma, mejora la acumulación excesiva de lípidos en tejidos de la periferia como hígado, músculo esquelético y corazón. En pacientes con T2DM reducen el nivel de triglicéridos en plasma y aumentan la concentración de HDL y LDL. Además de ser diana terapéutica de las TZD, este receptor nuclear está implicado en la patología de muchas enfermedades incluyendo a la obesidad y regula la respuesta inflamatoria de las células endotiales en la aterosclerosis (166, 167).

**PPAR $\beta/\delta$ .** Receptor nuclear perteneciente a la familia PPAR. De entre los tres isotipos que hay es el menos estudiado. Está ampliamente distribuido en diferentes

tejidos como tejido adiposo, hígado, músculo esquelético, corazón, intestino y células vasculares. Algunos de los agonistas sintéticos que los activan son GW0742, GW501516, L165041 y GW1929. Los estudios realizados de este receptor en animales proporcionaron información de su implicación en procesos como la regulación de la sensibilidad a la insulina, adipogénesis, implicación en el metabolismo lipídico y energético, procesos inflamatorios y aterosclerosis (166).

## **8. SENESCENCIA, AUTOFAGIA Y RECEPTORES NUCLEARES EN LA ENFERMEDAD DE ARTROSIS**

### **8.1. Artrosis y senescencia celular**

La artrosis es una de las enfermedades articulares cuya prevalencia aumenta con la edad y es la causa más común de discapacidad en personas mayores. Es considerada un desorden multifactorial con un componente inflamatorio y cambios relacionados con el envejecimiento junto a otros factores como la obesidad, daño articular y genéticos contribuyen al desarrollo de la artrosis (28).

Para justificar las causas que promueven el envejecimiento, *López-Otín et al.* (43) describieron nueve marcadores de los cuales la inestabilidad genómica, la pérdida de proteostasis, la disfunción mitocondrial, la senescencia celular o alteraciones de la comunicación intercelular podrían estar relacionadas con el desarrollo de la enfermedad promoviendo un estado pro-inflamatorio y catabólico acompañado de degeneración del tejido, de la matriz extracelular y muerte celular por apoptosis.

Los mecanismos moleculares por los cuales el envejecimiento promueve el desarrollo y progresión de la artrosis conllevan cambios en las señales y en las funciones celulares provocadas por una acumulación de daño en el ADN, de lípidos en los tejidos próximos al cartílago, de alteraciones en la función mitocondrial, de un incremento de ROS y de alteraciones metabólicas. Estos factores contribuyen a que los condrocitos adquieran fenotipo de senescencia y presenten niveles elevados de marcadores específicos de este proceso como p16<sup>INK4a</sup>, SA-β-Gal ó SASP (64). Como efecto funcional, los condrocitos senescentes tienden a secretar biomarcadores pro-inflamatorios que junto con la alteración de los mediadores anti-inflamatorios que tiene lugar durante el envejecimiento del sistema inmune, se crea un estado permanente con bajo grado de inflamación conocido con el término de *inflammaging*, el cual es un rasgo característico del SASP (168). La citoquina más importante asociada con el envejecimiento y con las enfermedades relacionadas con este proceso y cuyos niveles se incrementan a nivel sistémico es la IL-6 (169). Este fenómeno de *inflammaging* no

sólo es consecuencia de la citoquinas liberadas por las células senescentes. Debido a la existencia de varios factores de riesgo que acentúan el desarrollo de la artrosis, la obesidad y las alteraciones metabólicas contribuyen a que con el incremento de la masa grasa de las vísceras se secreten citoquinas y adipoquinas que ayudan al progreso de esta enfermedad (31, 170). A consecuencia de la liberación de mediadores pro-inflamatorios, estas citoquinas tienden a afectar a las células del entorno más próximo, pudiendo provocar en ellas la activación de mecanismos pro-senescentes.

### **8.1.1. Nuevas estrategias terapéuticas en el campo de la senescencia celular**

Con el envejecimiento, la carga de células senescentes se incrementa en los tejidos provocando efectos negativos en ellos y contribuyendo potencialmente a una disfunción física. Debido a ello, es de especial interés incluir nuevas estrategias terapéuticas para el tratamiento de enfermedades relacionadas con el envejecimiento que son más prevalentes con el incremento de la edad. Eliminar selectivamente las células senescentes puede ser una estrategia terapéutica prometedora para retrasar o prevenir los daños ocasionados por este fenotipo celular.

Una de las características que desarrollan las células senescentes es la resistencia a la muerte celular por apoptosis debido a que presentan una sobre-regulación de las vías de supervivencia SCAPs. Las SCAPs implicadas en proteger a las células de los agentes dañinos que generan el ambiente senescente son BCL-2/BCL-X<sub>L</sub>, PI3K/AKT, p53/p21, el inhibidor del activador de plasminógeno 2 (PAI-2) y los receptores efrina y sus ligandos EFNB1 ó EFNB3 (83). Los fármacos que inhiben estas vías reciben el nombre de agentes senolíticos debido a que no inducen apoptosis en todos los tipos celulares, sólo matan selectivamente las células senescentes sin afectar a las proliferativas ni a las quiescentes en las dosis adecuadas (171).

Los primeros fármacos senolíticos que se identificaron fue la combinación de Dasatinib y Quercetina. Dasatinib es un inhibidor de múltiples tirosin-quinasa e interfiere con el ligando supresor de apoptosis Efrina B (EFNB) el cual interviene en la vía de homeostasis y supervivencia AKT/FOXO1/mTOR (85) y Quercetina es un flavonoide inhibidor de la quinasa PI3K y de otras vías dependientes de tirosin-quinasa. Los resultados *in vitro* sugieren que la combinación Dasatinib + Quercetina (D+Q) reduce la carga de células senescentes en preadipocitos por parte del Dasatinib y en células endoteliales humanas HUVECs por acción de la Quercetina (83). El efecto senolítico de D+Q se confirmó también en ensayos *in vivo* utilizando varios modelos



genéticos y ambientales. En el modelo de envejecimiento prematuro de ratones deficientes en la endonucleasa de reparación del DNA Ercc-XPF se observó una reducción del número de células senescentes y en ratones envejecidos de más de 24 meses de edad se mejoraba la función cardiovascular, se aliviaba la disfunción física y se incrementaba la esperanza de vida. En explantes de tejido adiposo procedentes de pacientes obesos la secreción de los mediadores pro-inflamatorios liberados por este tejido estaba reducida y la expresión de los factores de transcripción PPAR $\gamma$  y CEBP $\alpha$ , ambos necesarios para la función adipogénica, estaba incrementada. La combinación de D+Q se consideró un agente senolítico por inducir apoptosis en células senescentes y no reducir el contenido celular total (83, 172).

La no existencia de un fármaco senolítico universal, que tuviese actividad preferente en tejidos de pacientes con diferentes patologías, facilitó el estudio de nuevas moléculas que presentasen este efecto. Otros agentes senolíticos, como Navitoclax (ABT-263) y TW-37, que actúan como inhibidores de las proteínas anti-apoptóticas de la familia Bcl-2 parecen tener eficacia selectiva en células senescentes. Navitoclax ha demostrado eficacia en ensayos clínicos de leucemia linfocítica crónica y de tumores sólidos en combinación con trametinib (173, 174) y sus dianas terapéuticas son las proteínas Bcl-2, Bcl-xl, Bcl-w (89, 175). Reduce la viabilidad células epiteliales humanas HUVECs senescentes, en los fibroblastos humanos de pulmón IMR90 y en fibroblastos embrionarios (MEFs) procedentes del ratón con envejecimiento prematuro Ercc1<sup>-/-</sup>. En cambio, no ejerce este efecto en los preadipocitos. Por otro lado, TW-37 actúa inhibiendo Bcl-2, Bcl-xl y Mcl-1. Comparándolo con el Navitoclax, su efecto senolítico es menor en células HUVECs e IMR90 y no se llega a apreciar ni en las células MEFs Ercc1<sup>-/-</sup> ni en los preadipocitos (176).

Otros nuevos agentes con efecto senolítico que han sido propuestos son Fisetin, Piperlongumine, A1155463 y A1331852. Fisetin es una flavona con baja toxicidad que induce apoptosis en células senescentes HUVECs pero no en IMR90 ni en preadipocitos (177). Otro producto natural es Piperlongumine, el cual se aísla de especies del género *Piper* y causa apoptosis vía caspasas en los fibroblastos WI-38 senescentes inducidos por radiación, por replicación y por expresión ectópica del oncogén Ras (178). Los compuestos A1155463 y A1331852 son inhibidores selectivos de Bcl-X<sub>L</sub> con menos toxicidad hematológica que el Navitoclax. Su efecto senolítico fue confirmado en células IMR90, HUVECs pero no en preadipocitos (177).

Recientemente se ha identificado una nueva clase de compuestos con actividad senolítica en las células procedentes del modelo de ratón de envejecimiento

premature (MEFs *Ercc1<sup>-/-</sup>*) y en células humanas IMR90 y WI-38 a las cuales se les indujo senescencia tratándolas con un compuesto senogénico como Etopósido y con una manipulación genética mediante acortamiento telomérico, respectivamente. Su mecanismo de acción consiste en inhibir las chaperonas HSP90 (*Heat Shock Protein*) y por consiguiente disminuyen la regulación de la vía anti-apoptótica PI3K/AKT. HSP90 es una proteína chaperona que participa en la estabilización y degradación proteica y se encuentra sobre-regulada en muchos cánceres estabilizando proteínas implicadas en el crecimiento del tumor (179). Las dos moléculas que provocan la muerte de células senescentes por apoptosis inhibiendo HSP90 son 17-AAG y 17-DMAG. 17-AAG (17-Allylamino-17-demethoxygeldanamycin) es el primer derivado sintético de la Geldanamicina, un antibiótico benzoquinónico originario de *Streptomyces hygroscopicus*. 17-DMAG (Alvespimicin) es el análogo soluble en agua del 17-AAG (180).

#### 8.1.1.1. Fármacos senolíticos en artrosis

Partiendo de la hipótesis que las células senescentes contribuyen a patologías relacionadas con el envejecimiento y que el envejecimiento junto con otros factores de riesgo potencian el desarrollo de la artrosis, una enfermedad crónica caracterizada por la degeneración del cartílago articular conduciendo a dolor y discapacidad física, eliminar selectivamente las células senescentes con el tratamiento de fármacos senolíticos sería una aproximación terapéutica para retrasar la evolución de esta enfermedad. *Jeon et al.* confirmaron esta hipótesis administrando vía intra-articular el compuesto senolítico UBX0101 en modelos de ratón transgénico positivos en p16<sup>INK4a</sup> sometidos a una lesión del ligamento cruzado y en ratones envejecidos. Consiguieron reducir el dolor, la erosión del cartílago, favorecer un ambiente pro-condrogénico y frenar la progresión de la artrosis. El potencial de estos hallazgos fue medido en condrocitos humanos aislados de pacientes tras ser sometidos a reemplazamiento quirúrgico. Con el tratamiento de UBX0101 no sólo se consiguió disminuir el número de células senescentes, sino que se aumentó la proliferación de los condrocitos sanos y se indujo crecimiento del cartílago. El mecanismo de acción por el cual elimina las células senescentes se produce vía caspasa-3, una enzima que se activa en células apoptóticas a través de ligandos de muerte y mitocondria con una enorme selectividad por determinados sustratos como el ácido aspártico. Actualmente, el compuesto UBX0101 se encuentra en fase 1 de ensayos clínicos. El estudio es aleatorizado, de doble ciego y controlado con placebo de dosis única ascendente para evaluar la seguridad, tolerabilidad y farmacocinética de una sola inyección intra-articular de UBX0101 en pacientes con dolor asociado a artrosis de rodilla. El estudio se divide en

dos partes: en la parte A se aplica una dosis única ascendente y en la parte B se inyecta una dosis única a la dosis determinada como segura y tolerable en la parte A (ClinicalTrials.gov Número Identificador: NCT03513016; última actualización con fecha del 13/05/2019).

## **8.2. Artrosis y autofagia**

En la progresión de enfermedades reumáticas como la artrosis, las alteraciones en la regulación de la autofagia, el principal mecanismo de la homeostasis celular que recicla las organelas y moléculas disfuncionales, contribuyen a su progresión de este tipo de enfermedades. Asimismo, la reducción de la autofagia ha sido asociada con el envejecimiento, uno de los principales factores de riesgo de la artrosis. Una evidencia de que la actividad autofágica disminuye con la edad se observó tras la manipulación genética de algunos genes relevantes en este proceso. Como resultado se acumularon agregados proteicos que inducían cambios degenerativos en el tejido similares a las patologías relacionadas con el envejecimiento (181). En cambio, una intervención génica, farmacológica o nutricional que resulte en la activación de los mecanismos de autofagia tienen efectos anti-envejecimiento y prolongan la salud y la esperanza de vida (182, 183).

La autofagia es esencial para preservar la integridad y función del cartílago articular. En condiciones normales es un mecanismo activo en el cartílago encontrándose niveles altos de los principales reguladores de autofagia como ULK1, Beclin1 y LC3II. En cambio, estudios realizados en cartílago artrósico humano y en ratones con artrosis experimental como en ratones con envejecimiento espontáneo demostraron que la autofagia estaba reducida (184). Este mecanismo homeostático puede actuar como respuesta adaptativa de protección. De hecho, durante los estadios tempranos de la artrosis los condrocitos presentan un incremento en los niveles del gen Atg5, de LC3II y de Beclin1 protegiendo al condrocito de la degradación catabólica por limitar la expresión de MMP13 y de ADAMTS5. En cambio, en los estadios más avanzados, se detecta un descenso de los niveles de LC3II, Beclin1, ULK1 y ATG5 en condrocitos y se incrementa la muerte celular por apoptosis lo que podría contribuir a la progresión de la artrosis (112, 185).

Los marcadores de autofagia en el cartílago articular están alterados con el envejecimiento lo que puede afectar a la supervivencia y a la función de los condrocitos, el único tipo celular presente en el cartílago. En ratones envejecidos de 28 meses, antes de la aparición de la artrosis, se detectó un descenso de la expresión proteica de Atg5 y LC3 seguido de una reducción de la celularidad del

cartílago y acompañado de un incremento de marcadores apoptóticos (186). Otros cambios que se manifestaron con la edad y que fueron observados en ratones envejecidos incluyeron un aumento del estrés oxidativo y de la MMP13 favoreciendo la pérdida progresiva del cartílago (187).

### 8.2.1. Reguladores del proceso de autofagia

Existen varios reguladores encargados de controlar el proceso de autofagia en el cartílago articular siendo mTOR uno de los más destacados. Se ha visto que ratones *knockout* en mTOR sujetos a una artrosis experimental a través de la desestabilización del menisco medial presentaban un incremento de los marcadores de autofagia ULK1, Atg5 y LC3 mientras que las células apoptóticas y factores catabólicos que conducen a un estado degenerativo estaban disminuidos. Sin embargo, en el cartílago había más presencia de proteoglicanos y condrocitos (188). Asimismo, en ratones con artrosis inducida quirúrgicamente que exhibieron un aumento de la expresión de mTOR, la activación farmacológica de la autofagia a través de la delección genética de esta quinasa potenciaba la supervivencia del condrocito y protegía al cartílago articular de los procesos degradativos (189).

Otro regulador clave para el control del proceso de autofagia es la familia de los factores de transcripción FoxO. Estos factores ejercen funciones en el desarrollo, envejecimiento y longevidad. Su actividad está regulada por la presencia de insulina ó por el factor de crecimiento similar a la insulina (del inglés *insulin-like growth factor* IGF). La presencia de ellos hace que se active la vía PI3K-Akt resultando en la exclusión de FoxO del núcleo. En cambio, en ausencia de insulina ó IGF ó durante el ayuno el factor de transcripción se transloca al núcleo donde promueve la expresión de genes implicados en el metabolismo y en la protección frente al estrés oxidativo. Se encargan de mantener el control de la calidad celular a través de la regulación de los genes envueltos en el proceso de autofagia en aquellos procesos como el envejecimiento y patologías donde las proteínas dañadas y organelas se acumulan de un modo anormal. El factor de transcripción FoxO presenta una relación antagónica con mTORC1 en la autofagia. En ausencia de nutrientes, la quinasa ULK1 se activa, FoxO activa la transcripción de la glutamina sintetasa, la cual a su vez incrementa los niveles intracelulares de glutamina y como consecuencia se bloquea la actividad de mTORC1, iniciándose el proceso de autofagia. En presencia de nutrientes ocurre el efecto contrario resultando en un incremento de la actividad de mTOR y bloqueando la autofagia (190). Recientemente se ha demostrado la implicación de los factores de transcripción FoxO en el desarrollo postnatal, en la maduración y en la homeostasis del cartílago. Los ratones deleccionados en FoxO exhibieron una degradación

espontánea del cartílago articular. Además, se observó que FoxO regulaba la expresión del gen Prg4 que codifica la proteína Lubricina y mantiene la integridad en la zona superficial (191).

### 8.2.2. Terapias actuales moduladoras del proceso de autofagia

Las observaciones descritas anteriormente sugieren que las terapias que incrementan la autofagia en los condrocitos podrían tener efectos terapéuticos en la artrosis. Los tratamientos actuales dirigidos a regular la autofagia consisten en la activación farmacológica con pequeñas moléculas, terapias biológicas y génicas (112, 192).

- **Activación farmacológica con pequeñas moléculas.** En varios estudios se han probado varias moléculas que regulan los componentes de la vía autofágica: mTOR, AMPK y la fusión de los autofagosomas con los lisosomas. A continuación, se detalla la diana farmacológica a la que va dirigida cada molécula.

- **Vía PI3K/Akt/mTOR.** La modulación farmacológica de la autofagia dirigida a la vía PI3K/Akt/mTOR es la más conocida. La molécula más estudiada es la Rapamicina cuyo mecanismo de acción consiste en inhibir a mTORC1 afectando a la quinasa Serina/Treonina ULK1, la cual actúa como efector y regulador negativo de mTORC1 para regular la autofagia (109). Originalmente se comercializó bajo el nombre de Sirolimus® y se autorizó como inmunosupresor para evitar el rechazo de los órganos transplantados. Una administración sistémica a largo plazo está asociada con importantes efectos secundarios a nivel renal, pulmonar y dermatológicos por lo que es necesario ajustar la dosis a los rangos terapéuticos de eficacia y seguridad. Los estudios con Rapamicina tanto en condrocitos como en cartílago humano y en modelos de ratón de artrosis experimental demostraron que reduce la severidad de la enfermedad, la inflamación, los efectos catabólicos, la disfunción mitocondrial y la apoptosis celular (192). Además de la Rapamicina, otros compuestos como el Temsirolimus, Everolimus y Deforolimus que se conocen como rapálogos por ser análogos de la Rapamicina, inhiben a mTORC1 (193). Se han estudiado otras moléculas como PP242 y Torin 1 que inhiben ambos complejos de mTOR, mTORC1 y mTORC2 (194). En modelos de conejo de artrosis experimental se observó que tras el tratamiento de Torin 1 había una reducción de la severidad de la patología artrósica y de la degeneración del cartílago articular. Otros agentes terapéuticos que han sido estudiados en la artrosis por inhibir a mTOR y consecuentemente activar el proceso autofágico son los

azúcares, es decir, los precursores de la síntesis de proteínas glucosiladas y de lípidos. Se incluye a la glucosamina, la sucrosa y la trehalosa que en condrocitos humanos mostraron un descenso de la severidad de la artrosis, de la degradación del cartílago, de muerte celular y una reducción del estrés oxidativo, respectivamente (192).

- **AMPK.** La quinasa AMPK es otra de las dianas farmacológicas sobre la que se regula el proceso autofágico. El fármaco más estudiado es la Metformina, un antidiabético perteneciente al grupo de las biguanidas. Presenta actividad pro-autofágica al activar ULK1 a través de la quinasa AMPK, principal sensor de la energía intracelular. Actualmente se usa para el tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2. Además de disminuir los niveles de glucosa en sangre al reducir la gluconeogénesis hepática también reduce los niveles de lípidos intracelulares (195-197). Se han hecho estudios de su eficacia en artritis reumatoide por su regulación positiva en el proceso de autofagia y por disminuir la liberación del factor TNF $\alpha$  secretado por los macrófagos (198, 199). Otras moléculas activadoras de autofagia a través de AMPK son el ácido valproico y el resveratrol. El ácido valproico originalmente fue aprobado para el tratamiento de las convulsiones y actualmente existen ensayos clínicos en fase 2 en pacientes con esclerosis sistémica (ClinicalTrials.gov Número Identificador: NCT02166229; última actualización con fecha del 11/08/2016). En cambio, no existen estudios en la patología artrósica. Por otro lado, el Resveratrol activa el proceso de autofagia a través de la quinasa AMPK y estudios experimentales mostraron propiedades antiinflamatorias y condroprotectoras en el cartílago articular (200). Actualmente, existe un ensayo clínico en fase 3 multicéntrico, doble ciego, aleatorizado y con uso de placebo cuyo objetivo es estudiar la evolución del dolor en pacientes con artrosis de rodilla tras la administración oral de Resveratrol (ClinicalTrials.gov Número Identificador: NCT02905799; última actualización con fecha del 15/03/2019).
- **Fusión de los autofagosomas con los lisosomas.** Las moléculas que actúan en esta etapa del proceso de autofagia ejercen un efecto inhibitor por alcalinizar el pH lisosomal lo que conduce a la acumulación de los autofagosomas y se bloquea la degradación lisosomal (201). Una de las moléculas que presenta este mecanismo de acción y que fue estudiada en ensayos clínicos para el tratamiento de la artrosis de rodilla en combinación con atorvastatina es la Hidroxicloroquina (ClinicalTrials.gov Número Identificador: NCT01645176; última actualización con fecha del

13/07/2018), un derivado de la Cloroquina e inicialmente aprobada como fármaco antimalárico. Dada la importancia que ejerce la autofagia en enfermedades reumáticas y que la homeostasis celular se ve alterada, la Hidroxicloroquina fue incluida en ensayos clínicos para estudiar otras enfermedades además de la artrosis como el lupus sistémico eritematoso y la artritis reumatoide (194). Asimismo, ambos compuestos han sido investigados en estudios preclínicos y ensayos clínicos como candidatos a fármacos antitumorales en tumores sólidos (202). Además de estos dos compuestos se estudiaron más inhibidores de la función lisosomal como Lys05, Monensin, Lucanthone y Matrine (194).

- **Terapias biológicas y génicas.** Además de las terapias descritas anteriormente, existen otras opciones dirigidas a activar la autofagia que incluyen las terapias biológicas y génicas. Como ejemplos de las biológicas destacan los anticuerpos monoclonales como el Belimumab, Etarnecept, Infliximab, Adalimumab, Certolizumab pegol y Golimumab. Son anticuerpos que no actúan directamente en los componentes de la autofagia sino que bloquean la unión ligando-receptor modulando las vías envueltas en este proceso (112). Otros agentes biológicos con efecto en el cartílago a través de la modulación de la autofagia son la hormona tiroidea, la adiponectina, el plasma rico en plaquetas y las células madre del tejido adiposo. En cuanto a la terapia génica, destacan las nanopartículas dirigidas a NFκB y los micro ARN (miARN) (192).

### **8.3. Metabolismo y receptores nucleares en la enfermedad de artrosis**

La artrosis es una enfermedad heterogénea relacionada con el envejecimiento y que además de presentar un componente inflamatorio y alteraciones en los mecanismos homeostáticos, uno de los fenotipos que la describe es el metabólico. Hay varios estudios que muestran una asociación entre la artrosis y el síndrome metabólico ó con varios componentes del mismo como la obesidad, la dislipemia y la diabetes mellitus tipo 2 (203).

La obesidad se considera uno de los factores de riesgo de la artrosis y además del estrés mecánico que provoca por un exceso de carga sobre la articulación también afecta a esta enfermedad por la liberación de adipoquinas y citoquinas desde el tejido adiposo a la circulación sistémica. Estos mediadores solubles están envueltos en la regulación del metabolismo lipídico y de la glucosa, de la respuesta inmune e inflamatoria (204, 205). Pueden estar secretados por otros tipos celulares encontrando sus niveles incrementados en condrocitos artrósicos (206).

La homeostasis del cartílago también puede estar alterada por un aumento en la

captación de glucosa por parte de los condrocitos artrósicos debido a cambios en la expresión del transportador de glucosa GLUT1 (*membrane glucose transporter 1*). El exceso y acumulación de glucosa inicia programas catalíticos en los que se inducen la MMP1 y la MMP13 (31, 207). Además, la hiperglicemia induce daño a nivel del cartílago articular debido a un incremento de las reacciones de glicooxidación obteniéndose los productos finales de una glicación avanzada (AGEs) que conducen a una rigidez de la matriz, destrucción del hueso subcondral y disfunción del condrocito (208, 209).

La dislipemia y alteraciones en el metabolismo del colesterol juegan otro papel importante en la evolución de la enfermedad. En un ambiente artrósico los condrocitos presentan un acúmulo de lípidos y de ácidos grasos como el araquidónico (210, 211) y en cartílago disminuye la expresión de los genes que regulan la captación de colesterol (211). Además, las partículas del colesterol LDL oxidado pueden promover el componente inflamatorio en la artrosis (212). Los receptores nucleares pertenecientes a la familia de receptores nucleares hormonales PPAR son los encargados de controlar las alteraciones metabólicas. Existen tres subtipos, PPAR $\alpha$ , PPAR $\gamma$  y PPAR $\beta/\delta$ .

El receptor nuclear PPAR $\gamma$  es la diana farmacológica de la Rosiglitazona y de la Pioglitazona, también conocidas como análogos de las TZD. Estas moléculas son utilizadas en el tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2 por incrementar la sensibilización a la insulina al actuar como agonistas sobre el receptor nuclear PPAR $\gamma$ . Tanto la Rosiglitazona como la Pioglitazona han sido estudiados en ensayos clínicos en pacientes con artritis reumatoide y lupus sistémico eritematoso (112). En relación a la artrosis, existen estudios de ratones obesos tratados con Rosiglitazona que mostraron cierta protección frente al desarrollo de artrosis espontánea (213). En cambio, no existen estudios clínicos ni con Rosiglitazona ni con Pioglitazona para el tratamiento de la artrosis. Sin embargo, investigaciones realizadas en ratones *knockout* en PPAR $\gamma$  mostraron que estos animales exhibían un incremento de la apoptosis, mayor producción de factores catabólicos e inflamatorios y un descenso de la expresión de factores anabólicos resultando en una artrosis acelerada. Su delección también afectó a marcadores de autofagia disminuyendo LC3II e incrementando la expresión de mTOR. Estos efectos se revertieron al restablecer la expresión del receptor nuclear (214, 215).

Existen pocos estudios sobre el efecto de PPAR $\alpha$  y de sus agonistas en la patología de la artrosis aunque por sus propiedades sería necesario aumentar las investigaciones en este campo. Estudios *in vitro* en cartílago artrósico indicaron que



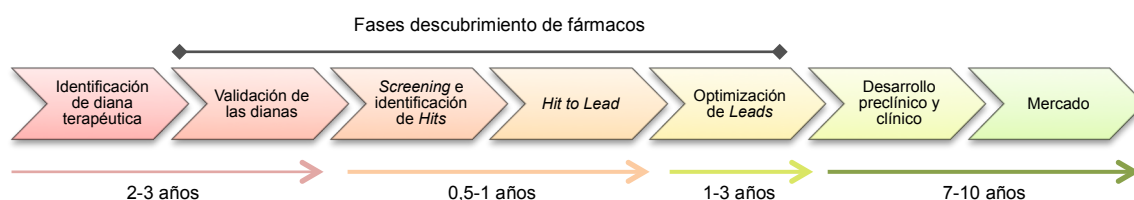
los agonistas PPAR $\alpha$  provocaban un descenso de las MMP1, MMP3 y MMP13 así como de la liberación del NO y de la PGE2 en respuesta a la IL-1 $\beta$  (216, 217). En otro estudio se mostró el efecto que producían al disminuir la inflamación sinovial y la producida por las citoquinas, adipoquinas y factores de crecimiento liberados desde la grasa infrapatelar (218). Actualmente, los fibratos se utilizan en la práctica clínica para el tratamiento de la dislipemia, hipertrigliceridemia y como coadyuvantes en la terapia de enfermedades cardiovasculares. Presentan propiedades anti-inflamatorias y su diana molecular, el receptor nuclear PPAR $\alpha$ , promueve la autofagia a nivel hepático (153) y en el sistema nervioso central (219). Además, la expresión de este receptor nuclear y la de sus genes diana como ACOX1 y CPT1A se encuentra disminuida con el envejecimiento (220, 221). Por todas estas características que definen a PPAR $\alpha$ , los fibratos, agonistas selectivos, podrían tener interés terapéutico más allá de los desórdenes metabólicos y ejercer efectos beneficiosos en el cartílago articular artrósico.

Considerando a la artrosis una enfermedad multifactorial caracterizada por una desregulación de la homeostasis celular y presencia de células senescentes que potencian un ambiente pro-inflamatorio en el cartílago articular, la búsqueda de nuevas moléculas que ejerzan efectos regulatorios sobre los mecanismos de senescencia, autofagia e inflamación podrían tener un valor terapéutico en la artrosis. Por eso, esta tesis se centra en buscar nuevas moléculas modificadoras de la artrosis combinando técnicas de imagen celular de los procesos de senescencia y autofagia con quimiotecas de fármacos aprobados para su uso clínico, y estudios preclínicos de eficacia y seguridad en modelos in vitro, ex vivo y cohortes de pacientes.

## 9. CRIBADO DE ALTO RENDIMIENTO

El desarrollo de nuevos fármacos es un proceso largo, complejo, multidisciplinar y que requiere un importante gasto económico. Comienza con la elección de una diana de estudio que a través del diseño y desarrollo de un cribado o *screening* adecuado se obtienen compuestos candidatos a *hit* y posteriormente a *lead*. Se define *hit* como molécula cabeza de serie que presenta actividad para interactuar con el biomarcador de estudio. Los *hits* son obtenidos en un *screening* primario y posteriormente son caracterizados en un *screening* secundario. Para asegurar que no son falsos positivos se someten a ensayos de validación que consisten en realizar experimentos basados en una tecnología de detección diferente a la usada en los anteriores *screening* confiriéndole robustez al cribado. Algunos de ellos son: RT-PCR (*real time-quantitative*

*polymerase chain reaction*), análisis en *Western Blot*, citotoxicidad o estudios mecanísticos. Después de la validación comienzan los programas de optimización de *hits* para conseguir los *leads*, moléculas líder altamente optimizadas poseedoras de buenas propiedades, con alta eficacia, potencia y selectividad aceptable (222). Tras la optimización del *lead* en términos de potencia, farmacocinética y toxicología se incorpora la nueva molécula a ensayos clínicos para su posterior inserción como fármaco en el mercado (223) (**Figura 21**).



**Figura 21. Proceso de investigación farmacológica y desarrollo del descubrimiento de fármacos** (Modificado de (223, 224))

Para la identificación de más de una molécula a partir de quimiotecas formadas por cientos de miles de compuestos que provoquen una respuesta biológica en la enfermedad, es necesario el empleo de la técnica de cribado de alto rendimiento (del inglés *High Throughput Screening*, de aquí en adelante denominado con las siglas en inglés *HTS*). Esta técnica implica la automatización del proceso obteniendo en menos tiempo y con menos coste grandes cantidades de datos experimentales. Ello implica el uso de nuevas tecnologías y de nuevos métodos que permiten miniaturizar el ensayo asegurando un *screening* robusto, fiable y de relevancia biológica. Ejemplo de nuevas tecnologías son el uso de placas en formatos de 96, 384, 1536 y 3456 pocillos proporcionando la posibilidad de usar volúmenes de reactivos en unidades de nanolitros (nl). La dispensación precisa, rápida y con menor tasa de error se realiza empleando dispensadores automáticos. Junto a las nuevas tecnologías se combinan métodos más sensibles sin pérdida de señal como el de fluorescencia cuya medición se realiza con lectores adaptados a este tipo de placas (222, 223).

El HTS ejerce una función central en el proceso de descubrimiento de fármacos y requiere del análisis de muchas variables. Comienza con la elección de una diana terapéutica apropiada que se debe considerar válida y relevante en la enfermedad de interés y debe aportar facilidad técnica a la hora de desarrollar un *screening* robusto y de calidad (225). A veces la elección de una diana poco novedosa puede ser un riesgo para la obtención de un efecto biológico. Por ello se siguen otras alternativas como los

ensayos fenotípicos en los cuales se estudian las propiedades celulares en respuesta a estímulos o compuestos ofreciendo la ventaja de un cribado de varias dianas a la vez.

Existen varias vías centradas en la búsqueda de *hits* a partir de dianas de estudio empleando ensayos bioquímicos o basados en células. Son estos últimos los que han avanzado en las últimas décadas disponiendo de una tecnología apropiada e incorporando el uso de métodos aplicados en los ensayos bioquímicos. Son algunos ejemplos las técnicas de fluorescencia, los ensayos FRET, *AlphaScreen* y la cuantificación del AMPc permitiendo hacer un cribado de receptores acoplados a proteínas G (GPCRs) (226).

Cuando se hacen ensayos basados en células se deben de tener en cuenta varias recomendaciones. El tipo celular empleado es la más importante, pues se deben usar aquellas células afectadas en la enfermedad o bien que posean la diana de estudio. A su vez, es válido el empleo de líneas celulares transfectadas y siempre imitando las condiciones fisiológicas. Al realizar cribado de alto rendimiento con este método es de uso obligatorio emplear tanto inhibidores como activadores estándar para confirmar que la señal obtenida es la deseada. Para optimizar el ensayo se tendrá en cuenta la concentración de Dimetil Sulfoxido (DMSO), disolvente más empleado para disolver compuestos, que toleran las células. Además, las concentraciones de almacenamiento de las quimiotecas oscilarán entre 1-30 mM y las de trabajo entre 1-30  $\mu$ M.

Otra de las ventajas que ofrecen este tipo de ensayos es la integración de sistemas automáticos de microscopía en el estudio de la biología celular, lo que se conoce como *High Content Screening* (HCS). Al uso de equipamientos que permiten la miniaturización experimental se le suman las herramientas de preparación de la muestra, las herramientas bioinformáticas que permiten el análisis de millones de células por ensayo y la mejora de algoritmos de imagen que posibilitan la investigación de los procesos celulares, cambios morfológicos, expresión proteica, internalización del receptor, entre otros.

La calidad del cribado de alto rendimiento se evalúa calculando varios parámetros estadísticos (226, 227):

- **Signal to Background (S/B)**: informa de la potencia del formato del ensayo indicada por la separación que hay entre el control positivo y negativo.

$$\frac{S}{B} = \frac{X_{Control\ Positivo}}{X_{Control\ Negativo}}$$

- **Coefficiente de Variación (CV, %):** medida de variabilidad.

$$CV = 100x \frac{SD}{X}$$

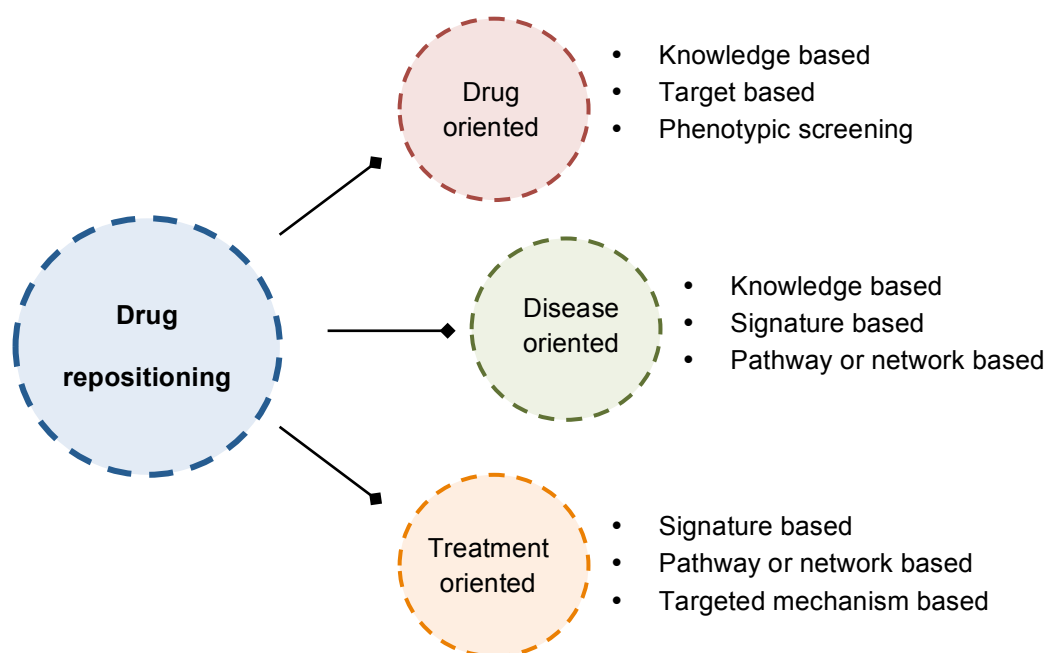
- **Factor Z':** combina la ventana existente entre las poblaciones positiva y negativa junto a la variabilidad, principales parámetros utilizados en la evaluación de la calidad del ensayo. Es un parámetro adimensional cuyos valores aceptables oscilan entre 0,5 y 1.

$$Z' = 1 - \left[ \frac{(3xSD_{Control\ Positivo}) + (3xSD_{Control\ Negativo})}{(X_{Control\ Positivo} - X_{Control\ Negativo})} \right]$$

## 10. REPOSICIONAMIENTO DE FÁRMACOS

Introducir nuevos fármacos en el mercado es un proceso largo que conlleva un coste económico importante. Este paradigma implica la necesidad de incluir estrategias para combatir enfermedades emergentes como la resistencia de patógenos a medicamentos y la ausencia de un tratamiento efectivo para muchas enfermedades. Por ello, el reposicionamiento se ha colocado en los últimos años como una oportunidad eficiente de identificar nuevos usos clínicos para fármacos existentes compensando las desventajas que implica el desarrollo de nuevos medicamentos. Acorde con la información y conocimiento disponibles de las enfermedades, de los mecanismos o de las dianas de estudio se plantearon una variedad de métodos con diferentes orientaciones (**Figura 22**).

En nuestro estudio se sugirió la posibilidad de combinar ensayos fenotípicos con los conocimientos previos de la diana terapéutica. Con esta elección se minimizó el riesgo de no obtener efecto biológico con la diana escogida y de obtener un hallazgo fortuito con el *screening* fenotípico. Aparte de la ventaja que ofrece disponer de información sobre la diana, los estudios fenotípicos dan la oportunidad de obtener resultados de propiedades celulares en respuesta a compuestos como la secreción de factores, apoptosis o cambios en la forma celular (226).



**Figura 22. Métodos de reposicionamiento enfocados a diferentes orientaciones.** El reposicionamiento de fármacos se centra en tres orientaciones: dirigida a fármacos, a enfermedades o a tratamiento. En cada orientación se emplean los métodos más adecuados: *screening* fenotípico, basados en el conocimiento farmacológico, biológico, de la diana terapéutica, de las vías y cascadas de señalización y del mecanismo de acción (Modificado de (228))

Actualmente existe una conexión entre la industria farmacéutica y la academia proporcionando el acceso libre a colecciones de miles de compuestos, ejemplo de ellas son la quimioteca del *National Institute of Neurological Disorders and Stroke* (NINDS) y la quimioteca Prestwick (229). Las características de reposicionamiento de estas librerías ofrecen ventajas en el desarrollo de medicamentos porque recortan costes económicos y están formadas por fármacos aprobados por la *Food and Drug Administration* (FDA) y por la *European Medicines Agency* (EMA) ofreciendo de esta forma datos de seguridad en los humanos. A su vez, los investigadores tienen la posibilidad de interpretar sus resultados accediendo a bases de datos libres (228) que contienen información de propiedades farmacocinéticas, clínicas y propiedades genéticas de la diana biológica.

## **HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

## **HIPÓTESIS**

“La pérdida de función de los condrocitos representa uno de los cambios centrales en el envejecimiento del cartílago articular, lo que incrementa el riesgo de artrosis. Nuestra hipótesis se centra en que los daños iniciales en el cartílago artrósico son debidos a defectos en la autofagia y a la acumulación de condrocitos en estado de senescencia que provocan daño en la matriz extracelular del cartílago y posterior degeneración, por lo que identificar compuestos con actividad senoterapéutica y moduladores de autofagia podría revertir el envejecimiento articular y el desarrollo de artrosis”

## OBJETIVOS

El **objetivo central** de esta Tesis Doctoral fue identificar moléculas dirigidas al tratamiento del envejecimiento articular y de la artrosis.

Para abordar este objetivo, se proponen los siguientes objetivos específicos:

### **1. Identificar compuestos senoterapéuticos y moduladores de autofagia mediante técnicas de cribado de alto rendimiento**

- 1.1. Identificación de compuestos con actividad senoterapéutica
- 1.2. Identificación de compuestos moduladores de autofagia

### **2. Confirmar la actividad biológica del Fenofibrato**

- 2.1. Evaluar el efecto del Fenofibrato sobre la viabilidad del condrocito
- 2.2. Caracterizar el efecto senoterapéutico del Fenofibrato y de los agonistas PPAR $\alpha$  en condrocitos humanos
- 2.3. Analizar el efecto del Fenofibrato y de los agonistas PPAR $\alpha$  sobre la homeostasis del condrocito
- 2.4. Evaluar el efecto que ejercen el Fenofibrato y los agonistas PPAR $\alpha$  sobre el metabolismo del condrocito

### **3. Evaluar la eficacia terapéutica del Fenofibrato**

- 3.1. Evaluar el efecto del Fenofibrato sobre la regulación de PPAR $\alpha$  en condrocitos
- 3.2. Determinar el papel del Fenofibrato en el proceso de degeneración del cartílago articular
- 3.3. Estudiar el papel del Fenofibrato sobre los procesos de senescencia, autofagia e inflamación en condrocitos artrósicos y envejecidos

### **4. Determinar el papel del receptor nuclear PPAR $\alpha$ en modelos preclínicos de envejecimiento articular y de artrosis**

- 4.1. Estudiar el papel de PPAR $\alpha$  en modelos de envejecimiento espontáneo y artrosis experimental en ratón
- 4.2. Estudiar el papel de PPAR $\alpha$  en sangre y cartílago de pacientes con artrosis
- 4.3. Evaluar la eficacia terapéutica de la activación de PPAR $\alpha$  con Fenofibrato en pacientes con artrosis



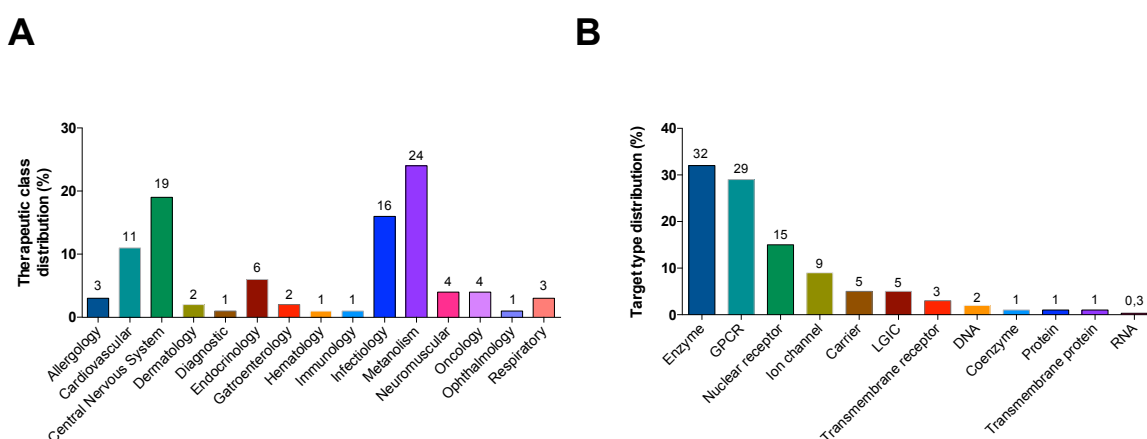
## **MATERIALES Y MÉTODOS**

# 1. IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS SENOTERAPÉUTICOS Y MODULADORES DE AUTOFAGIA MEDIANTE TÉCNICAS CRIBADO DE ALTO RENDIMIENTO

## 1.1. Librería química de compuestos Prestwick

La librería química de compuestos *Prestwick* formada por 1120 moléculas fue cedida por la Dra. Loza del grupo Biofarma de la Universidad de Santiago de Compostela. Se adquirió en un formato de placas de 384 pocillos y cada compuesto está disuelto en DMSO a una concentración 10 mM. La información que se ofreció de cada una de las moléculas incluyó estructura, nombre químico, referencia bibliográfica, propiedades fisicoquímicas, clase terapéutica, efecto, datos de farmacocinética y efectos secundarios informados.

El 100% de los fármacos que la componen están aprobados por la FDA, EMA y otras agencias ofreciendo conocimiento de datos sobre biodisponibilidad y seguridad en humanos. Estas moléculas presentan una alta diversidad química y farmacológica (**Figura 23**) y los controles de calidad aseguran compuestos estables y de alta pureza.



**Figura 23. Representación de las clases terapéuticas (A) y tipos de dianas (B) a las que van dirigidas las moléculas que componen la quimioteca Prestwick**  
[file://localhost/\(http://www.prestwickchemical.com/libraries-screening-libraries.html\)](http://www.prestwickchemical.com/libraries-screening-libraries.html)

La quimioteca Prestwick presenta una amplia variedad de usos. Su empleo en *HTS* se puede aplicar a ensayos de validación, a la búsqueda de medicamentos huérfanos y al reposicionamiento de fármacos. Esta última utilidad fue la elegida para identificar nuevas moléculas con actividad senoterapéutica y pro-autofágica en la enfermedad de artrosis.

### 1.1.1. Estímulos usados en cribado de alto rendimiento

Los estímulos usados en técnicas de HTS fueron preparados según las recomendaciones del fabricante. A continuación, se describe el efecto que ejercen a nivel molecular y en la **Tabla 2** se detallan los compuestos empleados, sus respectivas concentraciones finales, la casa comercial de procedencia, número de catálogo y los disolventes en los que fueron disueltos.

- **Librería química de compuestos Prestwick.** Conjunto de moléculas empleadas para estudios de reposicionamiento de fármacos. Su descripción se detalla en el *apartado 1.1 del capítulo referente a Materiales y Métodos.*

- **Interleuquina 6 (IL-6).** La IL-6 es una citoquina pro-inflamatoria clasificada como uno de los factores pertenecientes al fenotipo secretor asociado a senescencia (en inglés conocido con el nombre de *senescence-associated secretory phenotype*, SASP) más importantes con efecto en la senescencia celular (230). La IL-6 se empleó como inductor de senescencia y como inhibidor de autofagia.

- **Cloroquina (CQ).** La CQ es una base débil que aumenta el pH lisosomal e inhibe la actividad  $\beta$ -Galactosidasa de las células senescentes (92). Además, la CQ inhibe el flujo de autofagia bloqueando la formación de los autolisosomas, las organelas encargadas de degradar el material disfuncional.

- **Rapamicina (Rapa).** La Rapamicina inhibe la quinasa mTORC1 a través de su receptor intracelular FKBP12. Se empleó como activador del flujo de autofagia.

**Tabla 2. Concentraciones de trabajo, casa comercial, referencia y disolvente de los estímulos empleados en HTS**

Reactivos	[Concentración]	Casa Comercial # Referencia	Disolvente
Librería Prestwick	10 $\mu$ M	Prestwick, Illkirch, Francia	DMSO
IL-6	20 ng/ml	Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, Germany Ref# SRP3096	Agua destilada
CQ	200 $\mu$ M: ensayo senoterapéutico 30 $\mu$ M: ensayo flujo de autofagia	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA Ref# D2893	Agua destilada
Rapa	2,5 $\mu$ g/ml	Calbichem, Germany Ref# 5053210	DMSO

## 1.2. Screening primario: identificación de senoterapéuticos

### 1.2.1. Cultivo de líneas celulares en monocapa

La línea celular de condrocitos sanos humanos e inmortalizados T/C28a2 fue la elegida para realizar la identificación de compuestos debido a la gran variabilidad genética existente en el uso de condrocitos primarios de pacientes para este tipo de estudios y al escaso número a los que se tiene acceso. Esta línea celular de condrocitos, desarrollada y cedida por la Dra. Mary Goldring (Weill Cornell Medical College, New York, USA), se obtuvo a partir de condrocitos de la zona costal procedentes de un donante joven sano. Estas células fueron transfectadas usando el vector retroviral pZipNeoSV(X) conteniendo el virus SV40 con el antígeno T grande para obtener una línea celular estable con capacidad proliferativa (231) y características similares a las de los condrocitos humanos (232). Los estudios de validación se centraron en cuantificar la expresión de los niveles de colágeno tipo II y otros componentes de la MEC (233).

Para el mantenimiento celular empleamos el medio de cultivo *Dulbecco's Modified Eagle's* (DMEM, Lonza, Basel, Switzerland, ref# BE-604F) suplementado con un 10% de suero de ternera fetal (STF, Life Technologies, ref# 26010-074) y un 1% de Penicilina/Estreptomicina (P/S Sigma-Aldrich, ref# P0781). Las condiciones de crecimiento fueron 37°C en presencia de un 5% de CO<sub>2</sub>. Las células crecieron en monocapa hasta alcanzar la confluencia. Los experimentos fueron realizados en

medio DMEM con un 2% de STF y un 1% de P/S. La línea celular de condrocitos humanos T/C28a2 se empleó en el *Screening* primario y secundario, así como, en los estudios de validación del compuesto seleccionado y de su diana terapéutica.

### 1.2.2. Metodología técnica

El proceso de HTS fue automatizado empleando equipos específicos que permitieron miniaturizar el ensayo. A continuación, se hace una breve descripción de los mismos:

- **Echo® 550** (Labcyte, San José, CA, USA). Es un dispensador automático que transfiere volúmenes desde 2,5 nl hasta 10000 nl de forma rápida y precisa mediante energía acústica (234).
- **Janus** (Perkin Elmer, USA). Se trata de un dispensador automático de gran formato que presenta acoplado un brazo de pipeteo adaptado para placas de 96 y 384 pocillos. El *software* integrado permite configurar el volumen de trabajo que oscila entre 0,5 y 235 µl.
- **Multidrop™** (Thermo Fisher Scientific™, USA). Es un dispensador de microplacas basado en la tecnología de bomba peristáltica que permite añadir con precisión el volumen deseado. Dispone de *cassettes* dispensadores desmontables y esterilizables. Proporciona un ajuste automático de la altura y velocidad de dispensado facilitando la selección de las columnas de interés. A su vez, posibilita el uso de un amplio rango de soluciones de trabajo y de volúmenes.
- **Lavador de microplacas** (Biotek, CA, USA). Dispositivo automatizado para lavar de forma rápida placas de 96 y 384 pocillos. Ofrece la posibilidad de optimizar la velocidad de lavado y de programar la limpieza ultrasónica para un auto-mantenimiento.
- **Operetta High-Content Imaging System** (Perkin Elmer, USA). Es un sistema de diseño óptico basado en la tecnología de HCS e integrado en el equipamiento de HTS. Esta plataforma ofrece la posibilidad de adquirir imágenes de forma automática, realizar análisis y gestionar datos robustos de ensayos fenotípicos. Cada componente ha sido fabricado para obtener una buena calidad de imagen. Presenta una óptica de visión confocal eliminando el fondo y mejorando el ratio señal-ruido. El método de detección se basa en transmisión y fluorescencia, permite la adquisición simultánea de hasta cuatro canales y presenta una fuente de luz 8x LED. Incluye objetivos automáticos que permiten una alta resolución y una lectura rápida. El sistema Operetta ofrece la posibilidad de hacer estudios longitudinales con células vivas minimizando la fototoxicidad lo que permite estudiar el comportamiento celular a lo largo del tiempo

manteniendo condiciones estables de temperatura y CO<sub>2</sub>. El análisis se realiza empleando *Harmony® High Content Imaging and Analysis Software*. Permite medir características celulares como por ejemplo la señal de intensidad, la textura ó aplicar la morfología STAR para describir detalladamente y diferenciar el fenotipo celular. Además, lleva integrado el algoritmo de análisis PhenoLOGIC™ para reconocer diferentes poblaciones y regiones celulares.

### 1.2.3. Diseño del ensayo de senescencia

Cada placa de ensayo fue diseñada con los controles necesarios para la obtención de un ensayo robusto evaluando parámetros clave en el análisis del cribado. El control positivo de senescencia estaba formado por DMEM 2% STF con IL-6 (20 ng/ml) y el control negativo por DMEM 2% STF con CQ a una concentración de 200 µM. El tratamiento de las células con CQ se hizo después de las 72 horas de incubación y antes de la adición del sustrato fluorescente durante 30 minutos a 37°C. Se empleó CQ porque inhibe las enzimas lisosomales de las células senescentes aumentando el pH a 6 lo que impide detectar la actividad de la enzima β-Galactosidasa (92).

Brevemente, se sembraron 3000 condrocitos T/C28a2 en placas de 384 pocillos negras de fondo transparente (*Cell Carrier*, Perkin Elmer) para facilitar la posterior lectura de la fluorescencia emitida por el fluoróforo C<sub>12</sub>FDG. A continuación las células fueron tratadas con el inductor de senescencia IL-6 (20 ng/ml) y con los compuestos de la quimioteca Prestwick alcanzando una concentración final de 10 µM en un volumen de 50 µl por pocillo. La adición de los mismos se realizó empleando el dispensador por ultrasonidos Echo®550 y se incubó durante 72 horas en una estufa de cultivo a 37°C y con un 5% de CO<sub>2</sub>.

### 1.2.4. Cuantificación de la actividad β-galactosidasa asociada a senescencia

La senescencia celular puede ser estudiada midiendo diferentes marcadores característicos de este proceso. Entre ellos destaca el incremento del contenido lisosomal asociado a la actividad de la enzima β-Galactosidasa de las células senescentes (SA-β-Gal), un biomarcador que permite realizar un cribado de forma rápida y eficaz. La determinación de la actividad SA-β-Gal se realizó empleando el *ImaGene Green™ C<sub>12</sub>FDG LacZ Gene Expression Kit* que está compuesto por el sustrato C<sub>12</sub>FDG, el *Phenylethyl β-D-thiogalactopyranoside* y la Cloroquina.

- **C<sub>12</sub>FDG**. Es el sustrato de la enzima SA-β-Gal. Una vez en el interior de las células se ancla a la enzima creando un producto fluorescente que es retenido dentro de la membrana celular por la naturaleza de su cola lipofílica.
- **Phenylethyl β-D-thiogalactopyranoside (PETG)**. Inhibidor competitivo de la enzima SA-β-Gal cuyo uso se centra en parar la reacción.
- **Cloroquina (CQ)**. Compuesto que aumenta el pH lisosomal inhibiendo la actividad de la enzima SA-β-Gal asociada a las células senescentes.

Otros reactivos que se emplearon fueron el Hoechst 33342, un marcador del ácido desoxiribonucleico (ADN) nuclear que da información del número de núcleos celulares, y paraformaldehído (PFA) al 4%, empleado como fijador celular y que facilita la lectura de las placas a lo largo del tiempo. Las concentraciones de trabajo se resumen en la **Tabla 3**.

**Tabla 3. Concentraciones de trabajo empleadas para determinar la actividad SA-β-Gal**

Reactivos	[Concentración]	Casa Comercial # Referencia
<b>C<sub>12</sub>FDG</b>	10 μM	Life Technologies, Ref# D2893
<b>Cloroquina</b>	200 μM	Life Technologies, Ref# D2893
<b>PETG</b>	1 mM	Life Technologies, Ref# D2893
<b>Hoechst</b>	2,5 μg/ml	Life Technologies, Ref# 62249
<b>PFA</b>	4%	Sigma-Aldrich, Ref# 158127

El sustrato *ImaGene Green*<sup>TM</sup> C<sub>12</sub>FDG se empleó 72 horas después de incubar las células con los compuestos. El protocolo fue adaptado para HTS y el primer paso consistió en añadir CQ durante 30 minutos a 37°C. A continuación, se usó el aspirador de *Biotek* para eliminar el medio de toda la placa y añadir disuelto en tampón fosfato salino (PBS) con el sustrato C<sub>12</sub>FDG mezclado con *Hoechst* 33342. Se incubó durante 1 hora a 37°C protegiéndolos de la luz. Se aspiró el medio y se paró la reacción con PETG durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se retiró el inhibidor y se fijaron las células con PFA 4% durante 10 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, se lavó

dos veces con PBS y se añadieron 50  $\mu$ l de PBS en cada pocillo para su posterior lectura en el *Operetta*. Las placas se conservaron a 4°C protegidas de la luz para preservar la fluorescencia del sustrato hasta su lectura.

La lectura y el análisis basado en intensidad se realizó con el *software Harmony*® diseñado para sistemas HCS como es el caso del *Operetta*. Para iniciar el proceso de lectura se detectó automáticamente la altura y el espesor de la placa *Cell Carrier*, y se seleccionaron los canales, el tiempo de exposición, los cuatro campos de lectura en cada pocillo y se ajustó la altura de cada plano.

Las condiciones de lectura se resumen en la **Tabla 4**. Los nombres que definen a cada canal de lectura se indican en el idioma en el que aparecen en el *software*.

**Tabla 4. Condiciones de lectura con el sustrato fluorescente C<sub>12</sub>FDG**

Canales	Emisión (nm)	Excitación (nm)	Tiempo de Exposición (ms)
<b>Brightfield</b>	652-760	Transmisión	20
<b>Hoechst</b>	410-480	360-400	100
<b>Fluorescein</b>	500-550	460-490	700

Los datos generados a partir de imágenes celulares se analizaron mediante módulos cuya configuración se hizo seleccionando los métodos más apropiados. La secuencia de análisis se recoge a continuación y se describe en inglés para mostrar de forma detallada cada etapa del análisis empleando el *software Harmony*®:

1. Input Image – Individual Planes, FFC Basic
2. Find Nuclei – Channel: Hoechst 33342 – Method: M – Output population: Nuclei
3. Find Cytoplasm – Channel: Fluorescein – Method: A
4. Select Population – Population: Nuclei – Method: Common filters (Remove border objects) – Output population: Nuclei Inside Borders
5. Calculate Intensity Properties – Channel: Fluorescein – Population: Nuclei inside borders – Region: Cytoplasm – Method: Standard (Mean) – Output properties: Intensity cytoplasm fluorescein
6. Define Results – Population: Nuclei Inside Borders – Number of Objects (Mean) – Intensity Cytoplasm Fluorescein (Mean)



### **1.2.5. Análisis estadístico del ensayo de senescencia correspondiente al *Screening* primario**

Los datos obtenidos del *Screening* primario se analizaron con el *software Harmony*®. Se calculó la media de la intensidad fluorescente citoplasmática y el número de núcleos celulares de cada muestra y de los controles positivo y negativo. A continuación se determinó el umbral para definir el máximo de senescencia. Para ello, a la media de la intensidad fluorescente citoplasmática se le restó dos veces la desviación estándar (media – 2DE). Se usó el valor obtenido a partir de la media - 2DE para seleccionar los compuestos de la quimioteca Prestwick. Se determinaron los parámetros estadísticos  $Z'$ , valor del CV y el cociente s/b de cada placa. El ensayo del *Screening* primario fue considerado aceptable con un valor de  $Z' \geq 0,5$ .

### **1.3. *Screening* secundario: identificación de moduladores de autofagia**

#### **1.3.1. Desarrollo de una línea celular estable en condrocitos para la monitorización del flujo de autofagia: T/C28a2-EGFP-mCherry-LC3**

La línea celular estable de condrocitos T/C28a2-mCherryEGFP-LC3 fue creada para cuantificar el flujo de autofagia por técnicas de HTS. A las células T/C28a2 se les insertó mediante transfección retroviral el plásmido *pBABE-mCherry-EGFP-LC3B* (Addgene, Cambridge, MA, USA, ref# 22418). En este constructo, LC3 se encuentra anclado al extremo C terminal de la proteína de fusión. Cuando la autofagia es activada, LC3 se lipida y se transloca, incorporándose a la doble membrana del fagóforo creándose un ambiente básico. En esta fase del proceso predomina la fluorescencia verde debido al  $pK_a \geq 6$  que presenta EGFP. Si el flujo continúa, se forman los autolisosomas, producto de la fusión de los autofagosomas con los lisosomas provocando una disminución del pH y un cambio de color hacia rojo – anaranjado. Finalmente, se cuantifica el flujo de autofagia estableciendo un cociente entre los dos canales fluorescentes: mCherry/EGFP. Si predomina la fluorescencia emitida por mCherry el flujo de autofagia es elevado y ocurre la degradación lisosomal. Por el contrario, si hay un incremento de la fluorescencia verde, la autofagia está activada pero el flujo no continúa, provocando una acumulación de material celular.

El método de transfección retroviral se dividió en dos etapas, un proceso de co-transfección y una fase de infección. En la etapa de co-transfección, la línea celular epitelial de riñón de origen humano HEK 293 ST, cedida por la Dra. Loza (Biofarma, CIMUS, Santiago de Compostela), fue usada como células hospedadoras. El medio de cultivo de las células HEK 293 ST fue *Eagle's Minimum Essential Medium* (EMEM) suministrado por *American Type Culture Collection* (ATCC®, ref# 30-2003) y

suplementado con un 10% de SBF (Sigma-Aldrich, ref# F9665) y un 1% de P/S. Las células crecieron a 37°C con un 5% de CO<sub>2</sub>. Los vectores virales *NIK* (7 µg, Addgene) y *VSVG* (3 µg, Addgene) se mezclaron con el plásmido *pBABE-mCherry-EGFP-LC3B* (10 µg) y con *FuGene* (Promega Biotech Ibérica, Madrid, España, ref# E2691) en una relación 3:1 (FuGene:DNA) para facilitar su integración en el genoma de las células HEK 293 ST. Posteriormente, se infectaron las células T/C28a2 con las partículas virales y 48 horas después se inició la selección de las células resistentes a Puromicina (Sigma-Aldrich, ref# P8833) a una concentración de 2,5 µg/ml. Se obtuvieron cuatro clones y se aislaron subpoblaciones celulares basadas en la expresión diferencial de los marcadores insertados con un sistema de *Cell Sorting*. A su vez, se validaron por dos métodos, por citometría de flujo y por técnicas de HCS utilizando el Operetta con diferentes estímulos de autofagia. En ambos casos, se estableció el ratio entre mCherry/EGFP y se escogió el clon D para la realización de la línea estable de flujo de autofagia, a la que se denominó T/C28a2-pBABE-mCherry-EGFP-LC3B-Clon D (de aquí en adelante T/C28a2-pBABE-mCherry-EGFP-LC3B).

### 1.3.2. Cultivo de líneas celulares en monocapa

- **Línea celular T/C28a2-EGFP-mCherry-LC3.** En el mantenimiento de la línea celular de autofagia se utilizó el medio de cultivo DMEM suplementado con un 10% de STF, un 1% de P/S y Puromicina a una concentración de 2,5 µg/ml. Las condiciones de crecimiento fueron a 37°C en presencia de un 5% de CO<sub>2</sub>. Las células crecieron en monocapa hasta alcanzar la confluencia. Posteriormente, todos los experimentos fueron realizados en medio DMEM suplementado con un 2% de STF, 1% de P/S y Puromicina (2,5 µg/ml).

### 1.3.3. Diseño del ensayo de autofagia

Para estudiar el proceso de autofagia se emplearon dos compuestos relevantes que indicaron si las moléculas testadas en el segundo cribado eran moduladores del proceso de autofagia. Como activador del flujo de autofagia se empleó Rapamicina a una concentración de 10 µM, que actúa inhibiendo la quinasa mTORC1 a través de la unión con su receptor intracelular FKBP12 y permite el inicio del proceso autofágico. Como inhibidor se empleó Cloroquina a una concentración de 30 µM que actúa en la etapa de formación de los autolisosomas inhibiendo la fusión de los autofagosomas con los lisosomas por lo que el material celular no llega a degradarse.

Brevemente, se sembraron 4000 células por pocillo de la línea celular T/C28a2-pBABE-mCherry-EGFP-LC3B en DMEM suplementado con 10% STF, 1% P/S y Puromicina (2,5 µM). Después de 24 horas se cambió el medio de siembra por el

DMEM del experimento en presencia o no de IL-6 (20ng/ml). Las células fueron tratadas con los controles positivo y negativo y con los compuestos seleccionados en el primer *Screening* a una concentración de 10  $\mu$ M. En estos estudios de HTS se eligieron dos dispensadores automáticos, el *Echo*®550 y el *Janus*, para realizar la transferencia de volumen.

El *software* del dispensador por ultrasonidos permitió escoger aquellos compuestos seleccionados en el primer cribado y añadir 750 nl de cada uno de ellos a una placa intermedia con 75  $\mu$ l de DMEM 2% STF, 1% P/S y Puromicina (2,5  $\mu$ M) alcanzando una concentración de 100  $\mu$ M. En el siguiente paso se transfirieron 5  $\mu$ l desde la placa intermedia hasta la placa de células alcanzando la concentración final de 10  $\mu$ M. En este paso se empleó el *Janus*, otro dispensador automático adaptado para trabajar con volúmenes mayores. Finalmente se incubó durante 16 horas a 37°C y a un 5% de CO<sub>2</sub>.

#### 1.3.4. Cuantificación del flujo de autofagia

Transcurrido el tiempo de incubación de 16 horas se retiró el medio, se lavó con PBS y se marcaron los núcleos con Hoechst 33342 a una concentración de 2,5  $\mu$ g/ml durante 10 minutos a 37°C. A continuación, las células se fijaron con PFA 4% durante 10 minutos a temperatura ambiente, se lavaron dos veces con PBS y se añadió un volumen final de 50  $\mu$ l/pocillo para proceder a su lectura.

Para leer, analizar y cuantificar el flujo de autofagia se empleó el mismo *software* y el mismo equipo de HCS que en el ensayo de senescencia. El proceso constó de los mismos pasos en ambos *Screenings*, pero en las condiciones de lectura se incorporó el canal RFP para leer la intensidad fluorescente emitida por la proteína de fusión mCherry (**Tabla 5**). Los nombres que definen a cada canal de lectura se indican en el idioma que aparecen en el *software*.

Tabla 5. Condiciones de lectura en el proceso de autofagia

Canales	Emisión (nm)	Excitación (nm)	Tiempo de Exposición (ms)
<b>Brightfield</b>	652-760	Transmisión	20
<b>Hoechst</b>	410-480	360-400	100
<b>Fluorescein</b>	500-550	460-490	700
<b>RFP</b>	560-630	520-550	1000

El análisis de morfología STAR y textura basado en la presencia o ausencia de gránulos fue caracterizado por la acumulación de autofagosomas y formación de autolisosomas pudiéndose detectar por la fluorescencia verde emitida por EGFP y la coloración rojo-anaranjado emitida por mCherry, respectivamente. De este modo, se cuantificaron los cambios de forma y la distribución de las intensidades de cada objeto creando diferentes módulos configurados con los métodos más apropiados.

La secuencia de análisis se recoge a continuación y se describe en inglés para mostrar de forma detallada cada etapa del análisis empleando el *software Harmony*®:

1. Input Image – Individual Planes, FFC Basic
2. Find Nuclei – Channel: Hoechst 33342 – Method: M – Output population: Nuclei
3. Find Cytoplasm – Channel: Fluorescein – Method: A – Individual Threshold: 0.15
4. Find Cytoplasm (2) – Channel: RFP – Method: A – Individual Threshold: 0.25
5. Select Population – Population: Nuclei – Method: Common filters (Remove border objects) – Output population: Nuclei Inside Borders
6. Find Spots – Channel: Fluorescein – Population: Nuclei Inside borders – Region: Cytoplasm – Method: C – Output population: Spots inside borders
7. Find Spots (2) – Channel: RFP – Population: Nuclei Inside borders – Region: Cytoplasm (2) – Method: C – Output population: Spots (2) inside borders
8. Calculate Intensity Properties – Channel: Fluorescein – Population: Nuclei inside borders – Region: Cytoplasm – Method: Standard (Mean) – Output properties: Intensity cytoplasm fluorescein

9. Calculate Intensity Properties (2) – Channel: RFP – Population: Nuclei inside borders – Region: Cytoplasm (2) – Method: Standard (Mean) – Output properties: Intensity Cytoplasm (2) RFP
10. Calculate Intensity Properties (3) – Channel: Fluorescein – Population: Nuclei Inside Borders – Region: Spot – Method: Standard (Mean) – Output properties: Intensity Spot Inside Borders Fluorescein
11. Calculate Intensity Properties (4) – Channel: RFP – Population: Nuclei Inside Borders – Region: Spot (2) – Method: Standard (Mean) – Output properties: Intensity Spot Inside Borders (2) RFP
12. Define Results:
  - a. Population: Nuclei Inside Borders
    - i. Number of Objects of Nuclei (Mean)
    - ii. Number of Spots per Area of Cytoplasm – mean per well
    - iii. Number of Spots per Area of Cytoplasm (2) – mean per well
    - iv. Relative Intensity spots Fluorescein – mean per well
    - v. Relative Intensity Spots (2) – RFP – mean per well

### **1.3.5. Análisis estadístico del flujo de autofagia correspondiente al *Screening* secundario**

Los datos obtenidos del *Screening* secundario se analizaron con el *software Harmony*®. Este programa permitió calcular el ratio mCherry/EGFP de la intensidad relativa de los *spots*. Se obtuvo la media y la desviación estándar de los controles negativo y positivo. A continuación se determinó el umbral para definir el máximo del flujo de autofagia. Para ello, a la media del ratio mCherry/EGFP se le sumó dos veces la desviación estándar (media + 2DE). Se usó el valor obtenido de la media + 2DE para seleccionar los compuestos de la quimioteca Prestwick obtenidos en el *Screening* primario que presentasen un alto flujo de autofagia. Se determinaron los parámetros estadísticos  $Z'$ , valor del CV y el cociente señal/ruido (del inglés *signal to background*, s/b) de cada placa. El ensayo del *Screening* secundario fue considerado aceptable con un valor de  $Z' \geq 0,5$ .

## **2. ESTUDIOS DE CONFIRMACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DEL FENOFIBRATO**

El compuesto obtenido tras realizar un *Screening* primario y secundario fue validado en posteriores ensayos que a continuación serán descritos.

## 2.1. Estímulos usados en ensayos de confirmación de la actividad biológica

Los estímulos usados en los ensayos de validación fueron preparados según las recomendaciones del fabricante. A continuación, se describen los compuestos empleados y el efecto que ejercen a nivel molecular y en la **Tabla 6** se detallan sus respectivas concentraciones finales, la casa comercial de procedencia, el número de catálogo y los disolventes en los que fueron disueltos.

- **Agonistas del receptor nuclear PPAR $\alpha$ : Fenofibrato (FN), CP775146 (CP), GW7647 (GW).** Los tres compuestos se emplearon en los ensayos de caracterización del efecto senoterapéutico y pro-autofágico, en modelos preclínicos de ratón de envejecimiento articular y artrosis y en los estudios de eficacia terapéutica realizados en muestras humanas.

- **Navitoclax (ABT263).** El Navitoclax es un inhibidor de la vía anti-apoptótica Bcl-2/Bcl-X<sub>L</sub> (173, 175). Se usó como control senolítico en los ensayos de caracterización del efecto senoterapéutico.

- **Rapamicina.** Se usó como control senomórfico en los ensayos de caracterización del efecto senoterapéutico (180).

- **Etopósido.** Es un inductor de senescencia que actúa como agente antineoplásico al inhibir la topoisomerasa II en la fase G<sub>2</sub> del ciclo celular e inhibiendo la síntesis del ADN (235). Se empleó en los ensayos de senescencia celular con las células humanas de pulmón IMR90.

- **Bafilomicina.** La Bafilomicina es un inhibidor específico de la ATPasa vacuolar tipo H<sup>+</sup> (V-ATPasa), inhibe la acidificación lisosomal y potencia el acúmulo de gránulos en los lisosomas de la enzima  $\beta$ -galactosidasa (92). Se empleó en los ensayos de senescencia celular con las células humanas de pulmón IMR90 y con la línea de envejecimiento prematuro MEFs Ercc1<sup>-/-</sup>.

- **Interleuquina 6 (IL-6).** La IL-6 además de ser utilizada en los Screening primario y secundario se empleó en los ensayos de confirmación de la actividad biológica. Su descripción aparece detallada en el apartado 1.1.1 del capítulo de materiales y métodos.

- **Actinomicina D (AD).** La AD es un antibiótico polipeptídico que se une al ADN e inhibe la transcripción. Fue empleada en el ensayo de apoptosis celular.

- **Factor de Necrosis Tumoral  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ).** Es una proteína del grupo de las citoquinas liberada por células del sistema inmunitario y que interviene en procesos como la inflamación y la apoptosis. El TNF $\alpha$  fue empleada en el ensayo de apoptosis celular.

**Tabla 6. Concentraciones de trabajo, casa comercial, referencia y disolvente de los estímulos empleados en ensayos de confirmación**

Reactivos	[Concentración]	Casa Comercial # Referencia	Disolvente
<b>FN, CP, GW</b>	1,56 $\mu$ M – 50 $\mu$ M	Sigma-Aldrich FN Ref# F6020 CP Ref# PZ0173 GW Ref# G6793	DMSO
<b>Navitoclax (ABT263)</b>	2,5 $\mu$ M	ChemieTek, IN, USA Ref# CT-A263	DMSO
<b>Rapamicina (Rapa)</b>	T/C28a2: 10 $\mu$ M IMR90 y MEFs Ercc1 <sup>-/-</sup> : 200 nM	Calbichem Ref# 5053210	DMSO
<b>Etopósido</b>	20 $\mu$ M	Sigma-Aldrich Ref# E1383	DMSO
<b>Bafilomicina</b>	100 nM	Sigma-Aldrich Ref# B1793	DMSO
<b>Interleuquina-1<math>\beta</math> (IL-1<math>\beta</math>)</b>	5 ng/ml	Sigma-Aldrich Ref# I9401	Agua destilada
<b>Actinomicina D (AD)</b>	0,5 $\mu$ g/ml	Sigma-Aldrich Ref# A9415	DMSO
<b>Factor de Necrosis Tumoral <math>\alpha</math> (TNF<math>\alpha</math>)</b>	5 ng/ml	Sigma-Aldrich Ref# T6674	Agua destilada

## 2.2. Aislamiento y cultivo de condrocitos humanos primarios

Los estudios de confirmación se realizaron en la línea celular inmortalizada de condrocitos humanos (su descripción está detallada en el apartado 1.2.1 del capítulo de materiales y métodos) y en condrocitos humanos primarios. El proceso de aislamiento y cultivo y la información de los pacientes se describe a continuación.

El cartílago humano artrósico fue obtenido de pacientes sometidos a reemplazo quirúrgico (media  $\pm$  DE 76,8  $\pm$  4,71 años, n=5). El cartílago humano normal envejecido fue recogido del área de autopsias procedentes del cóndilo femoral y del platillo tibial de pacientes no diagnosticados de enfermedades articulares (media  $\pm$  DE 76,1  $\pm$  14,50 años, n=10). Las muestras de cartílago fueron cortadas con un bisturí en fragmentos pequeños e incubadas con tripsina (0,5 mg/ml, Thermo Fisher Scientific, Ref# 15400054) durante 10 minutos a 37°C y luego fueron tratadas con colagenasa IV (Sigma-Aldrich, ref# C5138) en DMEM con un 5% de STF toda la noche a 37°C con

agitación. El producto de la digestión fue centrifugado y las células se incubaron en DMEM suplementado con un 10% STF a 37°C y con un 5% CO<sub>2</sub>. Los experimentos se realizaron en el segundo pase celular para evitar la pérdida de fenotipo celular de condrocito. El estudio fue aprobado por el Comité Ético de Galicia.

### 2.3. Ensayos de apoptosis

El estudio del proceso de muerte celular por apoptosis se realizó mediante un marcaje simultáneo de Anexina V-FITC (495-519 nm) y Ioduro de Propidio (536-617 nm) detectando la fluorescencia emitida por ambos marcadores por citometría de flujo. Para ello se empleó el kit de *Annexin V-FITC Apoptosis Detection* (Inmunostep, Salamanca, España, ref# ANXVKF-100T).

La Anexina V es una proteína celular dependiente de calcio y con capacidad de unión a fosfatidilserina, un fosfolípido presente en la parte citosólica de la membrana plasmática de las células viables. En las primeras fases de la apoptosis, la fosfatidilserina migra hacia la parte externa de la membrana, queda expuesta en la superficie y se une a la Anexina V. Esta proteína al estar conjugada con Isotiocianato de Fluoresceína (FITC) emite fluorescencia verde lo que permite detectarla con un citómetro de flujo y diferenciar entre células apoptóticas y viables. Por otro lado, para estudiar los estadios tardíos de apoptosis característicos de la pérdida de integridad de la membrana plasmática y de la accesibilidad al núcleo celular se empleó Ioduro de Propidio (IP), una molécula fluorescente incapaz de cruzar la membrana de células intactas y que actúa como agente intercalante en el ADN de doble cadena.

Para ello, los condrocitos fueron tratados con diferentes estímulos y a diferentes tiempos. Finalizado el tiempo de incubación, se recogió el medio, se tripsinizaron las células y se centrifugó la suspensión celular durante 5 minutos a 2500 r.p.m. Se descartó el sobrenadante y el precipitado celular fue resuspendido en 100 µl de tampón de Anexina 1x en presencia de 5 µl de Anexina V y una concentración de 100 µg/ml de IP por muestra. A continuación, las muestras se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente protegiéndolas de la luz. Finalmente, se añadieron 200 µl de tampón de Anexina 1x y el volumen final de 300 µl se transfirió a tubos de citómetro. Los resultados fueron expresados en % de células positivas en Anexina V-FITC y % de células positivas en IP.

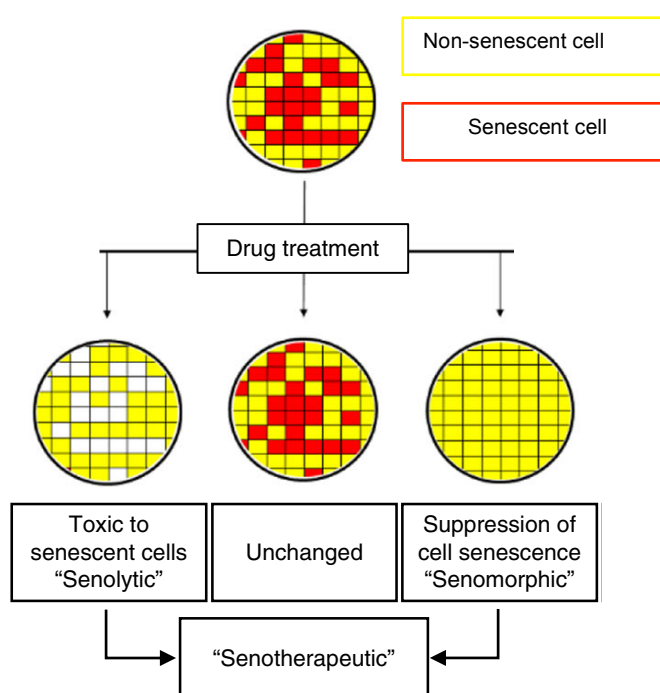
Los ensayos fueron realizados con el citómetro de flujo FACScalibur (Becton Dickinson) y el *software* CellQuestPro (Becton Dickinson). Para cada condición se analizaron 10,000 eventos. La emisión de fluorescencia se recogió a 519 nm a través del detector FL1 (fluorescencia verde) y a 617 nm a través del detector FL3



(fluorescencia roja). Este doble marcaje permitió distinguir tres poblaciones celulares: células viables, células en apoptosis temprana y células en apoptosis tardía.

## 2.4. Caracterización del efecto senoterapéutico

La caracterización del efecto senoterapéutico del compuesto identificado consistió en definir si presentaba un efecto senolítico o senomórfico en condrocitos y en otros tipos celulares. Se define compuesto senolítico como aquel que elimina selectivamente las células senescentes sin afectar a las células no senescentes o sanas. El mecanismo que actualmente se conoce consiste en bloquear las vías de supervivencia (en inglés conocidas como *Senescent Cell Anti-apoptotic Pathways*, SCAPs) en las que participan BCL-2/BCL-X<sub>L</sub>, PI3K/AKT, p53/p21, el inhibidor del activador de plasminógeno 2 (PAI-2) y los receptores efrina y sus ligandos EFNB1 ó EFNB3 para provocar la muerte vía apoptosis (83). Un compuesto es senomórfico cuando inhibe la senescencia celular sin eliminar las células senescentes, sin embargo no se conoce bien el mecanismo de acción por el cual actúan (180) (**Figura 24**). A continuación, se describen los modelos celulares empleados, así como los métodos para inducir senescencia en cada uno de ellos.



**Figura 24.** Ilustración del concepto de senolítico y senomórfico (Modificado de (180))

#### 2.4.1. Modelos celulares en monocapa

- **Línea celular T/C28a2.** Se trata de una línea celular inmortalizada de condrocitos humanos que se usó en los *Screening* primario de senescencia así como en posteriores ensayos de validación. Su descripción está detallada en el apartado 1.2.1.
- **Línea celular IMR90.** Son fibroblastos humanos de pulmón. La línea celular fue cedida por el Dr. Paul Robbins (The Research Scripps Institute, Jupiter, FL, USA). Las células crecieron en el medio EMEM (ATCC®, ref# 30-2003) suplementado por un 10% SBF (Sigma-Aldrich, ref# F9665), un 1% P/S (Thermo Fisher Scientific, CA, ref# 15140-122) un 1% Glutamax (Thermo Fisher Scientific, ref# 35050-061). Para inducir senescencia la línea celular IMR90 creció en unas condiciones de 20% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub> y 37°C durante 5 días con Etopósido a una concentración de 20 µM.
- **Células MEFs Ercc1<sup>-/-</sup>.** Son fibroblastos embrionarios de ratón con baja capacidad de reparación del ADN. Por carecer de la endonucleasa de reparación del ADN Ercc1-XPF se usan como modelo de envejecimiento prematuro. Las células cedidas por el Dr. Paul Robbins (The Research Scripps Institute, Jupiter, FL, USA) crecieron en un medio formado por 250 ml DMEM (Thermo Fisher Scientific, ref# 11995) y 250 ml Nutrient Mixture F-10 Ham (Ham's F10; Sigma-Aldrich, ref# N6908) suplementado con un 10% SBF (Atlanta Biologicals® Lawrenceville, Ga, USA, ref# S12450), 1% P/S (Thermo Fisher Scientific, ref# 15140-122), 1% MEM Non Essential Amino Acids Solution (NEAA; Thermo Fisher Scientific ref# M7145) y 1% Glutamax (Thermo Fisher Scientific, ref# 35050-061). En este tipo celular se potenció senescencia con estrés oxidativo y replicación celular incubando primeramente las células a un 3% O<sub>2</sub> y posteriormente a un 20% O<sub>2</sub> y trabajando entre los pases 2 y 6.

#### 2.4.2. Cuantificación del número de células senescentes

La caracterización del efecto senoterapéutico consistió en relacionar el número de células senescentes con el número de núcleos celulares. Para ello se hizo un doble marcaje empleando Hoechst 33342 y el sustrato fluorescente de la enzima SA-β-Gal C<sub>12</sub>FDG. El referente senolítico que se utilizó fue Navitoclax (ABT263) a una concentración de 2,5 µM y como control senomórfico se empleó Rapamicina a 10 µM en T/C28a2 y a 200 nM en IMR90 y MEFs Ercc1<sup>-/-</sup>. Como equipo de HTS se empleó el IN Cell Analyzer 6000 (GE Healthcare Life Sciences, Illinois, USA). Esta plataforma de imagen confocal basada en láser proporciona alta sensibilidad, permitiendo optimizar la velocidad de imagen.

La cuantificación del número de células senescentes en condrocitos humanos T/C28a2 consistió en sembrar 10000 células/pocillo en placas de 96 pocillos negras de

fondo transparente (Costar®). Como inductor de senescencia se utilizó IL-6 a una concentración de 20 ng/ml. Para determinar el efecto senoterapéutico del compuesto/os identificados se empleó una curva de concentraciones (1,56, 3,125, 6,25, 12,5, 25 y 50  $\mu$ M.) Todos los compuestos fueron incubados durante 72 horas a 37°C. Después del tiempo de incubación se determinó la actividad SA- $\beta$ -Gal mediante el sustrato fluorescente C<sub>12</sub>FDG. Para ello se siguió el mismo protocolo que el descrito en el *Screening* primario (ver apartado 1.2.4). Navitoclax (2,5  $\mu$ M) y Rapamicina (10  $\mu$ M) se emplearon como senolítico y senomórfico, respectivamente.

En la línea celular IMR90 se empleó Etopósido para inducir senescencia. Para alcanzar un porcentaje de senescencia comprendido entre 70%-85% las células fueron tratadas durante 48 horas con Etopósido a 20  $\mu$ M sin cambiar el medio de mantenimiento y posteriormente se mantuvieron durante 5 días en su medio de mantenimiento y en condiciones de un 20% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub> y a 37°C. A continuación, se sembraron 3000 células en DMEM 10% SBF en placas de 96 pocillos negras de fondo transparente (Costar®). A las 24 horas se trataron con el compuesto identificado (1,56  $\mu$ M-50  $\mu$ M), con Rapa (200 nM), y con Navitoclax (2,5  $\mu$ M) incubándolos durante 48 horas. Transcurrido este tiempo, se eliminó el medio y se añadió Bafilomicina (100 nM) en todas las condiciones incubándose durante 1 hora a 37°C. A continuación, sin eliminar el medio, se añadió el sustrato fluorescente C<sub>12</sub>FDG a una concentración de 20  $\mu$ M y se incubó durante 1 hora y 30 minutos a 37°C. Seguidamente, se añadió Hoechst 33342 en una dilución 1:1000 durante 20 minutos a 37 °C. Finalmente, se lavó con PBS, y se añadieron 100  $\mu$ l de DMEM 10% SBF para su posterior lectura en el InCell Analyzer sin previa fijación celular.

Los fibroblastos de ratón (MEFs) Ercc1<sup>-/-</sup> se emplearon como modelo de envejecimiento prematuro (54, 236). Para alcanzar el máximo de senescencia (55%-60%) fueron simultáneamente sometidas a estrés oxidativo y a replicación celular. Se comenzó a trabajar en pase 2 manteniendo las células durante 72 horas a 3% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub> y a 37°C. Cuando alcanzaron confluencia se expandieron y se incubaron durante 72 horas a un 20% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub> y a 37°C. Este proceso de replicación celular se repitió una vez más hasta alcanzar el pase 4 que permitió realizar la siembra de 3000 células/pocillo en placas de 96 pocillos negras de fondo transparente (Costar®) en DMEM 10% SBF. A las 24 horas se trataron con el compuesto identificado (1,56  $\mu$ M-50  $\mu$ M), con Rapa (200 nM), y con Navitoclax (2,5  $\mu$ M) incubándolos durante 48 horas en un 20% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub> y 37°C. A continuación, se añadió Bafilomicina (100 nM) durante 1 hora a 37°C y a continuación se añadió C<sub>12</sub>FDG a 20  $\mu$ M durante 1h y 30

minutos a 37°C. Finalmente, se añadió Hoechst 33342 1:1000 durante media hora a 37°C y se procedió a la lectura en el InCell Analyzer.

La lectura, el análisis y la cuantificación del número de células senescentes en los tres tipos de células se realizó con el software IN Cell Developer Toolbox® diseñado para el sistema de High-Content Screening IN Cell Analyzer 6000. El diseño del protocolo para la posterior lectura constó de los siguientes pasos:

1. Selección de la placa según sus dimensiones.
2. Selección de los canales definiendo la longitud de onda de excitación y emisión.
3. Determinar el tiempo de exposición permitiendo visualizar la imagen en 2D de la longitud de onda seleccionada.
4. Localización de los pocillos y campos de interés. Se seleccionaron cuatro campos de lectura en cada pocillo.
5. Establecer los objetivos de lectura. El objetivo 10x fue empleado en la lectura de las placas con IMR90 y MEFs Ercc1<sup>-/-</sup> y el objetivo 20x fue el elegido para la lectura de las placas con T/C28a2.

Las condiciones de lectura se resumen en la **Tabla 7**. Los nombres que definen a cada canal de lectura se indican en el idioma en el que aparecen en el *software*.

**Tabla 7. Condiciones de lectura en el proceso de senescencia**

<b>Canales</b>	<b>Emisión (nm)</b>	<b>Excitación (nm)</b>	<b>Tiempo de Exposición (ms)</b>
<b>Brightfield</b>	652-760	Transmisión	20
<b>Hoechst</b>	410-480	360-400	100
<b>Fluorescein</b>	500-550	460-490	700

Para analizar los datos generados a partir de imágenes celulares se crearon módulos cuya configuración se basó en seleccionar los métodos más adecuados. La secuencia de análisis se recoge a continuación y se describe en inglés para mostrar

de forma detallada cada etapa del análisis empleando el *software IN Cell Developer Toolbox*®:

1. Target Type: Nuclei locate – Source Image: UV-DAPI – Target Color: Blue – Measure: number of nuclei – From Image: UV-DAPI Ch1 – Statistical Function: Sum
2. Target Type: Cells – Source Image: UV-DAPI – Target Color: Green – Nuclear Segmentation: minimum target area; sensitivity – Measure: Total number of Cells – From Image: UV DAPI Ch 1 – Statistical Function: Sum
3. Target Type: Granules – Source Image: Blue-FITC – Target Color: Red – Intensity Segmentation: minimum and maximum threshold – Measure: Number Green Cells – From Image: BLUE-FITC Ch2 – Statistical Function: Sum
4. Target Type: Cell-Granules – Measure 1: Number of Green Cells – From Image: BLUE-FITC Ch2 – Statistical Function: Sum  
Target Type: Cell-Granules – Measure 1: Number of Green Cells – From Image: BLUE-FITC Ch2 – Statistical Function: Sum

## **2.5. Caracterización del efecto pro-autofágico**

### **2.5.1. Cultivo de líneas celulares en monocapa**

- **Línea celular T/C28a2-EGFP-mCherry-LC3.** Se trata de una línea celular inmortalizada de condrocitos humanos reportera de autofagia que se usó en el *Screening* secundario así como en posteriores ensayos de validación. Su descripción está detallada en el apartado 1.3.1.

### **2.5.2. Cuantificación del flujo de autofagia por citometría de flujo**

El flujo de autofagia se cuantificó tanto por técnicas de HTS utilizando el Operetta como por citometría de flujo. Para ello se utilizó la línea celular T/C28a2-EGFP-mCherry-LC3 reportera de autofagia. Se sembraron  $2,5 \times 10^5$  células/pocillo en placas de 12 pocillos (Corning®) que fueron tratadas con IL-6 (20 ng/ml) sola y en combinación con los compuesto/-os identificados a diferentes concentraciones (10, 20 y 50  $\mu$ M). Se utilizó Rapamicina (10  $\mu$ M) y Cloroquina (30  $\mu$ M), como inductor e inhibidor del flujo de autofagia, respectivamente durante 16 horas a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. A continuación, las células se recogieron, se centrifugaron y se resuspendieron en 300  $\mu$ l de PBS para su análisis en el citómetro. Para cada condición se analizaron 10,000 eventos. La emisión de fluorescencia se recogió a 519 nm a través del detector

FL1 (fluorescencia verde) y a 617 nm a través del detector FL4 (fluorescencia roja). Este doble marcaje insertado en el constructo pBABE-mCherry-EGFP-LC3B permitió establecer el ratio entre mCherry/EGFP y cuantificar el flujo de autofagia.

## 2.6. Extracción de ARN y PCR a tiempo real

### 2.6.1. Extracción y cuantificación del Ácido Ribonucleico (ARN)

La extracción de ARN se realizó a partir de la línea celular de condrocitos humanos inmortalizados T/C28a2. Se sembraron  $5 \times 10^5$  células/pocillo en placas de 6 pocillos (Corning®) y tras 24 horas de incubación fueron tratadas con el compuesto identificado a dos concentraciones, 10 y 50  $\mu\text{M}$ . Después de 8 y 24 horas de incubación se procedió a la extracción de ARN. Para ello se empleó el reactivo Trizol® (Thermo Fisher Scientific, ref# 15596026) (700  $\mu\text{l}$ /pocillo) para mantener la integridad del ARN inhibiendo la actividad de las ARNasas. Se homogenizaron las muestras celulares con el reactivo y se añadieron 300  $\mu\text{l}$  de Cloroformo (Sigma-Aldrich, ref# C2432) que se mezcló por inversión dejando incubar durante 3 minutos a temperatura ambiente. Tras una centrifugación de 12500 r.p.m durante 15 minutos y a 4°C se transfirió la fase superior acuosa incolora (contiene el ARN) a un tubo Eppendorf® y se añadieron 500  $\mu\text{l}$  de Isopropanol (Sigma-Aldrich, ref# I9516) dejando incubar durante 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se centrifugó a 12500 r.p.m durante 10 minutos a 4°C para precipitar el ARN. A continuación, se eliminó el sobrenadante y se lavó con etanol al 70% (Sigma-Aldrich, ref# 51976) a 13000 r.p.m durante 5 minutos a 4°C. Finalmente, se secó el precipitado para eliminar los restos de etanol y se añadieron 15  $\mu\text{l}$  de H<sub>2</sub>O destilada tratada con Dietil Pirocarbonato (DEPC) (Thermo Fisher, CA, USA, ref# R0601), un agente inhibidor de ARNasas. Una vez extraído el ARN se empleó el equipo *NanoDrop ND-1000* (Thermo Fisher Scientific) para cuantificar la concentración a una  $\lambda$  de 260 nm. La cuantificación nos permitió obtener dos índices de absorbancia, el ratio A260/A280 y el ratio A260/A230 que proporcionaron información de los niveles de pureza y degradación de la muestra, respectivamente. Se consideraron ratios óptimos los valores  $\geq 1,7$ .

### 2.6.2. Retrotranscripción

Una vez finalizadas las etapas de extracción y cuantificación, el ARN fue sometido a un proceso de retrotranscripción (RT) para obtener el ácido desoxirribonucleico complementario (ADNc). Se retrotranscribieron 500 ng de ARN utilizando el *kit NZY First-Strand cDNA Synthesis* (NZYTech, Lisboa, Portugal). La mezcla de reacción se describe en la **Tabla 8**.

Tabla 8. Volumen de reactivos empleados en la retrotranscripción de ARN a partir de células

Reactivo	Volumen por reacción
NZYRT Master Mix 2x	10 $\mu$ l
NZYRT Enzyme mix	2 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O-DEPC	hasta 20 $\mu$ l
ARN (500 ng)	-

Una vez realizada la mezcla de reacción se inició el proceso de desnaturalización, retrotranscripción e inactivación del ARN (**Figura 25**). Finalmente, la reacción se mantuvo a 4°C y las muestras fueron guardadas a esta temperatura hasta su posterior uso en los ensayos de la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR).

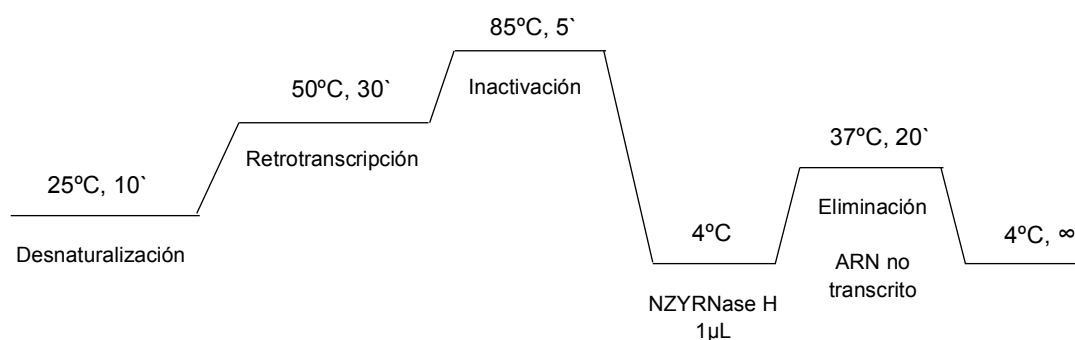


Figura 25. Descripción gráfica de los pasos de la retrotranscripción de ARN obtenido a partir de células

### 2.6.3. Cuantificación de la expresión génica por qPCR

Los niveles de expresión de los genes de interés (**Tabla 9**) se cuantificaron en una reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real (qPCR) usando sondas fluorescentes TaqMan® MGB en el termociclador *LightCycler 480 II* (Roche) siguiendo las recomendaciones del fabricante. El volumen de reacción fue de 0,5  $\mu$ l.

Tabla 9. Lista de sondas empleadas para cuantificar a tiempo real niveles de expresión génica

Nombre Sonda	Casa Comercial y # Referencia
Hs00947536_m1 PPAR $\alpha$ FAM	Thermo Fisher, Ref# 4331182
Hs00912671_m1 CPT1A FAM	Thermo Fisher, Ref# 4331182
Hs01074241_m1 ACOX1 FAM	Thermo Fisher. Ref# 4331182
Hs00231106_m1 FOXO1 FAM	Thermo Fisher, Ref# 4331182
Hs00797944_s1 MAP1LC3 FAM	Thermo Fisher, Ref# 4331182
Hs00355782_m1 CDKN1A FAM	Thermo Fisher, Ref# 4331182
Hs05332856_s1 NF $\kappa$ B FAM	Thermo Fisher, Ref# 4351372

Los reactivos TaqMan incluyen: reactivo preformulado específico para la diana de estudio (cebador directo, cebador reverso y sonda con marcaje de fluorocromo FAM) y reactivo de reacción TaqMan, *TaqMan Fast Master Mix (AmpliTa<sup>TM</sup> Fast* ADN Polimerasa, Uracil-N glicosilasa (UNG), 2'- Deoxiuridine 5'-Trifosfato (dUTP) y colorante ROX<sup>TM</sup>).

El empleo de sondas TaqMan® MGB nos permitió obtener, mediante la emisión de fluorescencia, una cantidad proporcional al número de amplicones generados durante los ciclos de la PCR. Las sondas TaqMan® MGB oligonucleotídicas contienen un fluorocromo notificador (R) unido al extremo 5' y un apantallador no fluorescente (NFQ) al extremo 3' y su mecanismo tiene lugar en cuatro etapas:

- **Paso 1: Polimerización.** Unión del notificador y del apantallador a los extremos 5' y 3' de la sonda.
- **Paso 2: Desplazamiento en cadena.** El apantallador inhibe la emisión del fluorocromo notificador cuando es excitado por la fuente de luz del termociclador debido a la proximidad que existe entre ambos marcajes.
- **Paso 3. Anclaje.** Con la presencia de la diana la inhibición del apantallador que ejerce sobre el fluorocromo notificador se ve alterada. En cada ciclo de extensión la sonda se hibrida con una secuencia específica del ADN entre los dos cebadores y es amplificada. A medida que la Taq polimerasa sintetiza la cadena en sentido 3'→5' manteniendo unida la TaqMan, tiene lugar la degradación de la sonda por la actividad exonucleasa 5'→3' de la enzima.



- **Paso 4: Polimerización completada.** Separación del apantallador del fluoróforo a consecuencia de la degradación de la sonda. Este fenómeno impide que el apantallador inhiba la fluorescencia emitida por el fluorocromo lo que permite cuantificar proporcionalmente la fluorescencia emitida con la cantidad del fluoróforo liberado y la cantidad de ADN de interés.

Para corregir la variabilidad que se produce en la cuantificación, se normalizaron los datos de los niveles de expresión de los genes de estudio con respecto a los obtenidos por el gen de referencia 36B4 (IDT, CA, USA) cuyos oligos están detallados en la **Tabla 10**. La sonda TaqMan oligonucleotídica del gen de referencia contiene un fluorocromo notificador VIC (550 nm) sobre el que incide un haz de luz de longitud de onda diferente a la que incide sobre el fluorocromo FAM (520 nm). De este modo, en un mismo pocillo de la placa de PCR se cargaron conjuntamente el gen de estudio y el gen de referencia.

**Tabla 10. Secuencia de los oligos del gen de referencia**

Nombre	Oligo
<b>h36B4_592F</b>	5'-CCA CGC TGC TGA ACA TGC-3'
<b>h36B4_658R</b>	5'-TCG AAC ACC TGC TGG ATG AC-3'

Las placas de PCR, blancas y opacas de 96 pocillos (Roche Diagnostics GmbH, IN, USA) fueron cargadas con 9 µl/pocillo de la mezcla de PCR formada por los reactivos descritos en la **Tabla 11**. Seguidamente, a cada pocillo se le añadió 1 µl de ADNc alcanzando un volumen final de 10 µl por reacción.

**Tabla 11. Volúmenes y concentración de los reactivos empleados en los ensayos de qPCR con sondas TaqMan® MGB**

Reactivo	Volumen Reacción	Concentración Final
<b>TaqMan Fast Master Mix</b>	5 µl	2 X
<b>TaqMan gen de estudio</b>	0,5 µl	1 X
<b>TaqMan gen de referencia</b>	0,02 µl	0,11 µM
<b>Cebador TaqMan del gen de referencia</b>	0,2 µl	0,22 µM
<b>H<sub>2</sub>O</b>	3,28 µl	-

Una vez cargada la placa se procede a la cuantificación de la fluorescencia emitida en el equipo *LightCycler 480 II*. Las condiciones de la qPCR se recogen a en la **Tabla 12**.

**Tabla 12. Condiciones de lectura de qPCR**

Formato de detección	Ciclos	Incubación UNG	Activación de la polimerasa	Amplificación - PCR (40 ciclos)		Enfriamiento
		Tiempo	Tiempo	Desnaturalización	Anillamiento	Tiempo
<i>Dual Color Hydrolysis Probe</i>	Ciclos	1	1	Desnaturalización	Anillamiento	1
	Tiempo	2'	20''	3''	30'	40''
	Tª	50°	95°	95°	60°	40°

La cuantificación de los niveles de expresión de los genes tuvo su fundamento en los valores del ciclo umbral (Ct siglas correspondientes al nombre anglosajón *Cycle Threshold*) que presentan las muestras. Esto hace referencia al número de ciclos que son necesarios para que la señal de fluorescencia sea superior a la fluorescencia de fondo. Cuantas más moléculas de ADN de doble cadena haya en la muestra menos número de Ct son necesarios para captar la fluorescencia emitida por la sondas. Una vez obtenidos los datos se usó el método de la segunda derivada  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (237) y se analizaron en el *software* qBASE+ qPCR (Biogazelle, Switzerland).

#### 2.6.4. Estudios de silenciamiento génico

En la línea celular de condrocitos humanos inmortalizados T/C28a2 se llevó a cabo un silenciamiento del ARN pequeño de interferencia (siRNA).

Se sembraron  $9 \times 10^4$  células/pocillo en placas de 6 pocillos. Cuando se alcanzó un nivel de confluencia entre 60-80% se procedió con la transfección transitoria. Como lípido catiónico se utilizó la Lipofectamina® RNAiMax (Thermo Fisher Scientific, ref# 13778030) a una cantidad de 7,5 µl por condición, como gen de interés Silencer® Validated siRNA (Ambion, TX, USA, ref# AM51331) a una concentración de 25 pmol y como control negativo Silencer® Cy<sup>TM</sup>3 Labeled #1 (Ambion, ref# AM4621) a una concentración de 25 pmol. A continuación, se mezcló en una proporción 1:1 la Lipofectamina con el gen de interés Silencer® y la Lipofectamina con el control negativo. Se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente y se añadieron los

complejos lípido-siRNA y lípido-Silencer® Cy<sup>TM</sup>3 a las células. El medio usado para la transfección transitoria fue Opti-MEM® (1x) (Thermo Fisher Scientific, ref# 11058).

Los condrocitos transfectados fueron empleados para determinar los niveles de expresión de marcadores de senescencia, de homeostasis y de inflamación por técnicas de qPCR.

### 3. EVALUACIÓN DE LA EFICACIA TERAPÉUTICA DEL FENOFIBRATO

#### 3.1. Estímulos usados en los ensayos de evaluación de la eficacia terapéutica

Los estímulos usados en los ensayos de evaluación de la eficacia terapéutica fueron preparados según las recomendaciones del fabricante. A continuación, se describen los compuestos empleados y el efecto que ejercen a nivel molecular y en la **Tabla 13** se detallan sus respectivas concentraciones finales, la casa comercial de procedencia, el número de catálogo y los disolventes en los que fueron disueltos.

- **Fenofibato (FN)**. La información del FN aparece detallada en el apartado 2.1 del capítulo de materiales y métodos.

- **Interleuquina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ )**. Citoquina pro-inflamatoria que juega un papel importante en los procesos catabólicos asociados al daño articular (238). Se empleó como control positivo de degradación articular y en la cuantificación de la liberación de óxido nítrico (NO).

**Tabla 13. Concentraciones de trabajo, casa comercial, referencia y disolvente de los estímulos empleados en ensayos de confirmación**

Reactivos	[Concentración]	Casa Comercial # Referencia	Disolvente
FN	10 $\mu$ M, 50 $\mu$ M	Sigma-Aldrich FN Ref# F6020	DMSO
Interleuquina-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )	5 ng/ml	Sigma-Aldrich Ref# I9401	Agua destilada

#### 3.2. Extracción y análisis de proteínas mediante técnicas de Western-Blot

La extracción de proteínas se realizó a partir de condrocitos primarios de pacientes. El proceso de aislamiento y de cultivo están descritos en el apartado 2.2 del capítulo de materiales y métodos. Para cuantificar la expresión de proteínas se utilizó la técnica de Western-Blot que consta de varias etapas. Todos los reactivos

empleados para la preparación de los tampones fueron adquiridos a Sigma-Aldrich. La composición de cada solución se recoge en la siguiente **Tabla 14**.

**Tabla 14.** Descripción de las soluciones tampón utilizadas en Western Blot

Solución Tampón	Composición
Tampón de Lisis	6M Urea 2% Dodecilsulfato Sódico (SDS)
Tampón de Electroforesis 1x	0,25 M Tris-Base 1,92 M Glicina 1% SDS H <sub>2</sub> O hasta 1L
Tampón de Transferencia 1x	0,25 M Tris-Base 1,92 M Glicina 20% de Metanol H <sub>2</sub> O hasta 1L
Tampón de Lavado 1x (TBS-T)	25 mM Tris-Base 0,15 M Cloruro Sódico (NaCl) 0,05% Tween 20 H <sub>2</sub> O hasta 1L; pH 7,4
Tampón de Bloqueo	5% Albúmina Sérica Bovina (BSA) + TBS-T 5% leche + TBS-T

**- Extracción y cuantificación de la concentración proteica.** Las muestras proteicas se obtuvieron a partir de condrocitos primarios envejecidos y artrósicos. Para ello, se sembraron  $5 \times 10^5$  células/pocillo en placas de 6 pocillos y se trataron con el compuesto seleccionado a 10  $\mu\text{M}$  y 50  $\mu\text{M}$  durante 24 horas. Transcurrido este tiempo, la proteína se aisló con tampón de lisis añadiendo a cada pocillo un volumen de 150  $\mu\text{l}$ . A continuación, se sonicaron los lisados, se centrifugaron a 12000 r.p.m durante 5 minutos a 4°C y se midió la concentración de proteína mediante un método colorimétrico basado en ácido bicinónico (BCA). Su fundamento consiste en que en condiciones alcalinas los enlaces peptídicos de las proteínas reducen los iones  $\text{Cu}^{+2}$  a  $\text{Cu}^{+1}$  reaccionando dos moléculas de BCA con un ión cuproso ( $\text{Cu}^{+1}$ ) lo que provoca un cambio de color de la solución a púrpura que absorbe a 562 nm. La absorbancia es directamente proporcional a la cantidad de proteína y se estima comparándola con una curva patrón de una proteína conocida como albúmina sérica bovina (BSA).

Para cuantificar la proteína se utilizó el protocolo indicado por el kit *Pierce*® *BCA Protein Assay* (Thermo Fisher Scientific, ref# 23225). En una placa de 96 pocillos (Corning®) se hizo una curva patrón de BSA en un rango comprendido entre 0  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  –  $6 \times 10^{-2}$   $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ . Por otro lado, se añadieron 2  $\mu\text{l}$  de extracto proteico por duplicado y se

preparó la mezcla de los reactivos A y B en una proporción 50:1 (A:B). A continuación, se incorporó un volumen de 200 µl de la mezcla, se incubó durante 30 minutos a 37°C protegiendo la placa de la luz y se midió la absorbancia a una longitud de onda de 570 nm con el espectrofotómetro NanoQuant Infinite M200 (Tecan). A partir de la curva estándar de BSA (Absorbancia vs Concentración) se obtuvo la ecuación de la recta para interpolar la concentración proteica de cada extracto (µg/µl).

- **Desnaturalización de las proteínas.** Para separar los extractos proteicos en función del peso molecular se usó el método de electroforesis unidimensional en gel de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE). Para ello se desnaturalizaron las proteínas eliminando su conformación terciaria para adquirir estructura primaria en un proceso en el que se tomaron 20 µg de proteína por muestra y se mezclaron con el tampón 4x *Laemmli Sample buffer solution* (Bio-Rad, Hercules, CA, USA, ref# 1610747) y con el agente reductor β-mercaptoetanol (Sigma-Aldrich, ref# M6250) a una concentración 10x calentándolas a 95°C durante 5 minutos. A continuación, las muestras estarían listas para la electroforesis o podrían guardarse a -20°C hasta su posterior uso.

- **Etapas de electroforesis.** Las proteínas se separaron en geles 4-20% SDS-PAGE (Bio-Rad, ref# 456-1094) utilizando el método de electroforesis unidimensional. En la cubeta de electroforesis se añadió el tampón de electroforesis 1x, 20 µg de proteína en cada carril y en el primero 4 µl del marcador (Bio-Rad, ref# 1610397 ) para seguir el curso de la electroforesis. Finalmente, se aplicó una corriente eléctrica a 80 V durante 20 minutos y a 120 V durante 1h.

- **Etapas de transferencia.** Transcurrida la electroforesis las proteínas se transfirieron por campo eléctrico desde un gel a una membrana de polivinilideno de difluoruro (Immun-Blot®PVDF Membranes for Protein Blotting, Bio-Rad, ref# 162-0177) previamente activadas con metanol y humedecidas en agua y en tampón de transferencia 1x. Se usó el sistema de transferencia Mini Trans-Blot (Bio-Rad) para crear en un casete un *sandwich* formado por papel de filtro, gel y membrana de PVDF que se incorporó a la cubeta de transferencia. Se añadió el tampón de transferencia 1x y se aplicó una corriente eléctrica a 0,20 Amperios durante 1 hora y 20 minutos.

- **Inmunodetección.** Después de la transferencia los lugares de unión que quedaron libres se bloquearon con la solución de bloqueo recomendada por el fabricante durante 1 h a temperatura ambiente y a continuación se dejaron toda la noche incubando con el anticuerpo primario diluido en la solución de bloqueo correspondiente. Transcurrido este tiempo se realizaron tres lavados de 5 minutos con TBS-T 1x en agitación y se incubaron las membranas con el anticuerpo secundario

diluido en la solución de bloqueo durante 1 hora a temperatura ambiente. Antes de la detección quimioluminiscente las membranas se volvieron a lavar tres veces durante 5 minutos con TBS-T 1x. Finalmente, las proteínas se detectaron con el kit de revelado de quimioluminiscencia (Sigma-Aldrich, ref# WBLUC0500) por un método enzimático en el cual el anticuerpo secundario está marcado con la peroxidasa (HRP) que cataliza la transformación del sustrato luminol en 3-aminofalato, producto enzimático que genera luz y se lee a una longitud de onda de 428 nm captada por la cámara de revelado Amersham™ Imager 600 (GE Healthcare, Illinois, USA). Para cuantificar la expresión proteica se utilizó el programa informático Image J (National Institute of Health, USA) y como control de carga se empleó  $\alpha$ -Tubulina.

En la **Tabla 15** se describen las concentraciones usadas de los anticuerpos primarios y secundario.

**Tabla 15. Lista de anticuerpos empleados en Western Blot**

Anticuerpo	Origen	Clonalidad	Peso Molecular (KDa)	Dilución	Tampón	Casa Comercial # Referencia
<b>p21</b>	Conejo	Monoclonal	21	1:1000	BSA 5x	Cell Signaling Ref# 2947
<b>p16</b>	Conejo	Monoclonal	16	1:5000	Leche 5x	Abcam Ref# 151303
<b>LC3</b>	Conejo	Monoclonal	14-16	1:1000	BSA 5x	Cell Signaling Ref# 3868
<b>p-rbS6</b> (Ser 235/236)	Conejo	Monoclonal	32	1:2000	BSA 5x	Cell Signaling Ref# 4858
<b>PPAR<math>\alpha</math></b>	Conejo	Policlonal	$\approx$ 52	1:1000	BSA 5x	Thermo Fisher Scientific Ref# PAI-822A
<b>NF<math>\kappa</math>B</b>	Conejo	Monoclonal	65	1:1000	BSA 5x	Cell Signaling Ref# 8242
<b><math>\alpha</math>-Tubulin</b>	Ratón	Monoclonal	52	1:5000	Leche 5x	Sigma-Aldrich Ref# T9026

### 3.3. Tinción de Safranina O-Fast Green

Para estudiar el efecto protector del compuesto en el proceso de degradación y en la pérdida de proteoglicanos se utilizaron explantes de cartílago articular procedentes de donantes normales envejecidos (media  $\pm$  DE 73,33  $\pm$  17,95 años, n=3) del Hospital Universitario de A Coruña. Los pacientes sufrieron una amputación a través de la

articulación de rodilla a nivel de los cóndilos femorales. Se hizo una tinción de Safranina O-*Fast Green*, un colorante de contraste con carga positiva empleado en diferentes técnicas histológicas. Por su naturaleza catiónica se une a los grupos carboxilo y a los grupo sulfato, ambos con carga negativa, de los glicosaminoglicanos, componentes estructurales abundantes en la matriz extracelular del cartílago.

Brevemente, el tejido fue tratado con IL-1 $\beta$  (5 ng/ml), citoquina pro-inflamatoria implicada en la degradación del cartílago (238) con dos dosis del compuesto identificado (10 y 50  $\mu$ M) durante 72 h. Transcurrido este tiempo, se pesaron los explantes, se fijaron durante 24 horas en Formalina para su posterior inclusión en parafina. Se hicieron cortes de 4  $\mu$ m y fueron teñidos con Safranina O-*Fast Green*. Posteriormente, se examinaron en el microscopio Olympus (*Olympus Life Science Solutions*, USA).

### 3.4. Cuantificación de la liberación de óxido nítrico

El reactivo de Griess (Enzo Life Sciences, Ann Arbor, MI, USA, ref# alx-400-004-L050) se empleó para cuantificar de forma indirecta la producción de óxido nítrico (NO) en los sobrenadantes celulares. Este método se basa en una reacción química en la cual se detectan los nitritos (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>), productos estables y no volátiles del NO, formados a partir de la reducción de los nitratos por acción de la nitrato reductasa. Si hay presencia de nitritos tras la adicción del reactivo de Griess se detecta una coloración rosa.

La producción de NO se cuantificó en condrocitos envejecidos (n=5). Brevemente, se sembraron  $7,5 \times 10^4$  células/pocillo en placas de 48 pocillos (Costar®) que fueron estimulados con el compuesto a una concentración de 10 y 50  $\mu$ M con y sin presencia de IL-1 $\beta$  (5ng/ml). Después de 24 horas de incubación a 37°C y 5% CO<sub>2</sub> se recogió el sobrenadante. En una placa de 96 pocillos (Costar®) se mezcló el sobrenadante celular y el reactivo de Griess en una relación 1:1 alcanzando un volumen final de 100  $\mu$ l/pocillo. Se agitó durante 10 minutos protegido de la luz y en un lector de placas se midió la absorbancia a 570 nm. Para asegurar una cuantificación exacta de la cantidad de NO se hizo una curva estándar de Nitrito Sódico a diferentes concentraciones (1mM - 0  $\mu$ M). Los niveles obtenidos de NO fueron normalizados con respecto al número de células y los datos fueron expresados como la media  $\pm$  SEM.

## 4. PAPEL DEL RECEPTOR NUCLEAR PPAR $\alpha$ EN MODELOS PRECLÍNICOS DE ENVEJECIMIENTO ARTICULAR Y DE ARTROSIS

### 4.1. Técnicas histológicas

El análisis histológico e inmunohistoquímico fue realizado en cartílago procedente de:

- Cartílago de rodilla de dos modelos murinos pertenecientes a la cepa de ratón C57BL/6J: modelo de envejecimiento espontáneo a los 6, 12, 18 y 30 meses de edad (n=3/tiempo) y modelo de artrosis experimental por cirugía mediante la desestabilización del ligamento meniscotibial medio y lateral a las 10 semanas post-cirugía (n=3).
- Cartílago de rodilla de sujetos de edad avanzada sin patología artrósica y con patología artrósica de grado III-IV (n=3).

#### 4.1.1. Análisis histológico

Las secciones del cartílago fueron teñidas con Safranina O-*Fast Green* siguiendo el protocolo descrito en el apartado 3.2. Para el análisis histopatológico del cartílago procedente de las rodillas de los ratones se empleó el grado de severidad desarrollado por la *Osteoarthritis Research Society International* (OARSI) que oscila entre 0 y 6 (239).

#### 4.1.2. Inmunohistoquímica

Los cortes histológicos se desparafinaron y se rehidrataron siguiendo los diferentes pasos: xilol durante 5 minutos para eliminar los restos de parafina, hidratación en soluciones decrecientes de alcohol, 100° y 70° durante 6 minutos en cada una de ellas y posteriormente lavado en agua para eliminar los restos de alcohol. A continuación, se añadió la solución de pre-bloqueo Bloxall® (Vector Labs, Burlingame, CA, USA, ref# SP-6000) y se incubó durante 10 minutos. A continuación, las muestras se lavaron con TBST-1x durante 5 minutos, y se incubó con la solución de bloqueo del kit ImmPRESS HRP (Vector Labs, ref# MP-7401). Las muestras se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente y posteriormente se añadió el anticuerpo primario y el control negativo Rabbit IgG a una dilución 1:500 incubando las muestras toda la noche a 4°C. A continuación, las muestras se lavaron en agua y en TBST-1x para posteriormente añadir el anticuerpo secundario (*Biotinylated goat anti-rabbit secondary antibody*, ImmPRESS HRP *kit*, Vector Labs, ref# MP-7401) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, se incubaron con una dilución del cromógeno diaminobencidina (DAB) (Vector Labs, ref# SK-4100) durante 30 segundos. Se formó



un producto de color marrón que puso de manifiesto la presencia o no del marcador estudiado. La reacción enzimática de la DAB se paró con agua y las secciones se prepararon para su visualización al microscopio con medio de montaje y un cubreobjetos.

#### **4.1.3. Cuantificación de la inmunohistoquímica**

La cuantificación de las células positivas en cada tipo de cartílago fue realizada según lo descrito por *Taniguchi et al.* (240). Para ello, se escogieron tres zonas de cada sección del tejido y se contó el número de células positivas para el marcador estudiado en cada una de ellas. El programa de procesamiento de imagen con el que se cuantificaron las células positivas fue el Image J (National Institute of Health, USA).

#### **4.2. Extracción de ARN a partir de muestras de sangre**

La extracción de ARN se realizó a partir de muestras de sangre de donantes sin artrosis y donantes con artrosis de rodilla de la Cohorte Prospectiva de Artrosis de A Coruña (PROCOAC) (241).

Las muestras de sangre se obtuvieron de dos grupos de pacientes, pacientes sin artrosis de rodilla (grupo control, media  $\pm$  DE 60,95  $\pm$  6,51 años; IMC: media  $\pm$  DE 24,96  $\pm$  3,34; Grado KL 0; Mujeres: n=25) y pacientes con artrosis de rodilla (grupo OA, edad: media  $\pm$  DE 67,42  $\pm$  6,45 años; IMC: media  $\pm$  DE 29,30  $\pm$  2,83; Grado KL 3 y 4; Mujeres, n=30).

Este proceso se llevó a cabo con el kit RiboPure<sup>TM</sup>-Blood Kit (Thermo Fisher Scientific, cat# AM1928). Brevemente, se tomaron 500  $\mu$ l de muestra previamente descongelada sobre la que se añadieron 800  $\mu$ l de solución de lisis, y 50  $\mu$ l de solución de Acetato Sódico que se agitó durante 30 segundos. A continuación, se añadieron 500  $\mu$ l de Fenol:Cloroformo durante 5 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó durante 1 minuto a 16,000 g y a temperatura ambiente para que se formasen las fases acuosa y orgánica. El ARN soluble en la fase acuosa se transfirió a un tubo eppendorf sobre el cual se añadió Etanol al 100% y se centrifugó a 16,000 g para que el ARN se adsorbiera a la membrana contenida en la columna. Seguidamente se realizaron tres lavados a 16,000 g durante 10 segundos a temperatura ambiente. El ARN adsorbido a la membrana se eluyó en dos pasos con 50  $\mu$ l/paso de solución de elución precalentada a 75°C. Finalmente, el ARN eluido (100  $\mu$ l) se volvió a someter a una centrifugación a 16,000 g durante 1 minuto y se determinó la concentración y calidad del ARN evaluando los ratios A260/280 y A260/230 con el *NanoDrop ND-1000*.

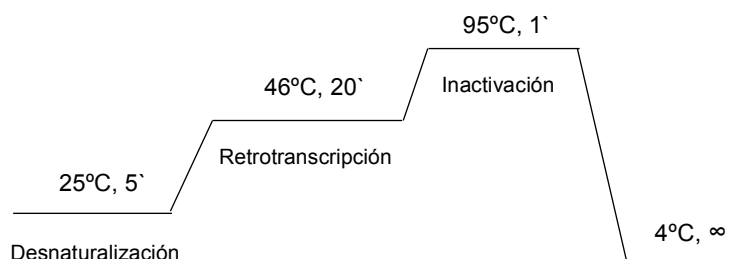
#### 4.2.1. Retrotranscripción de ARN obtenido a partir de sangre

Se retrotranscribieron 500 ng de ARN utilizando *iScript cDNA Synthesis Kit* (Bio-Rad, ref# 1708890). Para cada reacción se mezclaron en frío los reactivos descritos en la **Tabla 16**.

**Tabla 16.** Volumen de reactivos para la retrotranscripción de ARN a partir de muestras de sangre

Reactivo	Volumen por reacción
iScript Reaction Mix	4 µl
iScript Reverse Transcriptase	1 µl
H <sub>2</sub> O-DEPC	hasta 20 µl
ARN (500 ng)	-

El programa de retrotranscripción consistió en cuatro pasos que están representados en la **Figura 26**. Las muestras fueron almacenadas a 4°C hasta su posterior utilización en ensayos qPCR. La cuantificación de la expresión génica mediante PCR cuantitativa se llevó a cabo como se describe en el apartado 2.6.3.



**Figura 26.** Descripción gráfica de los pasos correspondientes a la retrotranscripción de ARN obtenido a partir de sangre

#### 4.3. Análisis de pacientes con artrosis de rodilla tratados con fibratos procedentes de la Cohorte *Osteoarthritis Initiative* (OAI)

Los materiales y métodos que se describen a continuación se llevaron a través de los datos de los pacientes de la Cohorte Osteoarthritis Initiative (OAI) y forman parte de una colaboración con los Drs. Ivan y Valery Shirinsky del *Scientific Research Institute of Clinical Immunology*, Novosibirsk, Rusia.

Para este estudio se emplearon datos de pacientes de un estudio observacional prospectivo, longitudinal y multicéntrico de un grupo de pacientes pertenecientes a la

cohorte OAI que tomaban o no fibratos y presentaban artrosis de rodilla. La cohorte OAI se divide en tres subgrupos:

- subcohorte de progresión: pacientes con artrosis de rodilla tibiofemoral sintomática. El número de participantes fue n=1390.
- subcohorte de incidencia: sujetos con riesgo de artrosis. El grupo de pacientes ascendió a n=3284.
- subcohorte de control de referencia. Participaron un total de n=122.

Los datos longitudinales se obtuvieron tanto de la subcohorte de progresión como de la de incidencia. Los criterios de inclusión que se establecieron fueron los siguientes:

- edad comprendida entre 45 - 79 años para las dos subcohortes.
- artrosis de rodilla tibiofemoral sintomática para la subcohorte de progresión.
- presencia de factores de riesgo que aumentasen la incidencia de la artrosis de rodilla para la subcohorte de incidencia.

Los participantes de la OAI fueron reclutados e inscritos entre Febrero de 2004 y Mayo de 2006 en cuatro centros de Estados Unidos. El estudio fue aprobado por los comités de cada centro y cada participante proporcionó su consentimiento firmado.

#### **4.3.1. Medidas clínicas**

Los datos longitudinales se obtuvieron a partir de las medidas clínicas realizadas durante el seguimiento. Las unidades clínicas calculadas fueron:

- altura: se midió en milímetros (mm) usando un estadiómetro de pared. Las medidas se realizaron dos veces en los pacientes con poca ropa, sin zapatos y durante la inspiración.
- peso corporal: se midió en kilogramos (kg) con una balanza. Se realizó dos veces en pacientes con poca ropa, sin zapatos, sin joyas y sin cartera.
- índice de masa corporal (IMC). Con los datos obtenidos de peso y altura se calculó el IMC aplicando la fórmula=  $\text{peso (kg)}/[\text{altura(cm)}]^2$ .

Además de los parámetros clínicos, se evaluó la actividad física y los niveles de dolor, función y rigidez usando las escalas PASE (242) (del inglés *Physical Activity Scale for the Elderly*) y WOMAC (243) (del inglés *Western Ontario McMaster Osteoarthritis Index*), respectivamente. Dichos cuestionarios fueron realizados antes de los reemplazamientos de rodilla que sufrieron varios pacientes tanto del grupo del

fenofibrato como del grupo control. Cada parámetro del cuestionario WOMAC fue evaluado en cada rodilla utilizando las puntuaciones más altas de cada uno de ellos para realizar el análisis. Los resultados finales fueron interpretados según los datos recogidos a nivel basal y anualmente hasta completar el periodo de seguimiento. Los valores WOMAC después del reemplazo articular fueron codificados como valores omitidos. Para evaluar la severidad de los síntomas de artrosis a cada parámetro que compone el cuestionario WOMAC se le asignó la siguiente puntuación:

- rango de dolor: 0-20
- rango de la función física: 0-68
- rango de la rigidez: 0-8

Para adquirir información acerca del uso de los fibratos se creó un método basado en el inventario de medicamentos. Para ello, cada paciente proporcionó información de la medicación que tomaba. Se recogieron datos del nombre de la marca ó bien se indicó si era genérico y se identificó el principio activo. A su vez, fueron cotejados e incluidos en una base de datos online de medicación. Los usuarios de fibratos se definieron como aquellos que registraron al menos un uso de este tipo de medicamentos durante el tiempo de estudio. Sin embargo, aquellos pacientes que iniciaron la toma durante el transcurso de esta observación fueron excluidos.

#### **4.3.2. Análisis estadísticos**

El método de emparejamiento genético fue el elegido para comparar los resultados clínicos obtenidos entre el grupo de pacientes que tomaban fibratos y el grupo que no los consumía. Este método se caracteriza por una combinación multivariable lo que permite distribuir en grupo tratamiento y grupo control según las características basales. Utiliza un algoritmo de búsqueda computacionalmente intensivo ofreciendo la posibilidad de realizar inferencias más robustas en comparación a otros modelos tradicionales. Por lo tanto, puede ser un método alternativo para reducir los sesgos siempre y cuando se disponga de una cantidad de datos suficiente (244). Hecho el emparejamiento genético las diferencias entre los dos grupos se consideraron significativas con un valor  $\geq 0,1$  (245). A continuación, se aplicó la herramienta de ecuaciones de estimación generalizadas (del inglés *generalized estimating equations*, GEE) para establecer una relación longitudinal de las medidas realizadas en el tiempo dependientes del uso de fibratos. Para evaluar los cambios de las medidas realizadas en el tiempo se estableció el coeficiente- $\beta$  definido por el usuario y la interacción en el tiempo (usuario\*interacción en el tiempo). Con ello se indicaron los cambios recogidos anualmente en los parámetros evaluados.

El método de emparejamiento genético requirió del paquete *Matching* del software R (versión 3.0.2). Para realizar el análisis de ecuaciones de estimación generalizada se usó otro paquete estadístico de R (versión 4.13-19).

## **5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Para verificar la distribución normal de los datos, usamos el test de Kolmogorov-Smirnov. En general, el conjunto de datos siguió una distribución normal. Las diferencias significativas entre dos grupos fueron determinadas por la *t-Student*, mientras que las diferencias entre múltiples grupos se determinó mediante un análisis de varianza (ANOVA) junto con el test de comparaciones múltiples Tukey. Los datos de los análisis y la inferencia estadística se interpretaron con el *software* Prism 6.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). Los resultados se representaron según la media  $\pm$  SEM. Los p valores menos de 0.05 fueron considerados significativos.

## **RESULTADOS**

## 1. IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS SENOTERAPÉUTICOS Y MODULADORES DE AUTOFAGIA MEDIANTE TÉCNICAS DE CRIBADO DE ALTO RENDIMIENTO

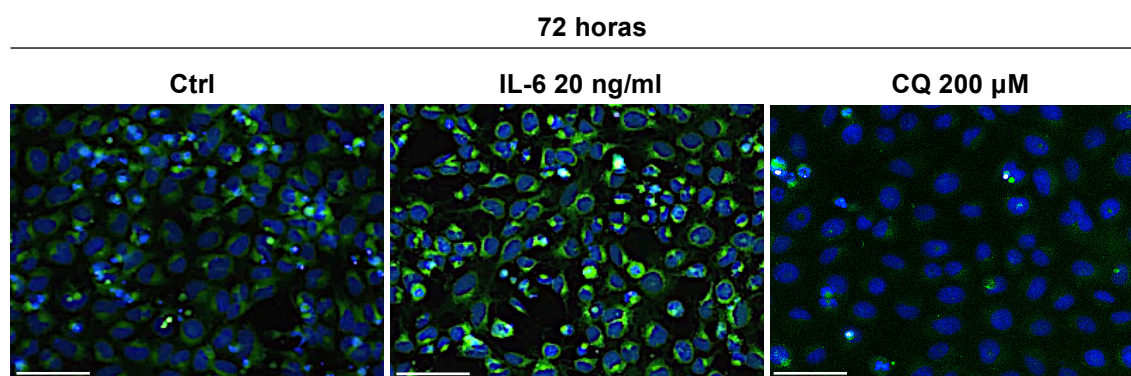
### 1.1. La IL-6 induce senescencia y disminuye el flujo de autofagia en condrocitos humanos

Para cuantificar la senescencia en condrocitos tratados con IL-6, se determinó la actividad fluorescente de la enzima asociada a senescencia  $\beta$ -Galactosidasa (SA- $\beta$ -Gal) mediante el sustrato C<sub>12</sub>FDG. El flujo de autofagia se evaluó cuantificando la relación de intensidad fluorescente del constructo mCherryEGFP<sub>LC3</sub>, que permitió monitorizar el alto o bajo flujo de autofagia que presentaban los condrocitos en función de los cambios de pH que experimentaban, lo que se tradujo en un cambio de fluorescencia.

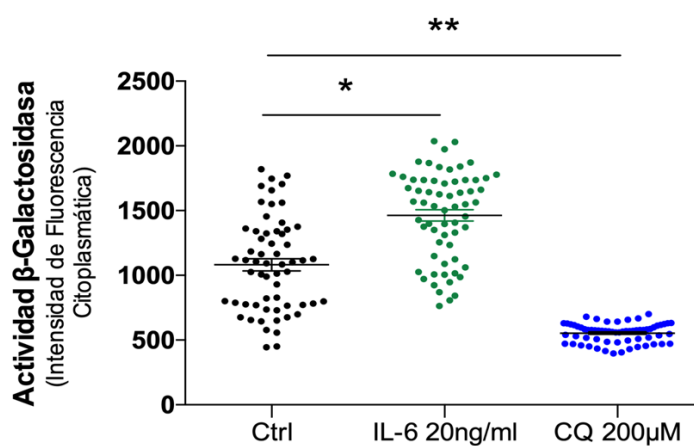
Los resultados mostraron que 72 horas después del tratamiento con IL-6 (20ng/ml), los condrocitos presentaron una mayor actividad de la enzima SA- $\beta$ -Gal (**Figura 27 A y B**). Además, el tratamiento con IL-6 durante 18 horas provocó una disminución del flujo de autofagia, representado por un descenso en el ratio mCherry/EGFP (**Figura 28 A y B**).

Como control negativo de senescencia y de flujo de autofagia, se empleó Cloroquina, un inhibidor de la actividad  $\beta$ -Galactosidasa y de la degradación lisosomal.

A



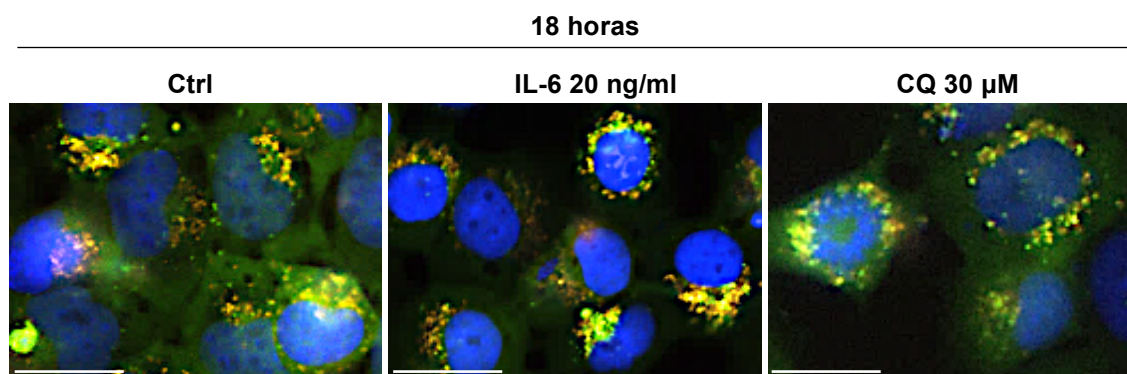
B



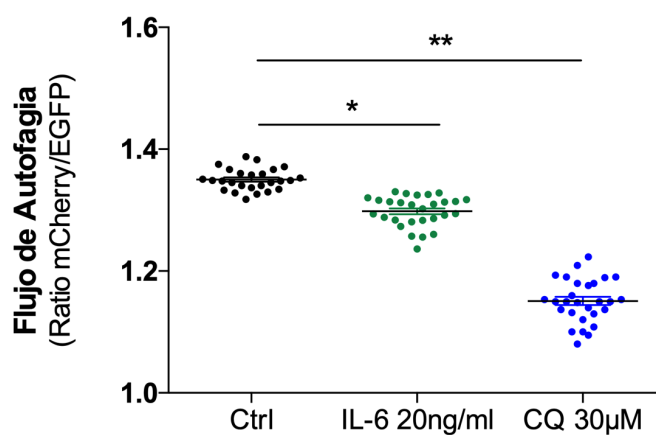
**Figura 27. La IL-6 incrementó la actividad de la enzima SA- $\beta$ -Galactosidasa en condrocitos humanos.** **A**, Detección de la actividad SA- $\beta$ -Gal a través de la intensidad de fluorescencia emitida por el fluoróforo C<sub>12</sub>FDG unido a la enzima. Los condrocitos humanos, T/C28a2, se incubaron con IL-6 (20ng/ml) durante 72 horas. La Cloroquina (CQ, 200 $\mu$ M) se incubó durante 30 minutos. Escala 100  $\mu$ m. **B**, Cuantificación de la fluorescencia emitida por la enzima  $\beta$ -Galactosidasa. Los resultados se corresponden con la media  $\pm$  SEM de tres experimentos independientes con 16 réplicas en cada uno de ellos, \* $p$ <0.0001 vs. Ctrl; \*\* $p$ <0.0001 versus (vs.) Ctrl, se aplicó un test *t-Student* no pareado y paramétrico.



A



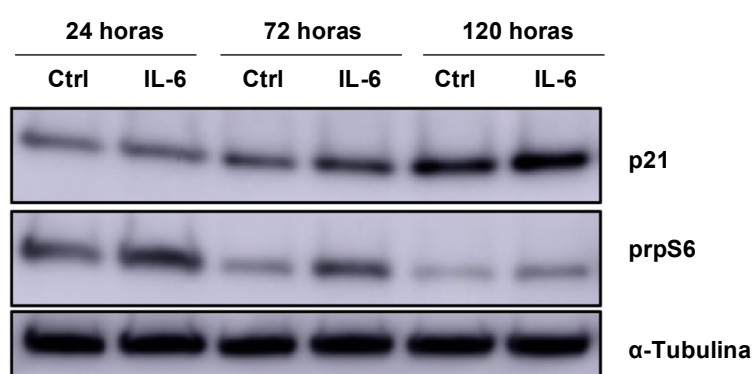
B



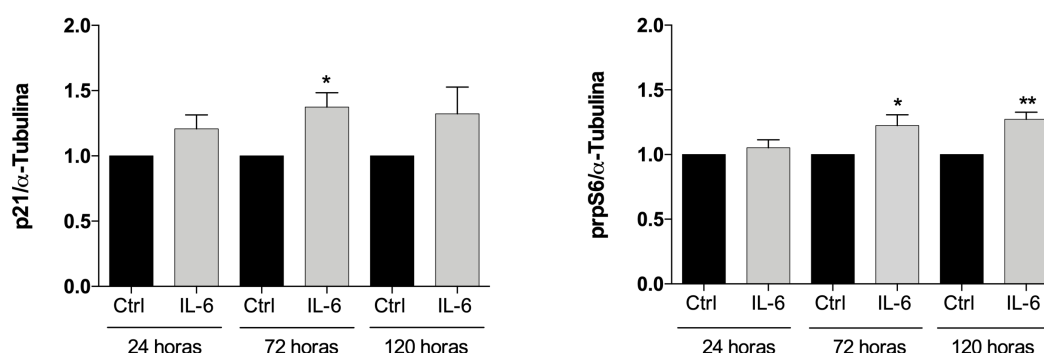
**Figura 28. La IL-6 disminuyó el flujo de autofagia en condrocitos humanos.** **A**, Detección del flujo de autofagia a través de la intensidad fluorescente emitida por el constructo mCherry-EGFP/PLC3. Los condrocitos humanos, T/C28a2, se incubaron con IL-6 (20 ng/ml) y CQ (30  $\mu$ M) durante 18 horas. Si la relación mCherry/EGFP  $\geq$  1, predomina la fluorescencia roja-anaranjada, lo que se traduce en un alto flujo de autofagia. Por el contrario, si la relación mCherry/EGFP  $<$  1, la fluorescencia es predominantemente verde y el flujo de autofagia es considerado bajo. Escala 50  $\mu$ m **B**, Cuantificación del flujo de autofagia según la intensidad relativa de fluorescencia emitida. Los resultados se corresponden con la media  $\pm$  SEM de 28 réplicas por condición, \* $p < 0.0001$ , \*\* $p < 0.0001$  vs. Ctrl, se aplicó un test *t-Student* no pareado y paramétrico.

Para confirmar estos resultados, los condrocitos humanos T/C28a2 fueron tratados con IL-6 (20 ng/ml) a diferentes tiempos (24, 72 y 120 horas). Los resultados mostraron un incremento en la expresión de marcadores de senescencia, como p21 y de la ruta de señalización de mTOR, regulador negativo más importante del proceso de autofagia, a través de la activación de la forma fosforilada de la proteína ribosomal S6 (prpS6) (**Figura 29A**). Los resultados obtenidos mostraron un incremento de ambos marcadores, siendo significativos a las 72 horas para p21 y a las 72 y 120 horas para prpS6 (**Figura 29 B y C**).

A



B



**Figura 29. La IL-6 incrementó la expresión de marcadores de senescencia y de inhibición de autofagia en condrocitos humanos.** **A**, Los condrocitos humanos T/C28a2 fueron tratados con IL-6 (20 ng/ml) durante 24, 72 y 120 horas. Mediante Western blot se evaluó la expresión de p21 y prpS6. Como control de carga se empleó la  $\alpha$ -Tubulina. **B**, Cuantificación de la expresión de p21. Los datos de la densitometría se corresponden con la media  $\pm$  SEM de 3 experimentos independientes, \* $p < 0.001$  vs. Ctrl 72 horas. **C**, Cuantificación de la expresión de prpS6. Los datos de la densitometría se corresponden con la media  $\pm$  SEM de 3 experimentos independientes, \* $p < 0.001$  vs. Ctrl 72 horas; \*\* $p < 0.001$  vs. Ctrl 120 horas, aplicándose un test *t-Student* no pareado y paramétrico.

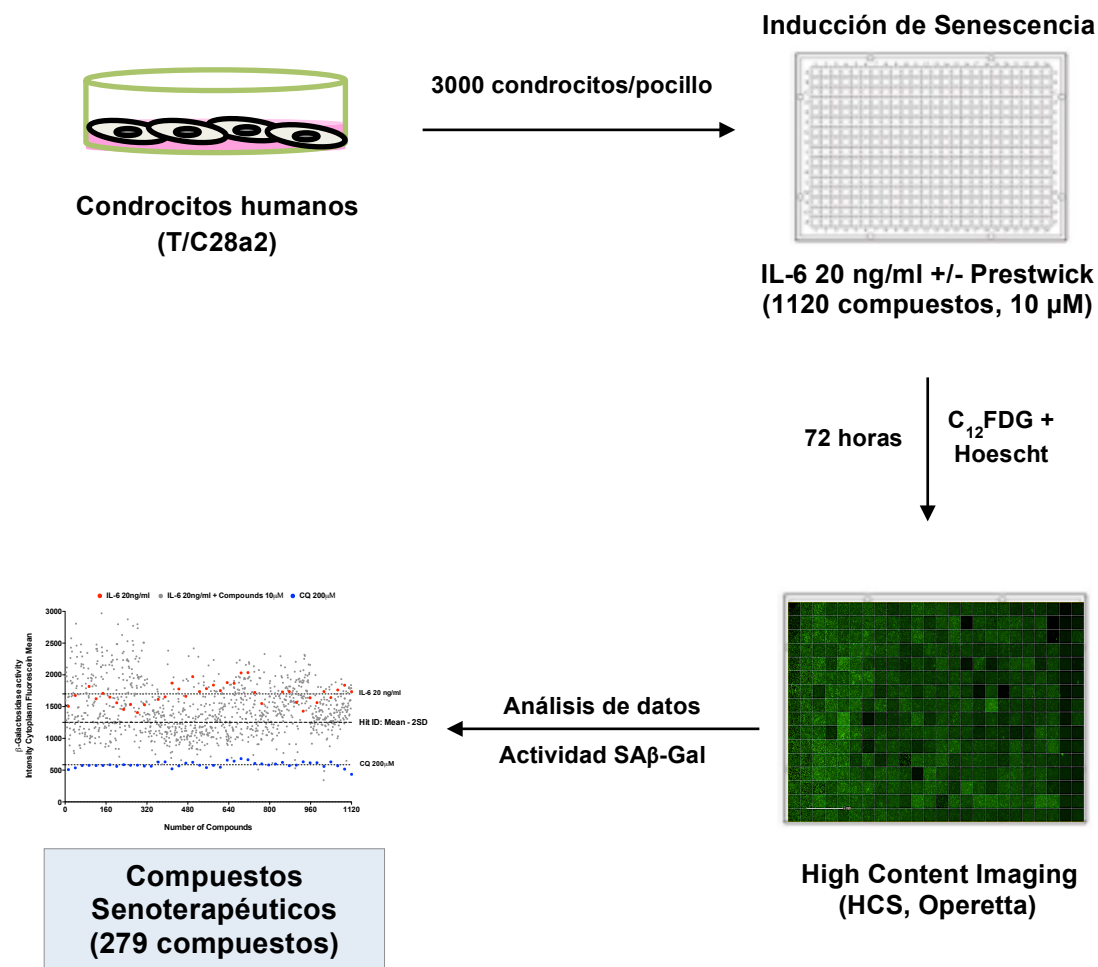
## 1.2. Identificación de compuestos senoterapéuticos mediante técnicas de imagen

### 1.2.1. Desarrollo de ensayo

Para la identificación de compuestos con actividad senoterapéutica y pro-autofágica se emplearon técnicas de cribado de alto rendimiento (*HTS en inglés*) basadas en imagen que se dividieron en dos etapas: *Screening Primario*, para la identificación de compuestos senoterapéuticos y *Screening Secundario*, para la identificación de compuestos pro-autofágicos.

La estrategia preclínica empleada en el *Screening Primario (Figura 30)* incluyó un ensayo fenotípico en el que se evaluó la actividad de la enzima SA- $\beta$ -Gal en respuesta a la IL-6 (20 ng/ml) y a los compuestos de la quimioteca de reposicionamiento Prestwick (10  $\mu$ M). Para ello, los condrocitos T/C28a2 fueron tratados con IL-6 sola y en combinación con los compuestos de la quimioteca durante 72 horas. Posteriormente, la actividad SA- $\beta$ -Gal y el número de núcleos celulares se cuantificaron mediante el sustrato fluorescente C<sub>12</sub>FDG y el marcador nuclear fluorescente Hoechst 33342, respectivamente. Ambas fluorescencias se detectaron con el Operetta, un sistema automático de microscopía confocal (HCS) que combina la tecnología de imagen de alta resolución con herramientas bioinformáticas de análisis. Finalizada la lectura se aplicaron algoritmos de imagen con el *software* Harmony para obtener los resultados de actividad y número de células.

## Screening primario



**Figura 30. Etapas del Screening primario.** Se sembraron 3000 condrocitos humanos T/C28a2 por pocillo en placas de 384 pocillos. Se añadió IL-6 (20ng/ml) +/- los compuestos de la Quimioteca Prestwick (10 μM) durante 72 horas. CQ 200μM se añadió durante 30 minutos. A continuación, se incubó con C12FDG (10 μM) y Hoechst 33342 (2,5 μg/ml) como se describe en el capítulo de Materiales y Métodos. Finalmente, las células se fijaron y se cuantificó la actividad SA-β-Gal en el Operetta con el *software* Harmony.

### 1.2.2. Screening primario

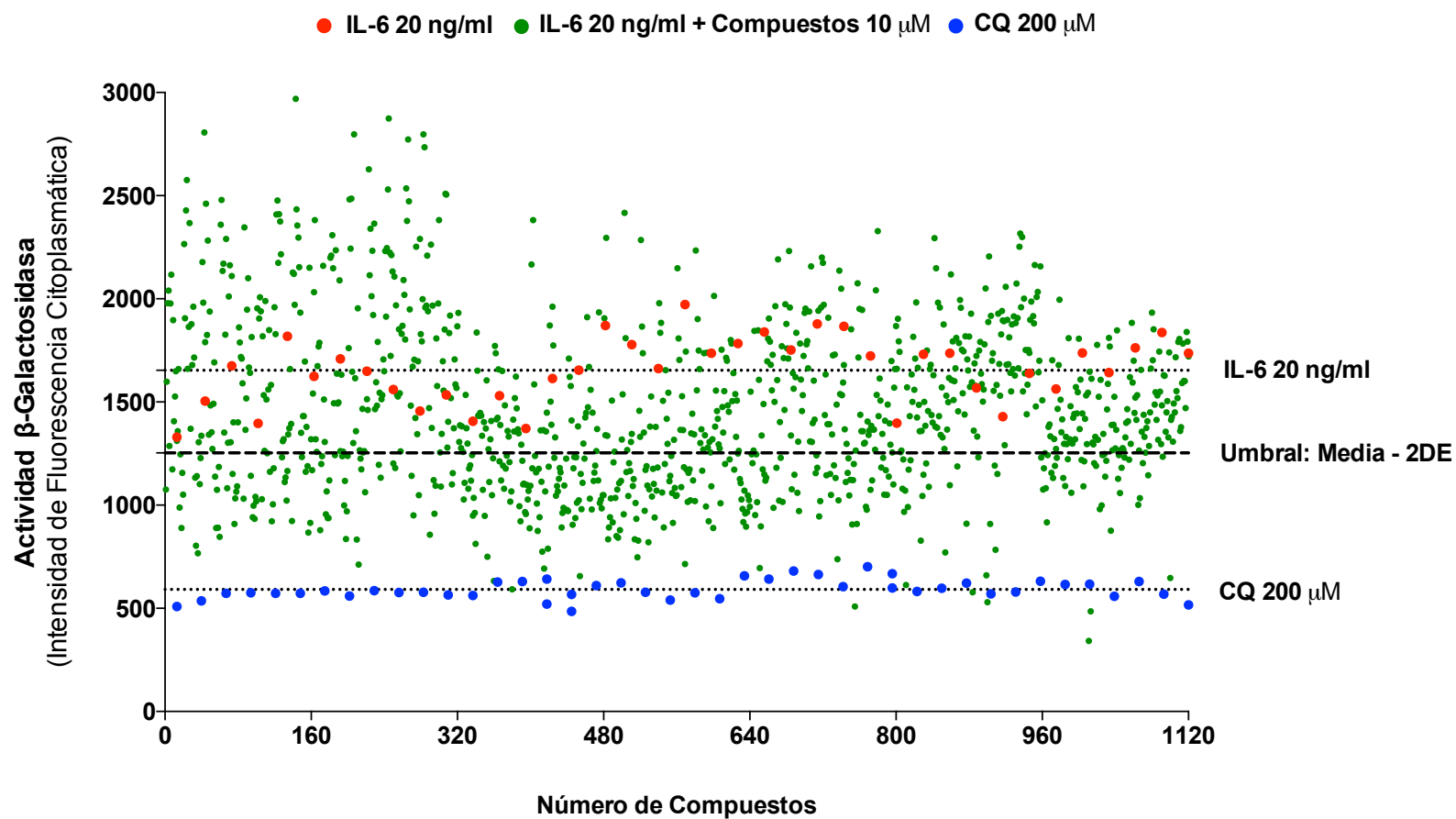
Los ensayos de HTS no sólo permiten usar pequeños volúmenes de muestra o presentar alto rendimiento y robustez. Además de esto, requieren ser sensibles, reproducibles y exactos para seleccionar los compuestos entre una gran variedad de ellos. La capacidad de identificar moléculas con este tipo de técnicas depende de la calidad de cada ensayo que se determina a través del cálculo de una serie de parámetros métricos.

Las variables y sus respectivos valores que se calcularon para evaluar la idoneidad del ensayo e identificar compuestos *hits* a partir de la quimioteca de reposicionamiento Prestwick se recogen en la **Tabla 17**. Por ser un criterio propio de técnicas de HTS, el principal parámetro de calidad se corresponde con el factor  $Z'$ . Sus valores deben oscilar entre 0,5 – 1 para confirmar la validez del estudio. Las fórmulas matemáticas de cada parámetro estadístico se recogen en el capítulo de *Materiales y Métodos*. Para su cálculo se emplearon los valores de la media de la intensidad fluorescente obtenidos del control positivo (IL-6 20 ng/ml) y del control negativo (CQ 200  $\mu$ M) y de sus respectivas desviaciones estándar (**Figura 49 de Resultados anexos**).

**Tabla 17. Valor de los parámetros estadísticos obtenidos en el Screening primario**

Parámetros estadísticos	Placa 1	Placa 2	Placa 3	Placa 4
<b>s/b</b>	2,7	3	2,8	2,2
<b>CV</b>	0,1	0,1	0,1	0,1
<b>Z'</b>	0,5	0,6	0,5	0,5

Una vez determinada la calidad del cribado se inició la selección de compuestos. El objetivo fue seleccionar aquellos que disminuyeran la intensidad de fluorescencia asociada a la actividad SA- $\beta$ -Gal en respuesta a la IL-6. El criterio empleado consistió en fijar un valor umbral calculado a partir de la media del control positivo menos dos veces la desviación estándar (Media – 2 DE). Todos los compuestos con un valor de intensidad fluorescente igual o inferior al valor umbral fueron seleccionados mientras que los que emitieron fluorescencia superior al valor umbral fueron descartados (**Figura 31**). Finalmente se identificaron 279 compuestos con actividad Senoterapéutica.



**Figura 31. Representación de *scatter plot* correspondiente al *Screening* primario.** Representación de la intensidad de fluorescencia frente a la identidad de cada compuesto. El control positivo de senescencia celular (IL-6 20 ng/ml) fue identificado con puntos de color rojo. El control negativo (CQ 200  $\mu$ M) se representó con puntos de color azul. La actividad de los compuestos en respuesta a IL-6 se representó con puntos de color verde. Las líneas negras con trazos discontinuos representan el valor umbral fijado y a la media de cada control.

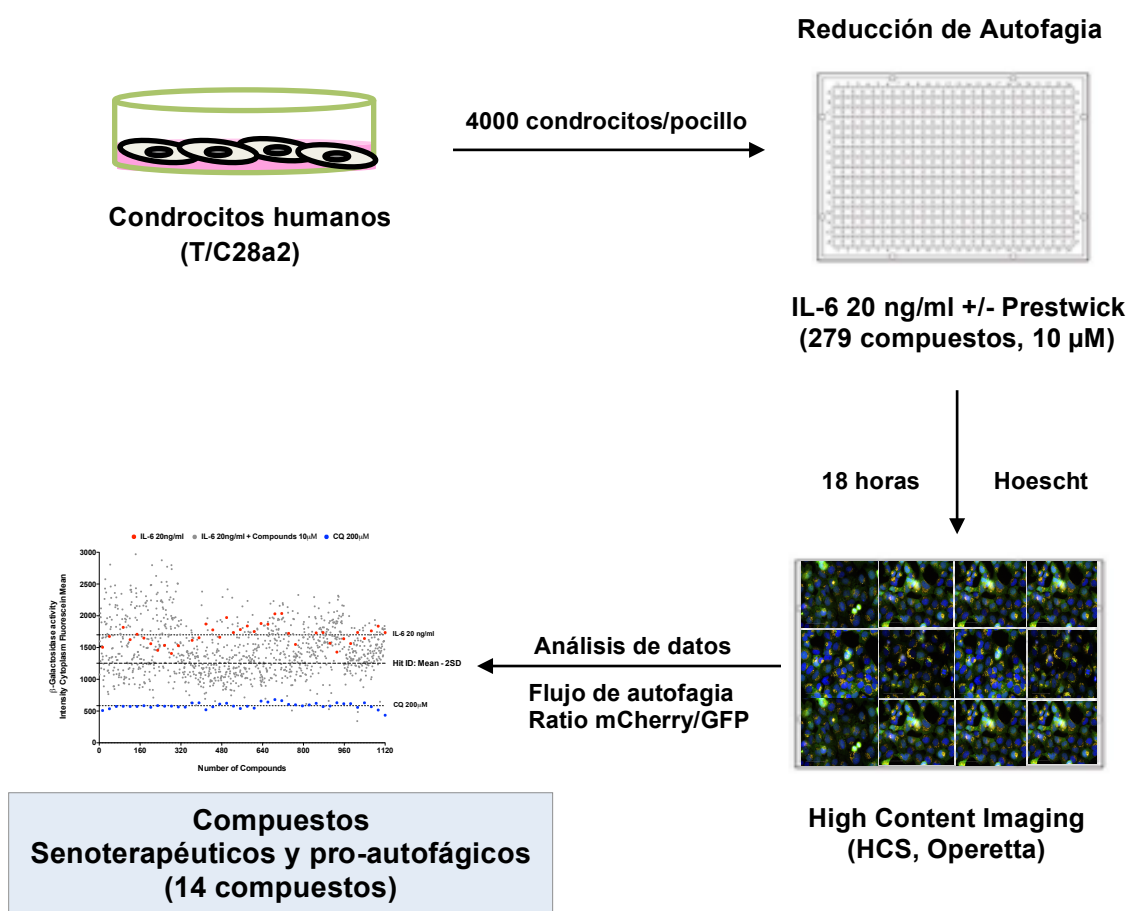
### 1.3. Identificación de compuestos moduladores de autofagia mediante técnicas de imagen

#### 1.3.1. Desarrollo de ensayo

El objetivo del *Screening* secundario fue identificar compuestos con actividad pro-autofágica en condrocitos humanos. Este *screening* se realizó sobre el grupo de compuestos senoterapéuticos identificados en el *Screening* primario.

La técnica empleada se basó en monitorizar el flujo de autofagia ya que la ruta de señalización de autofagia es un proceso dinámico. Para ello se insertó el constructo mCherry-EGFPLC3 en los condrocitos humano T/C28a2, lo que permitió estudiar el flujo de autofagia calculando la relación de fluorescencias mCherry/EGFP (**Figura 32**). Para observar este cambio de fluorescencia e identificar compuestos con alto flujo de autofagia, los condrocitos se incubaron con IL-6 (20 ng/ml) sola y en presencia de los 279 compuestos senoterapéuticos identificados (10  $\mu$ M) durante 18 horas. Como control positivo se empleó la condición de bajo aporte de nutrientes (2% STF) y como control negativo la CQ (30  $\mu$ M). Finalizado el tiempo de incubación, los condrocitos se incubaron con Hoechst 33342 para la cuantificación de los núcleos celulares. Finalmente, la lectura se realizó con el sistema de HTS Operetta, seguida del análisis de la intensidad de fluorescencias con el *software* Harmony.

## Screening secundario



**Figura 32. Etapas del Screening secundario.** Se sembraron 4000 condrocitos humanos T/C28a2-mCherry-EGFP/PLC3 por pocillo en placas de 384 pocillos. Se añadió IL-6 (20ng/ml) +/- 279 compuestos de la Quimioteca Prestwick (10  $\mu$ M) obtenidos en el screening primario durante 18 horas. Como control positivo del flujo de autofagia se utilizó 2% STF y como control negativo CQ 30  $\mu$ M. Finalmente, se identificaron los núcleos celulares con Hoechst 33342 (2,5  $\mu$ g/ml). Finalmente, las células se fijaron y se cuantificó la relación mCherry/GFP en el Operetta con el *software* Harmony.



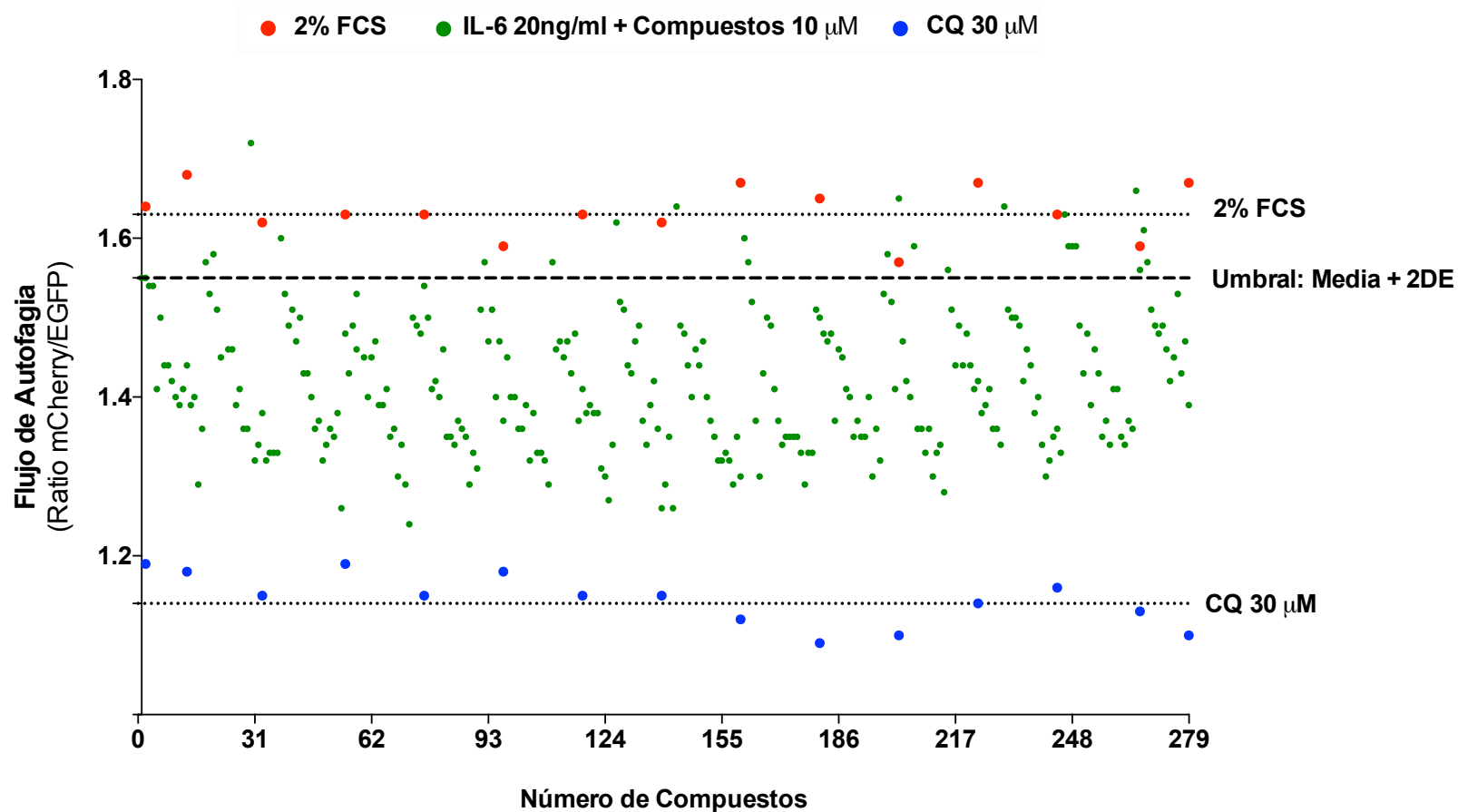
### 1.3.2. Screening Secundario

La segunda estrategia elegida para identificar compuestos moduladores de autofagia consistió en estudiar el flujo de autofagia en los 279 compuestos identificados como senoterapéuticos en el *screening* primario.

La calidad del ensayo se determinó calculando los mismos parámetros estadísticos que en el primer ensayo (**Tabla 18**). Para ello se consideró la condición de bajo aporte de nutrientes (2% STF) como control positivo y la CQ (30  $\mu$ M) como control negativo (**Figura 50 de Resultados anexos**). El umbral de selección se fijó calculando la media de la relación mCherry/EGFP de la intensidad fluorescente emitida por las células después de ser tratadas con los compuestos en respuesta a la IL-6. A este valor se le sumó dos veces la desviación estándar (Media + 2DE) lo que permitió identificar aquellos compuestos que presentaban una relación mCherry/EGFP igual o superior al fijado como umbral obteniéndose un total de 14 compuestos con una actividad senoterapéutica y pro-autofágica (**Figura 33**).

**Tabla 18.** Valor de los parámetros estadísticos obtenidos en el *screening* secundario

Parámetros estadísticos	Valores
s/b	1,43
CV	0,03
Z'	0,5



**Figura 33. Representación de *scatter plot* correspondiente al *Screening* secundario.** Representación de la relación de fluorescencia mCherry/EGFP emitida por los condrocitos tratados con los 279 compuestos senoterapéuticos. El control positivo del flujo de autofagia (2% STF) fue identificado con puntos en color rojo. El control negativo (CQ 30µM) se corresponde con los puntos en color azul. El flujo de autofagia de los compuestos en respuesta a IL-6 se representó con puntos de color verde. Las líneas discontinuas con trazos negros hacen referencia al valor umbral fijado y a la media de cada control.

#### 1.4. Compuestos y dianas terapéuticas identificadas a partir de un screening de reposicionamiento

El reposicionamiento de fármacos es una estrategia empleada en el descubrimiento de fármacos que se basa en el uso de quimiotecas formadas por compuestos aprobados por las agencias del medicamento y que actualmente se usan en la clínica. Con ello se reducen los años de investigación y costes económicos debido a que sus estudios de seguridad en humanos ya están aprobados y ofrecen la oportunidad de encontrar nuevas indicaciones terapéuticas para estas moléculas. Las herramientas disponibles que se emplean ofrecen la posibilidad de acceder a la información química y clínica de la diana terapéutica y de la molécula de interés.

El empleo de la quimioteca de reposicionamiento Prestwick nos permitió identificar 14 compuestos (*hits* 1,25%) con efecto senoterapéutico y pro- autofágico obtenidas en el *screening* primario y secundario (**Tabla 19**). Para acceder a los datos farmacológicos, de vías moleculares, de nomenclatura, de estructura química o de otras propiedades de cada compuesto identificado se utilizaron diferentes bases de datos: *DrugBank* (<https://www.drugbank.ca>), *Therapeutic Target Database* (TTD, <https://db.idrblab.org/ttd/>) y *PubChem* (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Los compuestos identificados se dirigieron principalmente a los canales iónicos y los receptores hormonales relacionados con el metabolismo. A partir de los resultados obtenidos de intensidad de fluorescencia citoplasmática SA- $\beta$ -Gal, del número de núcleos celulares, y del flujo de autofagia y tras obtener información del mecanismo de acción y de su aplicación terapéutica, se escogió como candidato al Fenofibrato (FN), un derivado del ácido fíbrico con propiedades hipolipemiantes, reduciendo los niveles de colesterol y de triglicéridos en sangre, a través de la activación del receptor nuclear de proliferación de los peroxisomas alpha (PPAR $\alpha$ ) (246). El mecanismo de acción del FN se consideró relevante para la homeostasis de los condrocitos por lo que se seleccionó para los estudios de confirmación.

**Tabla 19. Lista de compuestos y sus correspondientes dianas identificadas en el screening primario y secundario.** Descripción de los datos obtenidos de intensidad fluorescente citoplasmática  $\beta$ -Gal, del número de células y del flujo de autofagia según el ratio mCherry/EGFP, además de la diana terapéutica sobre la cual actúan.

Compuestos	Actividad $\beta$ -Gal	Número de Células	Flujo de Autofagia	Diana Terapéutica
Hidrocloruro de Bupivacaína	1142	865	1,60	Canales de Na <sup>+</sup> y Receptor E2 de Prostaglandina
Minoxidilo	1185	950	1,59	Canales de K <sup>+</sup>
<b>Fenofibrato</b>	<b>1234</b>	<b>997</b>	<b>1,57</b>	<b>Receptor nuclear PPAR<math>\alpha</math></b>
Bitartrato de Pentolinio	1162	964	1,59	Receptor Nicotínico de Acetilcolina
Tomatine	1142	970	1,57	Factor de transcripción NF $\kappa$ B
Hidrocloruro de Bencidamina	1196	1016	1,57	Ciclooxigenasa
Hidrocloruro de Ciproheptadina	1031	914	1,6	Receptor H1 de Histamina y Serotonina
Hidrocloruro de Lomefloxacin	1155	1046	1,58	Topoisomerasa IV y ADN girasa bacterianas
Flutamida	1091	995	1,57	Receptor Andrógeno
Digitoxigenina	1382	1262	1,59	Bomba Na <sup>+</sup> K <sup>+</sup> ATPasa
Sulfato de Guanltidina	1101	1030	1,58	Transportador de Noradrenalina dependiente de Na <sup>+</sup>
Antipirina	997	1046	1,61	Ciclooxigenasa
Astemizol	713	770	1,63	Receptor H1 de Histamina
Ferfenazina	879	985	1,62	Receptor D2 de Dopamina

## 2. CONFIRMACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DEL FENOFIBRATO

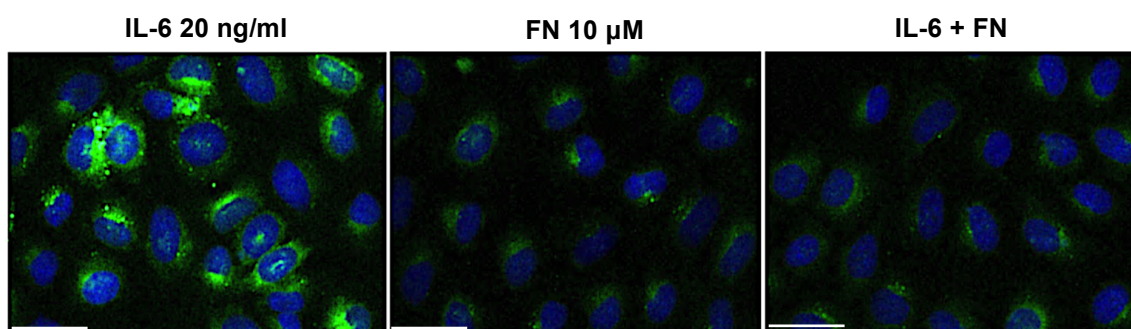
En los ensayos de HTS es imprescindible realizar estudios de confirmación para demostrar la reproducibilidad y la eficacia del compuestos y dianas identificadas.

### 2.1. El FN reduce la senescencia celular y activa el flujo de autofagia en condrocitos humanos tratados con IL-6

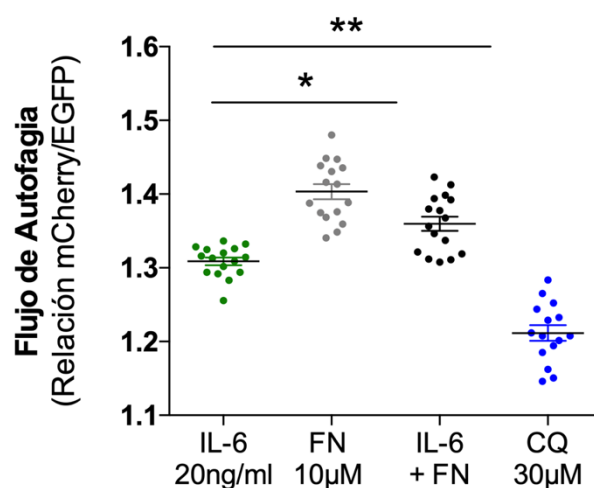
Para evaluar el efecto del FN sobre la senescencia celular inducida por IL-6, se empleó el sustrato fluorescente  $C_{12}$ FDG para estudiar la actividad de SA- $\beta$ -Gal a las 72 horas post-tratamiento. Los resultados de imagen confirmaron un aumento de la actividad SA- $\beta$ -Gal con IL-6 y una disminución de la misma cuando las células fueron tratadas con FN (**Figura 34A**). La actividad SA- $\beta$ -Gal se cuantificó en función de la intensidad de fluorescencia citoplasmática emitida por las células (**Figura 34B**).

Para estudiar el efecto del FN sobre la disminución del flujo de autofagia inducida por IL-6, se empleó la línea celular reportera de autofagia T/C28a2-mCherry-EGFP-pBAGE a las 18 post-tratamiento. El análisis de imagen indicó un aumento de la intensidad de fluorescencia verde GFP en las condiciones de IL-6 y CQ lo que se traduce en un bajo flujo de autofagia. Por el contrario, cuando los condrocitos fueron tratados con FN predominó la coloración rojo-anaranjada (mCherry) indicando un alto flujo de autofagia (**Figura 35A**). La cuantificación del flujo de autofagia se estableció mediante el ratio de fluorescencias mCherry/EGFP (**Figura 35B**).

A

SA- $\beta$ -Gal (72 horas)

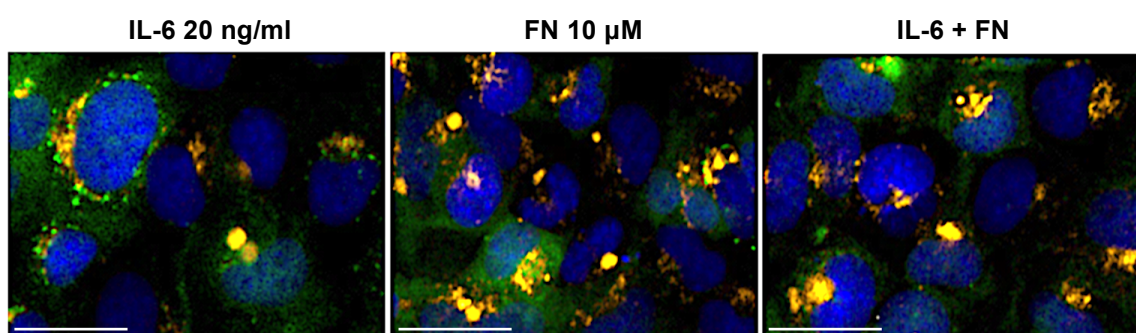
B



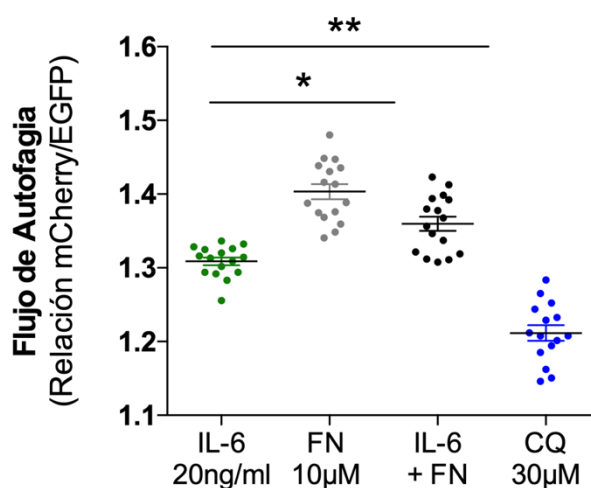
**Figura 34. El FN disminuyó la actividad de la enzima  $\beta$ -Galactosidasa.** **A**, Detección de la actividad SA- $\beta$ -Gal a través de la intensidad fluorescente emitida por el fluoróforo C12FDG unido a la enzima. Para ello, se sembraron 3000 chondrocitos T/C28a2 por pocillo en placas de 384 pocillos. Las células fueron incubadas con IL-6 (20 ng/ml), o con FN (10  $\mu$ M) o con la combinación de las dos estímulos durante 72 horas. La CQ, 200  $\mu$ M se añadió durante 30 minutos al final del tratamiento. Escala 100 $\mu$ m. **B**, Cuantificación de la fluorescencia emitida por la enzima  $\beta$ -Galactosidasa a través del sustrato C12FDG. Los resultados se corresponden con la media  $\pm$  SEM de un experimento de 30 réplicas / condición, \* $p < 0.0001$ , \*\* $p < 0.0001$  vs. IL-6, y se aplicó un test *t-Student* no pareado y paramétrico.

A

## Flujo de Autofagia (18 horas)



B



**Figura 35. El FN incrementó el flujo de autofagia en respuesta a IL-6.** **A**, Detección por técnicas de imagen del flujo de autofagia a través de la intensidad fluorescente emitida por el constructo mCherry-EGFP/PLC3 en los condrocitos humanos T/C28a2. Para ello, se sembraron 4000 células por pocillo en placas de 384 pocillos. Las células fueron incubadas durante 18 horas con IL-6 (20 ng/ml), o con FN (10  $\mu$ M), o con la combinación de ambos estímulos. La CQ (30 $\mu$ M) se empleó como control negativo del flujo de autofagia. Escala 50  $\mu$ m. **B**, Cuantificación del flujo de autofagia a través de la relación mCherry/EGFP. Los resultados se corresponden con la media  $\pm$  SEM de un experimento de 16 réplicas por condición, \* $p$ <0.0001, \*\* $p$ <0.0001 vs. IL-6, y se aplicó un test *t-Student* no pareado y paramétrico.

## 2.2. El FN no afecta a la viabilidad de los condrocitos

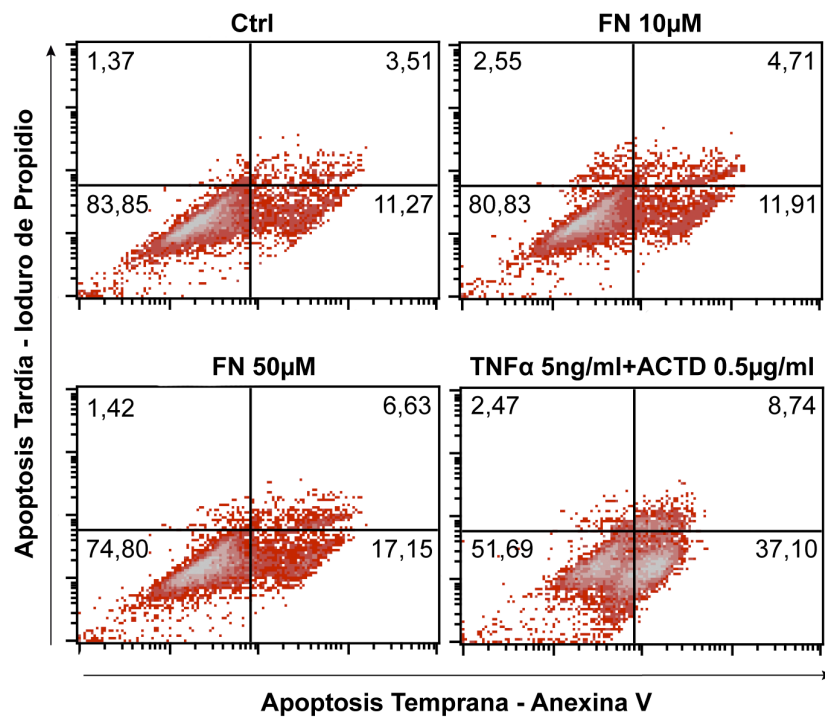
El FN es un fármaco aprobado por las agencias del medicamento americana y europea (FDA y EMA), lo que le confiere seguridad y eficacia en humanos, por lo que el siguiente objetivo se centró en evaluar el efecto del FN sobre la viabilidad de los condrocitos humanos.

En este sentido, se evaluó el efecto del FN sobre la muerte celular por apoptosis en condrocitos primarios procedentes de pacientes con artrosis, mediante la cuantificación de la muerte celular por apoptosis temprana y tardía. Para ello, se emplearon dos fluoróforos, Anexina-V y Ioduro de Propidio (IP), como se describe en el capítulo de Materiales y Métodos.

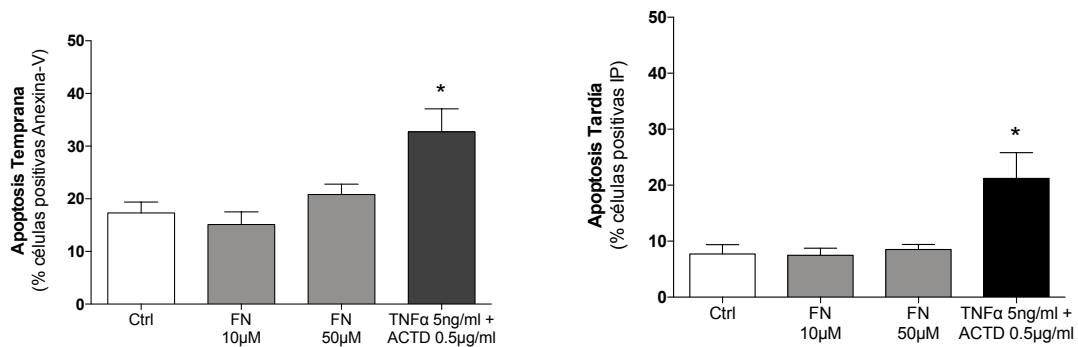
Los resultados indicaron que el tratamiento con FN a diferentes concentraciones, 10 $\mu$ M (concentración del *screening*) y a una concentración más elevada de 50  $\mu$ M., no afectó a la viabilidad de los condrocitos (**Figura 36 A y B**). Como control positivo de muerte por apoptosis se empleó la combinación de TNF $\alpha$  (5 ng/ml) y Actinomicina D (ACTD, 0,5  $\mu$ g/ml).



A



B



**Figura 36. El FN no induce muerte celular por apoptosis en condrocitos humanos. A,** Representación en cuadrantes de la muerte celular de apoptosis. El eje de las X representa la apoptosis temprana (Anexina-V) y el eje de las Y representa la apoptosis tardía. **B,** Cuantificación del número de células positivas en Anexina-V y IP mediante citometría de flujo. Los resultados se corresponden con la media  $\pm$  SEM de tres donantes independientes, \* $p < 0.05$  vs. Ctrl, se aplicó un test *t-Student* no pareado y paramétrico.

### 2.3. Caracterización del efecto senoterapéutico en condrocitos humanos

Después de identificar al FN como un compuesto con actividad senoterapéutica, el siguiente paso fue su caracterización como compuesto senomórfico o senolítico en función de su efecto sobre las células senescentes (180). En este sentido se ha demostrado que la eliminación selectiva de células senescentes mediante el empleo de compuestos senolíticos presentó un efecto terapéutico en enfermedades relacionadas con el envejecimiento (247).

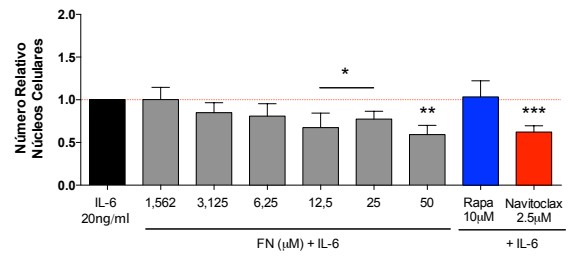
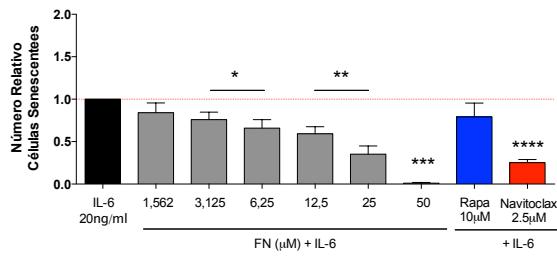
#### 2.3.1. La activación de PPAR $\alpha$ presenta un efecto senolítico

Para la caracterización del efecto senoterapéutico del FN y de otros agonistas del receptor PPAR $\alpha$  como el CP775146 (CP) y el GW7647 (GW) se emplearon condrocitos humanos T/C28a2 estimulados con dosis crecientes de los compuestos (1,56  $\mu$ M – 50  $\mu$ M) durante 72 horas en respuesta a IL-6 (20 ng/ml). Al igual que en los anteriores ensayos, el efecto senoterapéutico se determinó mediante la detección y posterior análisis de la actividad de la enzima SA- $\beta$ -Gal a través del sustrato fluorescente C<sub>12</sub>FDG (**Figura 37D**).

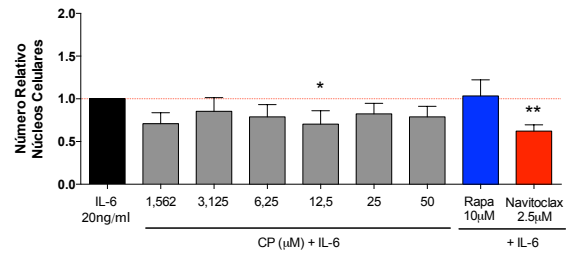
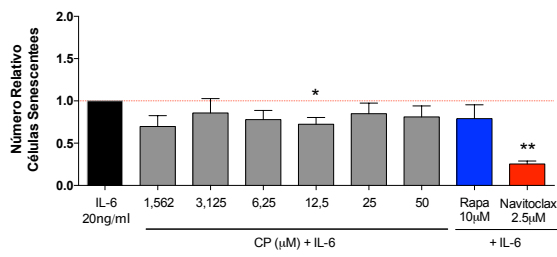
Como controles se emplearon el Navitoclax (2,5  $\mu$ M) y la Rapamicina (10  $\mu$ M), compuestos de referencia por su efecto senolítico y senomórfico, respectivamente (180). Los resultados mostraron que el tratamiento con FN disminuyó el número de células positivas en C<sub>12</sub>FDG y el número de núcleos celulares en respuesta a IL-6 (**Figura 37A**) de forma similar al compuesto senolítico Navitoclax. El perfil senolítico del compuesto CP sólo se evidenció a la concentración de 12,5  $\mu$ M (**Figura 37B**), mientras que el agonista GW presentó un comportamiento similar a FN a excepción de la dosis de 50  $\mu$ M a la cual presentó un efecto tóxico (**Figura 37C**).

Los resultados obtenidos indicaron que la activación de PPAR $\alpha$  presenta un efecto senolítico en condrocitos humanos.

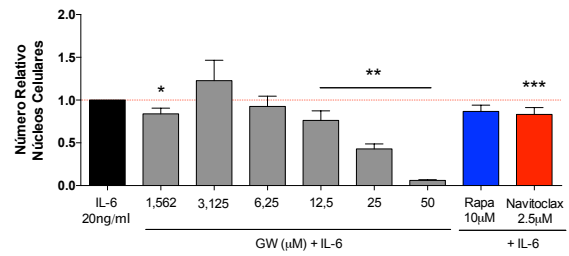
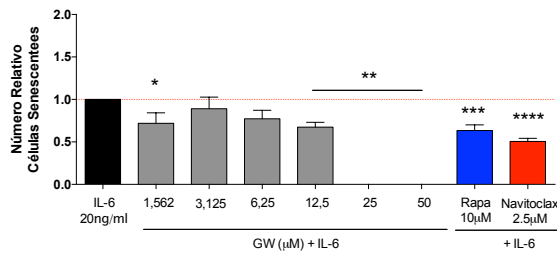
**A**



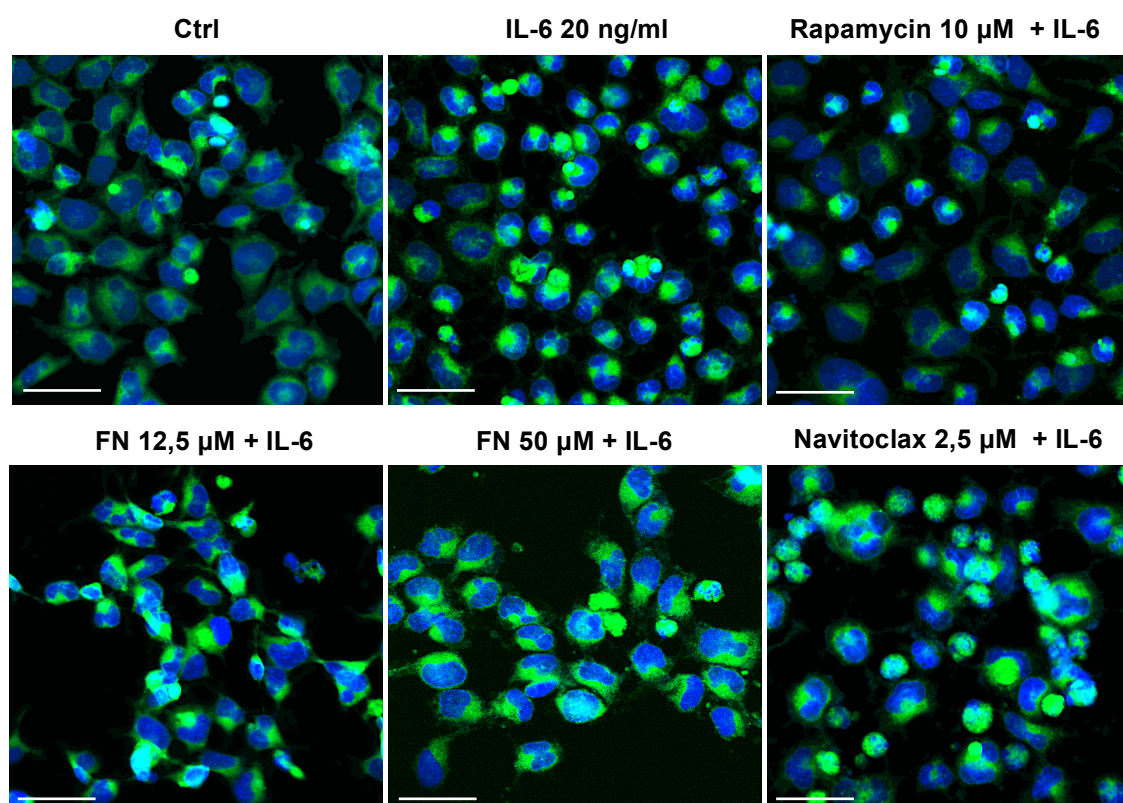
**B**



**C**



D



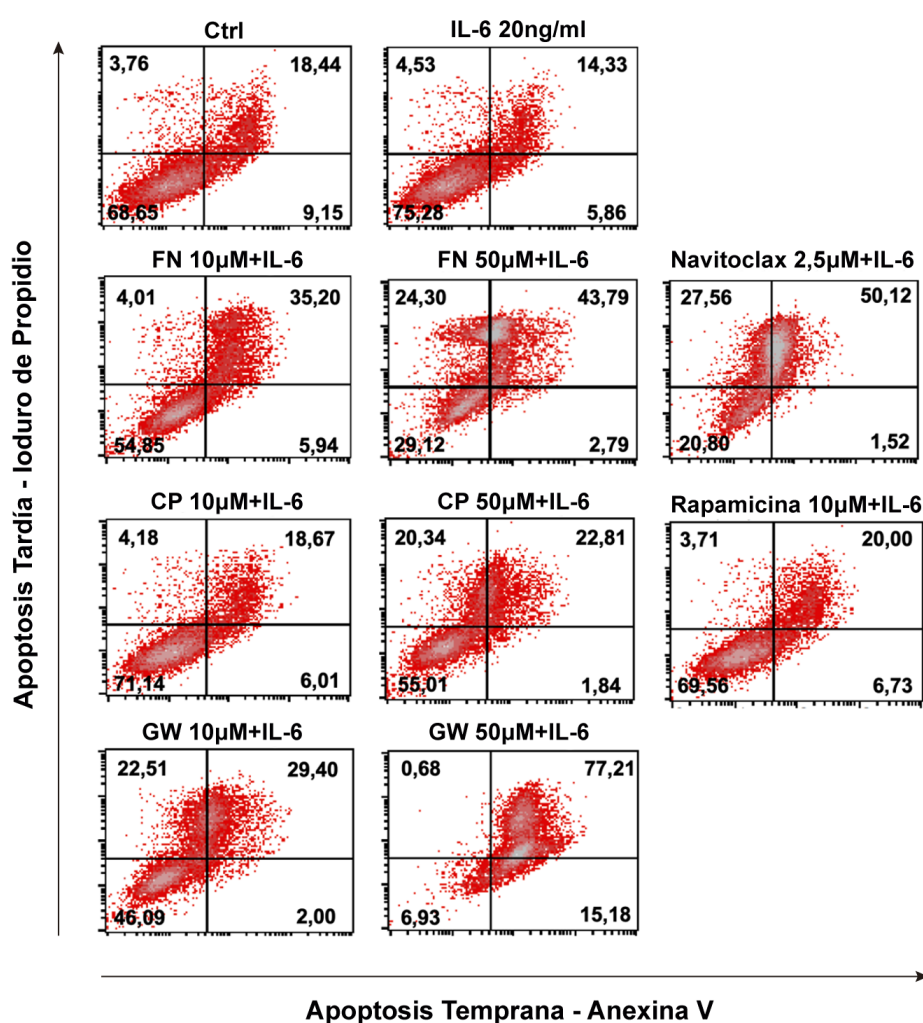
**Figura 37. La activación de PPAR $\alpha$  presenta un efecto senolítico en condrocitos humanos. A,** Imágenes representativas de la actividad SA- $\beta$ -Gal en condrocitos en respuesta al tratamiento con IL-6 y FN. Se utilizó un doble marcaje para identificar la enzima  $\beta$ -Gal con C<sub>12</sub>FDG y los núcleos celulares con Hoechst 33342. Aumento 20X. **B,** Cuantificación del número de células senescentes y del número de núcleos celulares en condrocitos humanos T/C28a2 tratados con IL-6 (20 ng/ml), FN (1,56  $\mu$ M – 50  $\mu$ M), Rapamicina (Rapa, 10  $\mu$ M) y Navitoclax (2,5  $\mu$ M) durante 72 h en placas de 96 pocillos. Los valores del número de células senescentes se corresponden con la media  $\pm$  SEM de cuatro réplicas/condición, \* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01, \*\*\* $p$ <0.0001, \*\*\*\* $p$ <0.0001 vs. IL-6. Los valores del número de núcleos se corresponden con la media  $\pm$  SEM de cuatro réplicas/condición, \* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01, \*\*\* $p$ <0.01 vs. IL-6, se aplicó un test *t-Student* no pareado y paramétrico. **C,** Cuantificación del número de células senescentes y del número de núcleos celulares en condrocitos humanos T/C28a2 tratados con IL-6 (20 ng/ml), CP (1,56  $\mu$ M – 50  $\mu$ M), Rapa, 10  $\mu$ M y Navitoclax (2,5  $\mu$ M) durante 72 h en placas de 96 pocillos. Los valores del número de células senescentes se corresponden con la media  $\pm$  SEM de cuatro réplicas/condición, \* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.0001 vs. IL-6. Los valores del número de núcleos se corresponden con la media  $\pm$  SEM de cuatro réplicas/condición, \* $p$ <0.01, \*\* $p$ <0.01 vs. IL-6, se aplicó un test *t-Student* no pareado y paramétrico. **D,** Cuantificación del número de células senescentes y del número de núcleos celulares en condrocitos humanos T/C28a2 tratados con IL-6 (20 ng/ml), GW (1,56  $\mu$ M – 50  $\mu$ M), Rapa, 10  $\mu$ M y Navitoclax (2,5  $\mu$ M) durante 72 h en placas de 96 pocillos. Los valores del número de células senescentes se corresponden con la media  $\pm$  SEM de cuatro réplicas/condición, \* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.001, \*\*\* $p$ <0.01, \*\*\*\* $p$ <0.0001 vs. IL-6. Los valores del número de núcleos se corresponden con la media  $\pm$  SEM de cuatro réplicas/condición, \* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.001, \*\*\* $p$ <0.05 vs. IL-6, se aplicó un test *t-Student* no pareado y paramétrico.

### 2.3.2. Los agonistas del receptor nuclear PPAR $\alpha$ eliminan los condrocitos senescentes a través de la vía de apoptosis

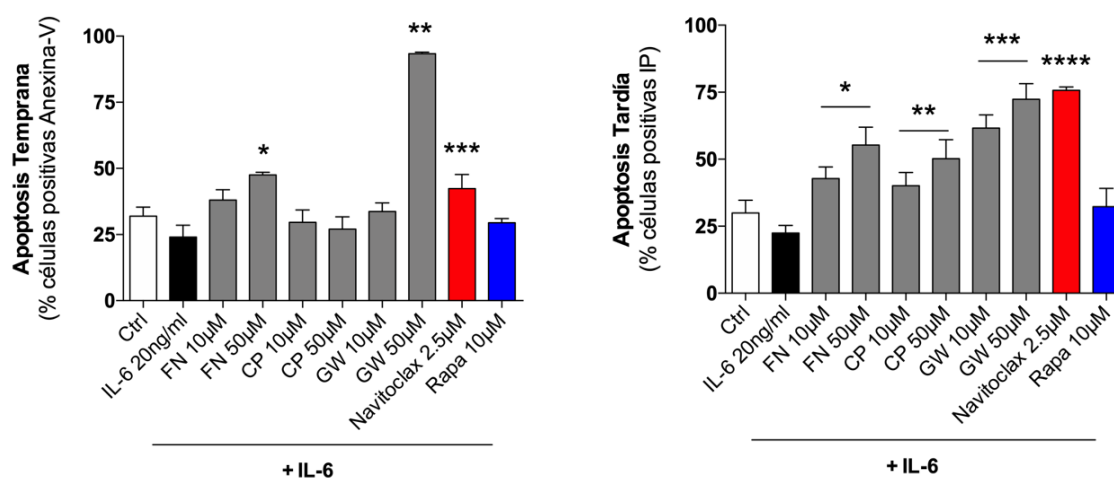
Para determinar la vía de eliminación de las células senescentes en respuesta a FN y a otros agonistas PPAR $\alpha$ , se determinó la muerte celular por apoptosis por citometría de flujo (**Figura 38A**). Se empleó Navitoclax (2,5  $\mu$ M) como senolítico a través de la activación de la vía de apoptosis. Los resultados mostraron que los tres agonistas PPAR $\alpha$  incrementaron la muerte celular por apoptosis en respuesta a IL-6 de manera similar al Navitoclax, excepto GW 50  $\mu$ M que mostró un efecto tóxico (**Figura 38B**).

Estos resultados indicaron que la eliminación selectiva de los condrocitos senescentes por parte de los agonistas PPAR $\alpha$  se realizó a través de la activación de la vía de apoptosis.

**A**



B



**Figura 38. Los agonistas de PPAR $\alpha$  eliminan los condrocitos senescentes a través de la vía de apoptosis.** **A**, Representación en *scatter plot* del flujo de muerte celular por apoptosis de condrocitos humanos T/C28a2 tratados con IL-6 (20 ng/ml) y FN, CP y GW (10  $\mu$ M y 50  $\mu$ M) durante 72 h. Como control senolítico se empleó Navitoclax (2,5  $\mu$ M) y como senomórfico se empleó Rapamicina (10  $\mu$ M). **B**, Cuantificación de muerte celular por apoptosis mediante citometría de flujo. Los valores se corresponden con la media  $\pm$  SEM de tres observaciones independientes. Apoptosis temprana (Anexina): \* $p$ <0.01, \*\* $p$ <0.0001, \*\*\* $p$ <0.05 vs. IL-6. Apoptosis tardía (Yoduro de propidio): \* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.05, \*\*\* $p$ <0.01, \*\*\*\* $p$ <0.0001 vs. IL-6, se aplicó un test *t-Student* no pareado y paramétrico.

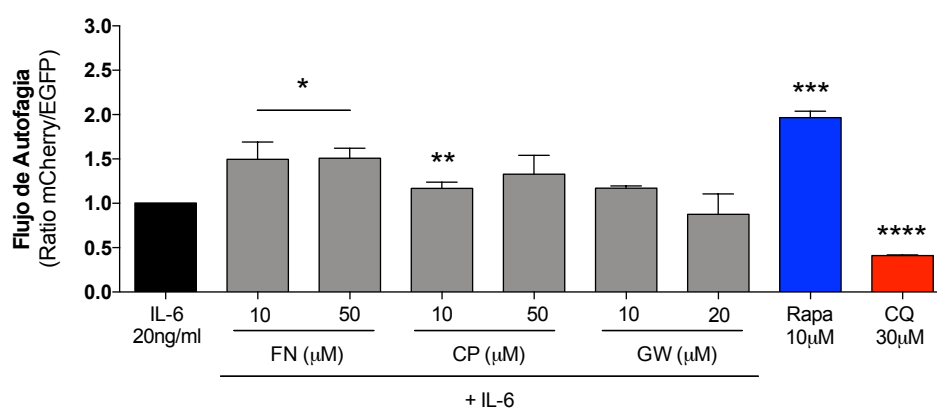
## 2.4. Efecto de los agonistas del receptor nuclear PPAR $\alpha$ en el proceso de autofagia

Después de caracterizar el efecto senoterapéutico y el mecanismo por el cual los agonistas del receptor PPAR $\alpha$  eliminan selectivamente las células senescentes, el siguiente objetivo se centró en evaluar su papel sobre el proceso de autofagia.

### 2.4.1. La activación de PPAR $\alpha$ incrementa el flujo de autofagia en respuesta a IL-6

Para estudiar el flujo de autofagia se utilizó la línea celular de condrocitos reportera de autofagia T/C28a2-mCherry-EGFP-pBABE empleada tanto en el *screening* secundario como en los ensayos de confirmación. El doble marcaje presente en el constructo permitió determinar por técnicas de citometría de flujo la relación de fluorescencias emitidas por ambas poblaciones (mCherry/EGFP).

Los resultados mostraron un aumento en el flujo de autofagia con los tres agonistas PPAR $\alpha$  en respuesta a la IL-6. Sin embargo, sólo el FN mostró un incremento del flujo de autofagia a ambas concentraciones (**Figura 39**).

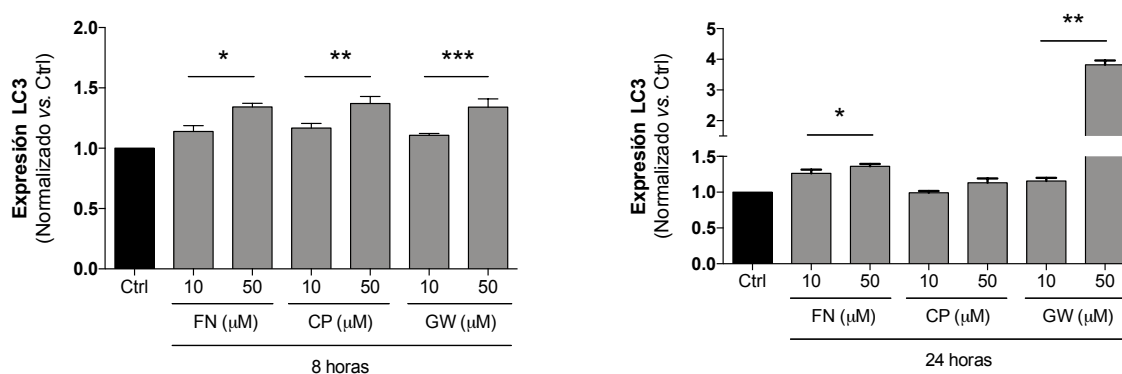


**Figura 39. Los agonistas PPAR $\alpha$  modulan el proceso de autofagia.** Cuantificación del flujo de autofagia mediante el ratio mCherry/EGFP. Los condrocitos fueron tratados con IL-6 (20 ng/ml), FN, CP (10 y 50  $\mu$ M) y GW (10 y 20  $\mu$ M), Rapa (10  $\mu$ M) y CQ (30  $\mu$ M) durante 18 h. Los valores se corresponden con la media  $\pm$  SEM de 6 observaciones independientes, \* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.05, \*\*\* $p$ <0.0001, \*\*\*\* $p$ <0.0001 vs. IL-6, se aplicó un test *t-Student* no pareado y paramétrico.

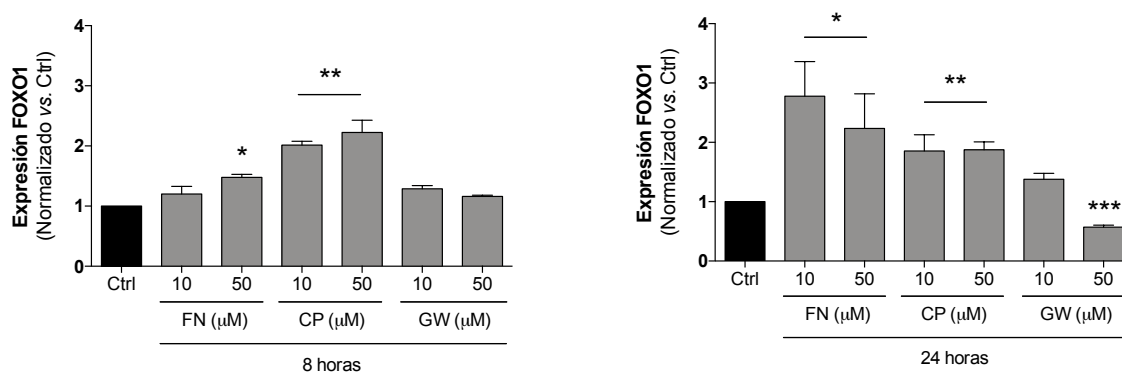
### 2.4.2. Los agonistas PPAR $\alpha$ regulan marcadores de homeostasis celular

Estudios complementarios al flujo de autofagia se centraron en analizar el efecto de los agonistas PPAR $\alpha$  sobre diferentes marcadores implicados en la homeostasis celular. Para ello, se cuantificaron los niveles de expresión de LC3, principal regulador de la vía de señalización de autofagia y de FoxO1, esencial en el control de la homeostasis celular. Los resultados mostraron un incremento en los niveles de expresión de LC3 y FoxO1 en los condrocitos tratados con FN, CP y GW a las 8 y 24 horas post-tratamiento, siendo FN el único que incrementó la expresión de ambos marcadores a ambos tiempos (**Figura 40 A y B**).

**A**



**B**



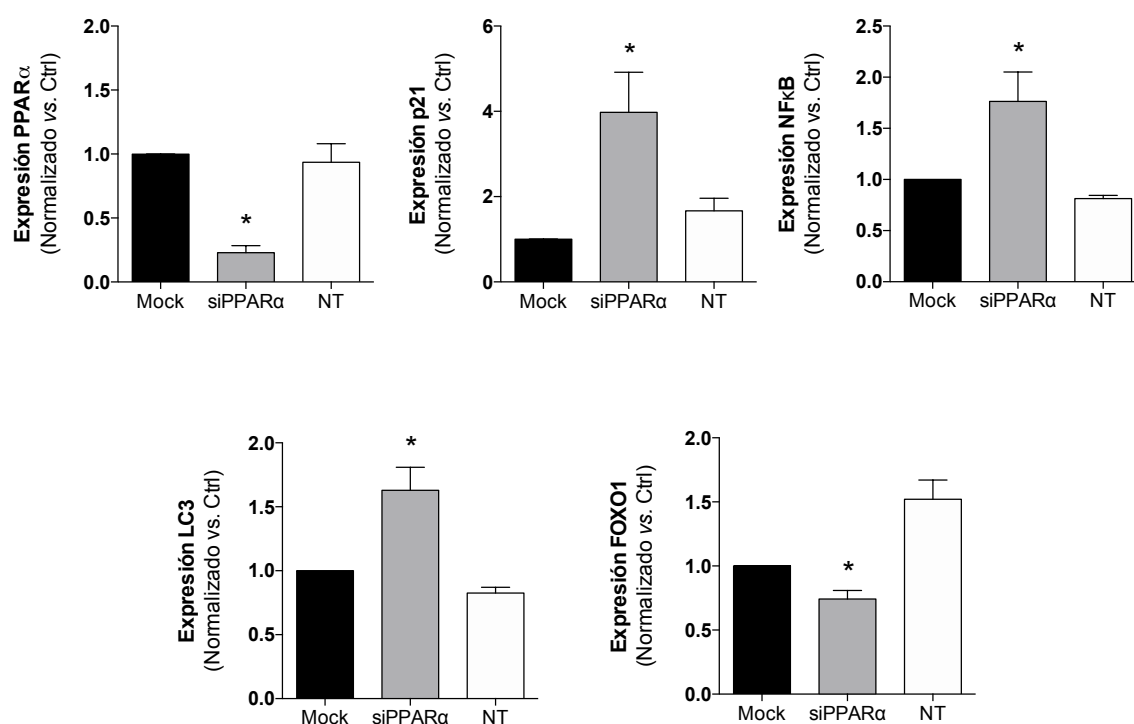
**Figura 40. Los agonistas PPAR $\alpha$  regulan marcadores de homeostasis celular.** **A**, Niveles de expresión de LC3 en condrocitos humanos T/C28a2 tratados con FN y CP (10 y 50  $\mu$ M) y GW (10 y 20  $\mu$ M) durante 8 y 24 horas. Los valores de corresponden con la media  $\pm$  SEM de tres réplicas por condición. A las 8 horas: \* $p$ <0.01, \*\* $p$ <0.0001, \*\*\* $p$ <0.0001 vs. Ctrl. A las 24 horas: \* $p$ <0.05, \*\*\* $p$ <0.0001, vs. Ctrl. Se aplicó un test *t-Student* no pareado y paramétrico. **B**, Niveles de expresión de FoxO1 en condrocitos humanos T/C28a2 tratados con FN y CP (10 y 50  $\mu$ M) y GW (10 y 20  $\mu$ M) durante 8 y 24 horas. Los valores de corresponden con la media  $\pm$  SEM de tres réplicas por condición. A las 8 horas: \* $p$ <0.0001, \*\* $p$ <0.0001 vs. Ctrl. A las 24 horas: \* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.05, \*\*\* $p$ <0.01 vs. Ctrl. Se aplicó un test *t-Student* no pareado y paramétrico.



### 2.4.3. PPAR $\alpha$ participa en la regulación de la homeostasis del condrocito

La implicación funcional del receptor nuclear PPAR $\alpha$  en la homeostasis del condrocito fue evaluada mediante su silenciamiento génico. Los resultados mostraron que la inhibición de PPAR $\alpha$  incrementó los niveles de expresión de marcadores de senescencia e inflamación, como p21 y NF $\kappa$ B, respectivamente, además de una alteración en los niveles de expresión de marcadores relacionados con el proceso de autofagia, a través de un incremento en los niveles de expresión de LC3, quizás como un mecanismo de respuesta frente a la inhibición de PPAR $\alpha$  y una disminución en los niveles de expresión de FoxO1.

Estos resultados ponen de manifiesto el papel de PPAR $\alpha$  en la regulación de procesos celulares claves en el envejecimiento articular y en la artrosis, como son la senescencia celular, la inflamación crónica y una alteración en la autofagia (**Figura 41**).



**Figura 41. El receptor nuclear PPAR $\alpha$  participa en la regulación de la homeostasis del condrocito.** Cuantificación de los niveles de expresión de PPAR $\alpha$ , p21, NF- $\kappa$ B, LC3 y FoxO1 en condrocitos humanos T/C28a2. Los resultados se corresponden con la media  $\pm$  SEM de cuatro experimentos independientes. \*p<0.05, \*\*\*p<0.001, se aplicó un test *t-Student* no pareado y paramétrico.

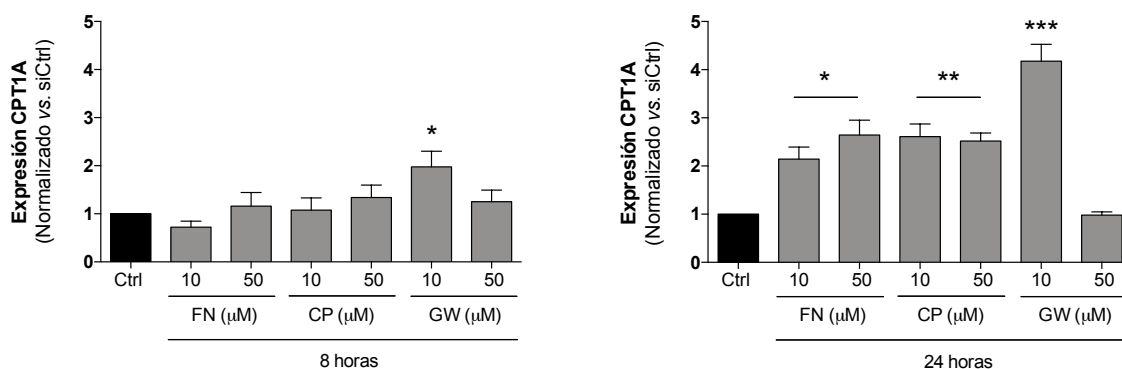
## 2.5. Implicación del receptor PPAR $\alpha$ en el metabolismo del condrocito

PPAR $\alpha$  tiene un papel crucial en el metabolismo celular a través de la oxidación de los ácidos grasos. Para estudiar el tipo de oxidación que tiene lugar en los condrocitos, se analizaron los niveles de expresión de dos de los principales genes diana de PPAR $\alpha$ , como son CPT1A y ACOX1, implicados en la  $\beta$ -oxidación mitocondrial y en la oxidación peroxisomal de los ácidos grasos, respectivamente.

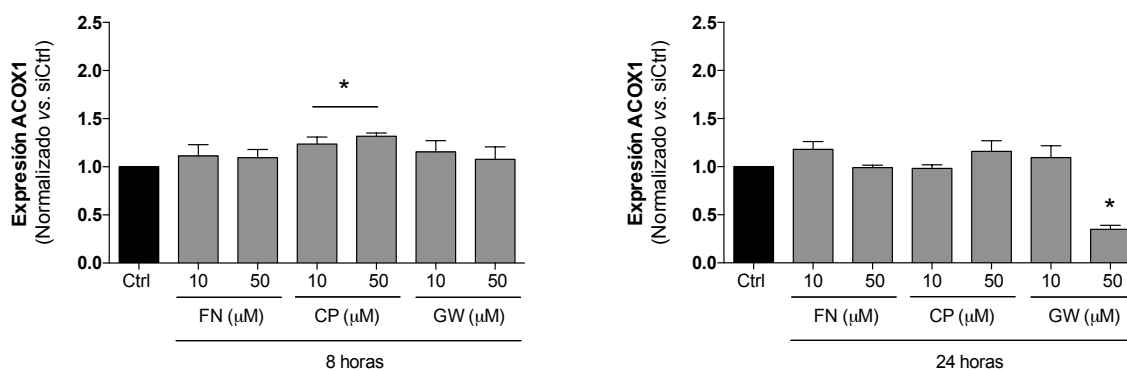
Los resultados obtenidos mostraron un incremento en los niveles de expresión de CPT1A a las 8 horas aunque el incremento fue mayor a las 24 horas a excepción de GW 50  $\mu$ M (**Figura 42A**). Sin embargo, los niveles de expresión de ACOX1 no experimentaron grandes cambios significativos y solo CP mostró un aumento en las 8 horas (**Figura 42B**).

Estos resultados sugieren que la oxidación de ácidos grasos podría tener lugar a través de la  $\beta$ -oxidación mitocondrial en los condrocitos.

A



B



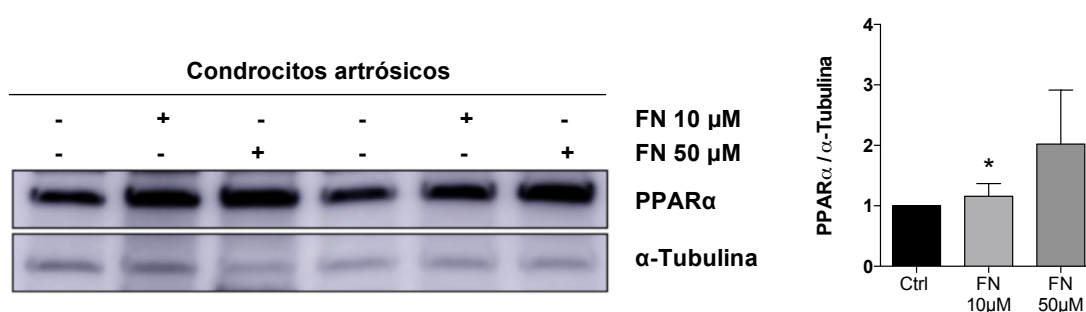
**Figura 42. Implicación del receptor PPAR $\alpha$  en el metabolismo lipídico del condrocito. A,** Niveles de expresión del CPT1A en condrocitos humanos T/C28a2 tratados durante 8 y 24 horas con FN, CP y GW (10 y 50  $\mu$ M). Los resultados se corresponden con la media  $\pm$  SEM de tres observaciones independientes. A las 8 horas: \* $p$ <0.05 vs. Ctrl. A las 24 horas: \* $p$ <0.01, \*\* $p$ <0.01, \*\*\* $p$ <0.001 vs. Ctrl. Se aplicó un test *t-Student* no pareado y paramétrico. **B,** Niveles de expresión de ACOX1 en condrocitos humanos T/C28a2 tratados durante 8 y 24 horas con FN, CP y GW (10 y 50  $\mu$ M). Los resultados se corresponden con la media  $\pm$  SEM de tres observaciones independientes. A las 8 horas: \* $p$ <0.05 vs. Ctrl. A las 24 horas: \* $p$ <0.001 vs. Ctrl. Se aplicó un test *t-Student* no pareado y paramétrico.

### 3. EVALUACIÓN DE LA EFICACIA TERAPÉUTICA DEL FENOFIBRATO

#### 3.1. El FN es un agonista PPAR $\alpha$ en condrocitos humanos

Para determinar la expresión de PPAR $\alpha$  en respuesta a FN, se emplearon condrocitos humanos procedentes de pacientes artrósicos (OA) tratados con FN 10 y 50  $\mu$ M durante 24 horas. Los resultados mostraron que el FN incrementó la expresión de PPAR $\alpha$  de manera dosis dependiente, siendo significativa a la dosis de 10  $\mu$ M (Figura 43).

Estos resultados confirmaron que el FN es un agonista PPAR $\alpha$  en condrocitos humanos.



**Figura 43. El FN es un agonista PPAR $\alpha$  en condrocitos humanos.** A, Western blot para cuantificar la expresión de PPAR $\alpha$  en condrocitos OA tratados con FN (10 y 50  $\mu$ M) durante 24 horas. La  $\alpha$ -Tubulina se utilizó como control de carga. Los resultados se corresponde con la media  $\pm$  SEM de n=3 donantes OA, \*p< 0.05 vs. Ctrl. Se aplicó un test *t-Student* no pareado y paramétrico.

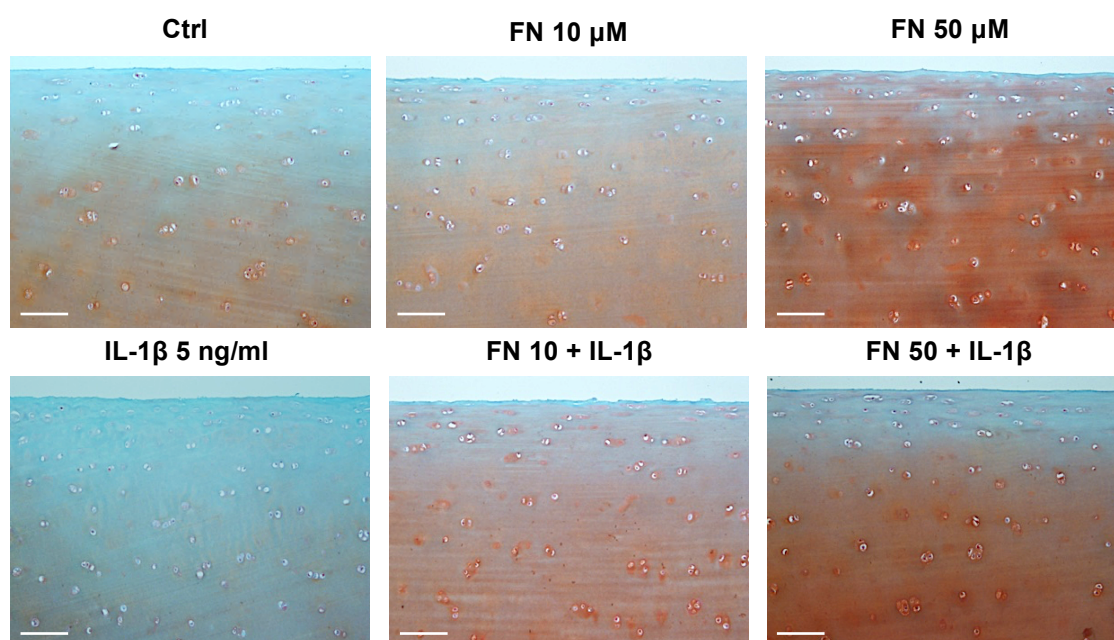
### 3.2. El FN ejerce un efecto protector sobre el cartílago articular enfermo

Para determinar la eficacia terapéutica del FN, se emplearon explantes de cartílago de 6 mm de diámetro procedentes de pacientes sin patología articular pero con edad avanzada (envejecidos). A continuación, los explantes fueron tratados con IL-1 $\beta$  5 ng/ml en presencia o no de FN 10 y 50  $\mu$ M durante 72 horas. Finalizado el tratamiento se realizaron estudios histológicos mediante tinción con Safranina O-Fast Green para evaluar el contenido de proteoglicanos. Los resultados mostraron que el FN disminuyó la pérdida de proteoglicanos tanto frente a la condición control (cartílago envejecido) como en respuesta al tratamiento con IL-1 $\beta$  (**Figura 44A**).

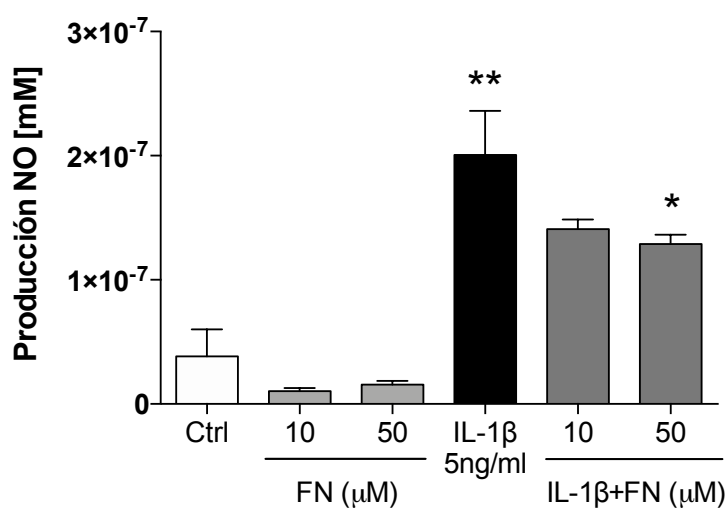
Paralelamente, se evaluó el efecto del FN en respuesta al tratamiento con IL-1 $\beta$  sobre la producción de óxido nítrico (NO) en el secretoma de los condrocitos envejecidos. Los resultados mostraron que el FN disminuyó la producción de óxido nítrico en respuesta a IL-1 $\beta$  a las 24 horas post-tratamiento (**Figura 44B**).

Los resultados obtenidos indican que el FN protege de la degradación del cartílago presente en el envejecimiento articular y en la artrosis.

A



B



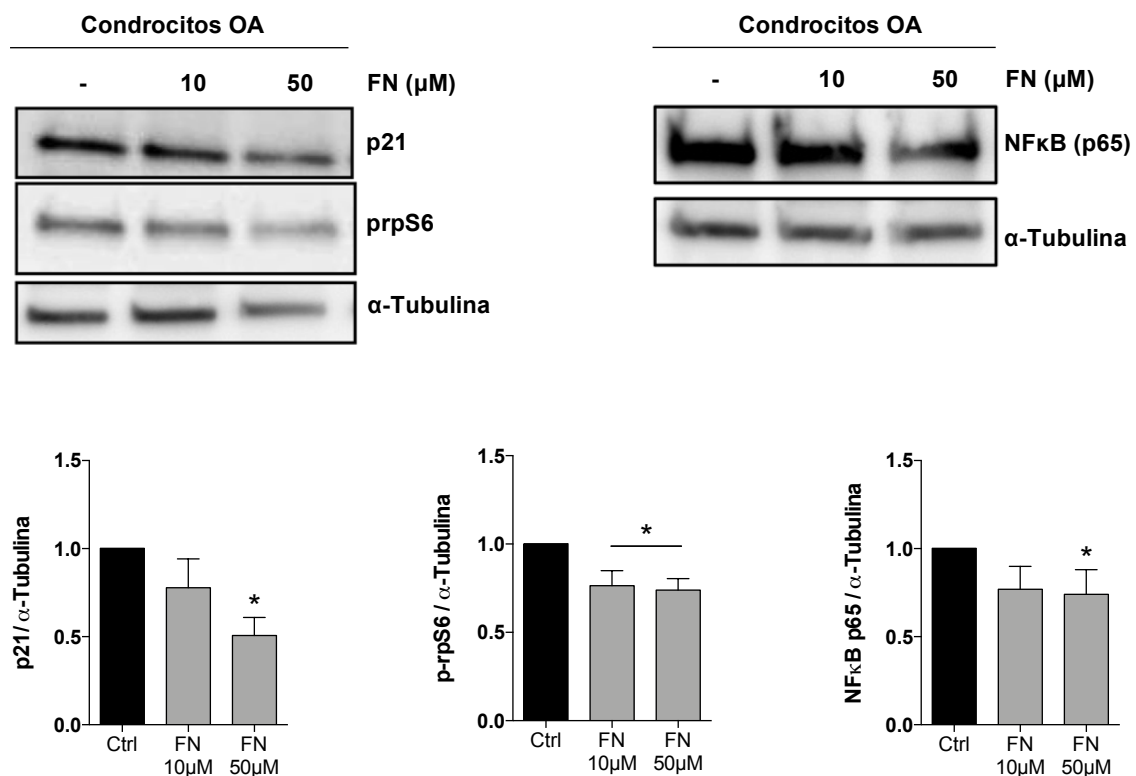
**Figura 44. El FN ejerce un efecto protector sobre el cartilago articular enfermo. A,** Tinción de Safranina O–Fast Green en cartilago humano envejecido (n=3) tratados con FN (10, 50  $\mu$ M), IL-1b 5 ng/ml o en combinación durante 72 horas. Escala 10 $\mu$ m, **B,** Producción de NO en los sobrenadantes de condrocitos humanos envejecidos tratados con FN (10, 50  $\mu$ M), IL-1b (5ng/ml) o en combination durante 24 horas. Los valores se corresponden con la media  $\pm$  SEM of n=5 donantes. \*p < 0.05 vs. IL-1b, \*\*p < 0.05 vs. Ctrl. Se aplicó un test *t-Student* no pareado y paramétrico.

### 3.3. El FN regula los procesos de senescencia, autofagia e inflamación en condrocitos humanos artrósicos y envejecidos

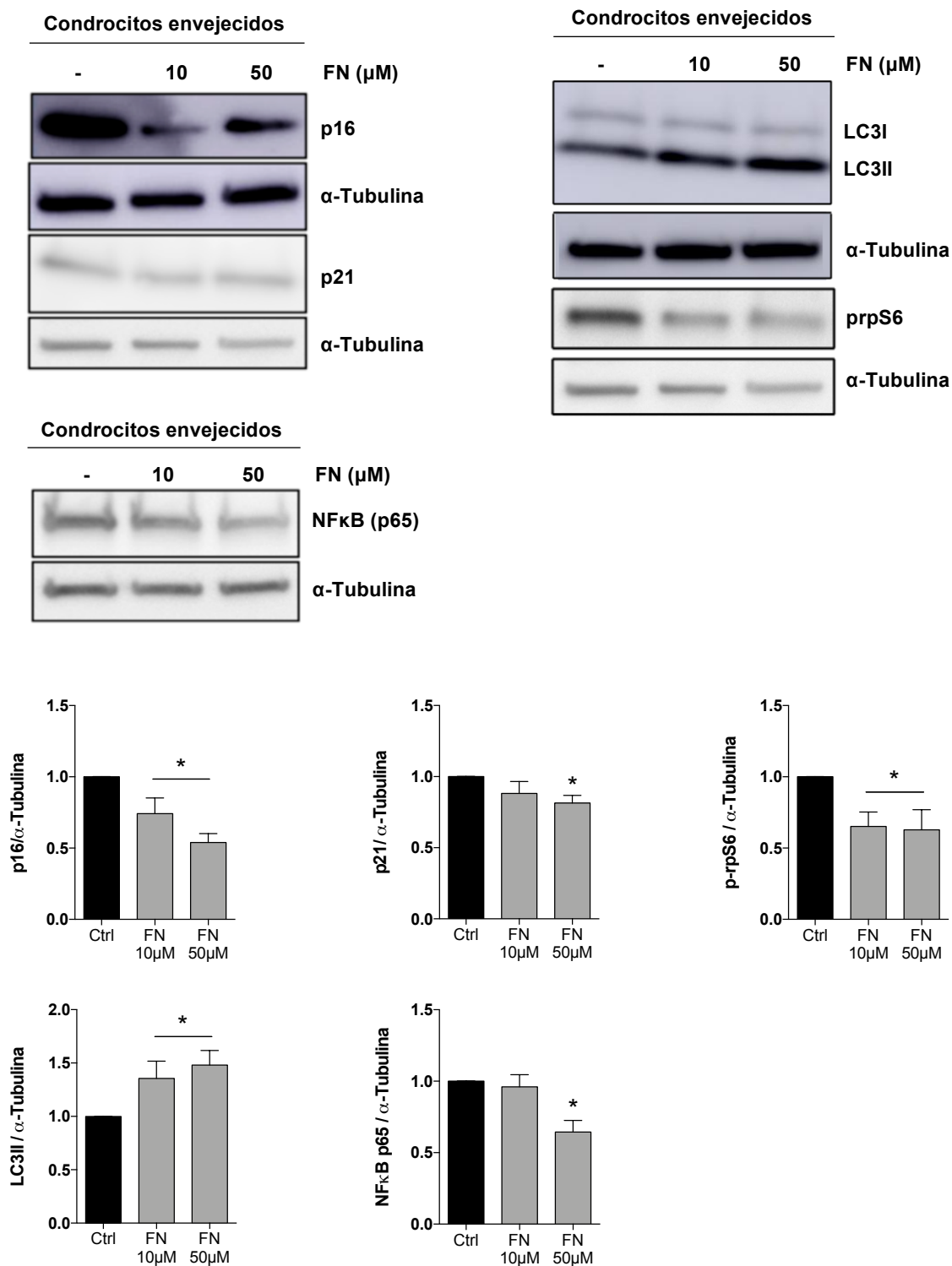
El FN ha sido identificado como un compuesto senolítico y pro-autofágico, con un efecto protector sobre cartílago articular enfermo. El siguiente paso fue evaluar su efecto terapéutico sobre condrocitos humanos procedentes de donantes con artrosis (OA) y edad avanzada y de donantes sin patología articular pero con edad avanzada (envejecidos). Para ello, los condrocitos se trataron con FN a las concentraciones de 10 y 50  $\mu\text{M}$  durante 24 horas y se evaluaron marcadores de senescencia, como p21 y p16, marcadores de autofagia, como LC3 y prpS6 y marcadores de inflamación, como NF $\kappa$ B. Los resultados mostraron que los condrocitos OA tratados con FN presentaron una disminución en la expresión proteica de p21, prpS6 y NF $\kappa$ B (**Figura 45 A y B**) con respecto a los condrocitos OA sin tratamiento. En los condrocitos envejecidos se observó una reducción en la expresión proteica de p16 y p21 (**Figura 45B**), así como un incremento en la lipidación de LC3 y una disminución en la expresión de prbS6 (**Figura 45C**) y de NF $\kappa$ B (**Figura 45D**).

Estos resultados sugieren que el tratamiento con FN regula los procesos de senescencia, autofagia e inflamación en la artrosis y en el envejecimiento articular.

**A**



B



**Figura 45. El FN regula los procesos de senescencia, autofagia e inflamación en condrocitos OA y envejecidos.** A, Western blot para evaluar la expresión proteica de p21, prpS6 y NF-κβ en condrocitos OA tratados con FN (10, 50 μM) durante 24 horas. Los resultados se corresponde con la media ± SEM de n=3 donantes para p21 y n=4 donantes para prpS6 y NF-κβ, \*p<0.05 vs. Ctrl. B, Western blot para cuantificar la expresión proteica de p16, p21, LC3, prpS6 y NF-κβ en condrocitos envejecidos tratados con FN (10, 50 μM) durante 24 horas. Los resultados se corresponde con la media ± SEM de n=6 donantes, \*p<0.05 vs. Ctrl para p21 y p16; de n=5 donantes, \*p<0.05 vs. Ctrl para LC3II y p-rbS6 y de n=4 donantes, \*p<0.01 vs. Ctrl para NF-κβ. α-Tubulina se utilizó como control de carga. En todos los casos se aplicó un test *t-Student* no pareado y paramétrico.

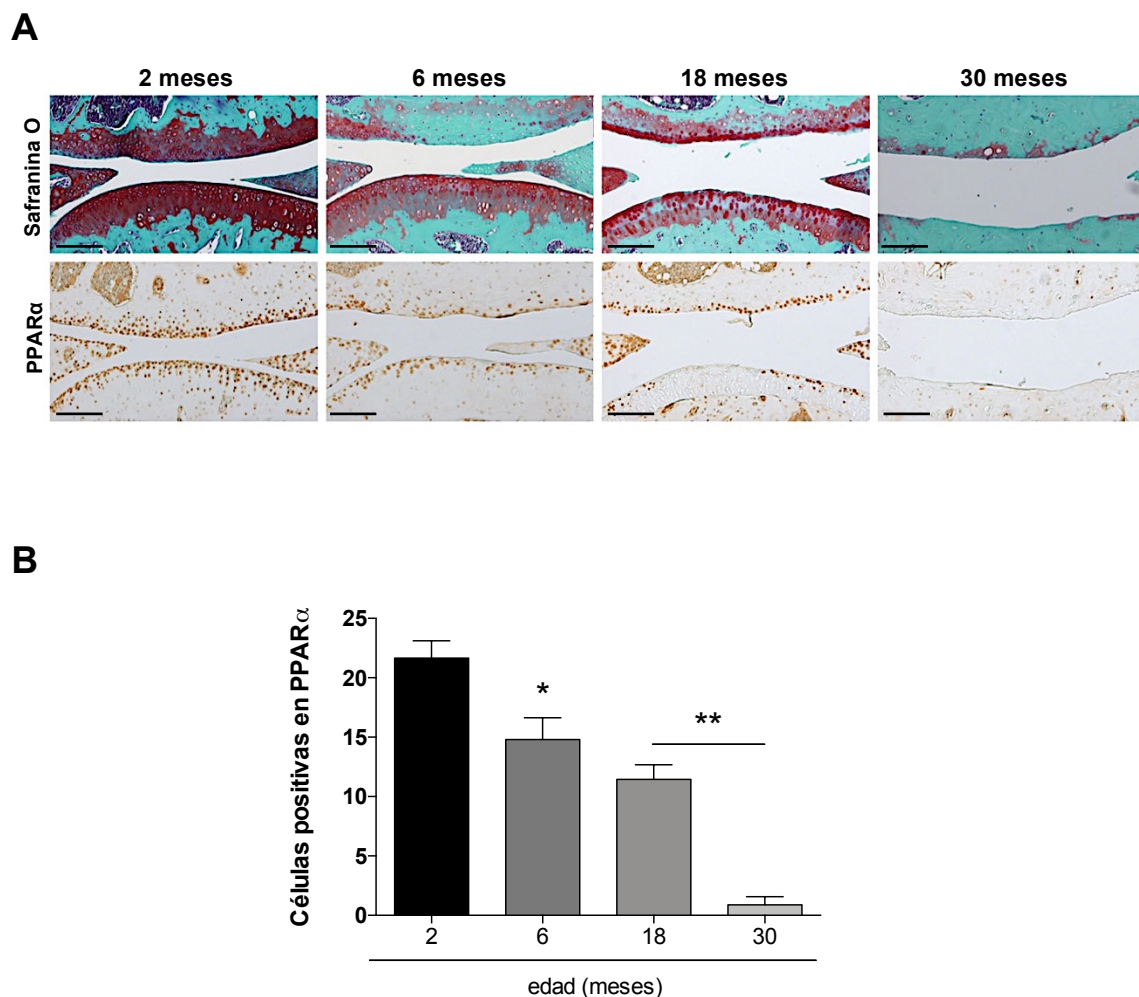


#### 4. PAPEL DEL RECEPTOR NUCLEAR PPAR $\alpha$ EN MODELOS PRECLÍNICOS DE ENVEJECIMIENTO ARTICULAR Y ARTROSIS

##### 4.1. PPAR $\alpha$ está disminuido en el envejecimiento articular y en la artrosis

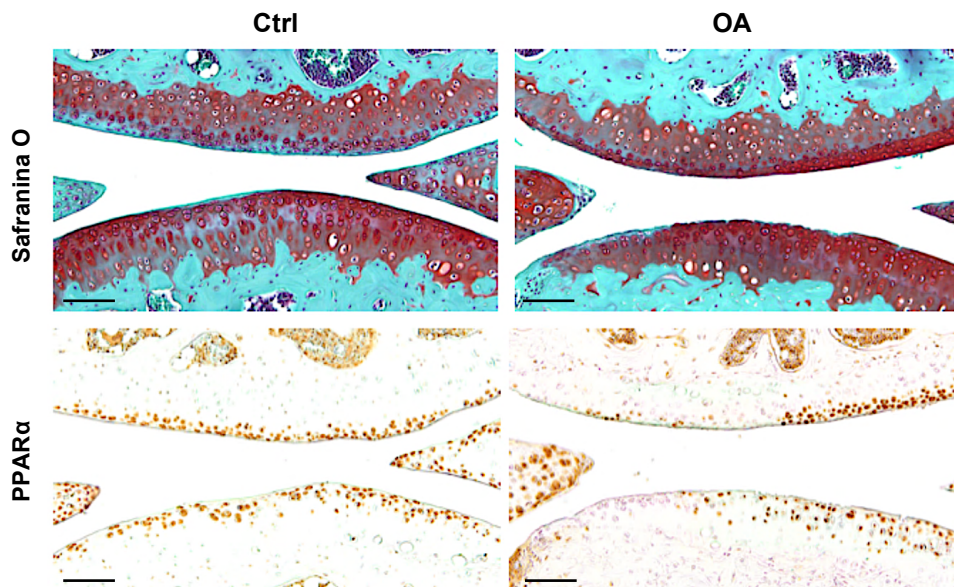
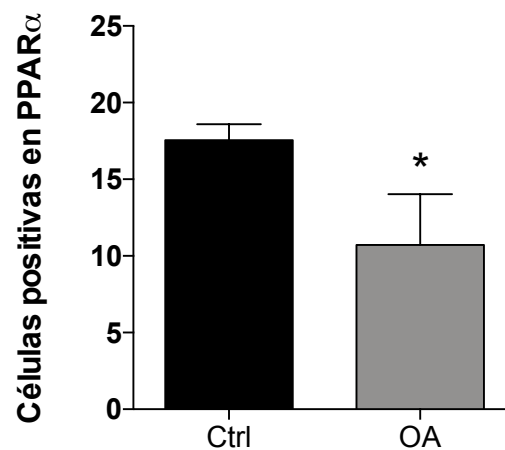
Para evaluar el papel de PPAR $\alpha$  en el envejecimiento articular y en la artrosis se emplearon dos modelos de ratón, uno de envejecimiento espontáneo a diferentes edades (2, 6, 18 y 30 meses de edad) y otro de artrosis experimental con cirugía mediante la desestabilización del ligamento del menisco medial de la rodilla (DMM) en ratones de 6 meses de edad.

Los resultados mostraron que el número de células positivas para PPAR $\alpha$  disminuyó significativamente con la edad (**Figura 46A y B**).



**Figura 46. PPAR $\alpha$  está disminuido en rodillas de ratón con envejecimiento espontáneo. A,** Imágenes representativas de la tinción de *Safranina O-Fast Green* y de la inmunohistoquímica para PPAR $\alpha$  realizadas en rodillas de ratones C57BL/6J sometidos a envejecimiento espontáneo (2, 6, 18 y 30 meses de edad). Escala 10  $\mu$ m. **B,** Cuantificación del número de células positivas para PPAR $\alpha$ . Los valores se corresponden con la media  $\pm$  SEM de tres ratones por grupo de edad, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.0001$  vs. 2 meses de edad. Se aplicó un test *t-Student* no pareado y paramétrico.

Los resultados del modelo de artrosis experimental mostraron una disminución significativa en el número de células positivas en PPAR $\alpha$  a las 10 semana post-cirugía (**Figura 47A y B**).

**A****B**

**Figura 47. PPAR $\alpha$  está disminuido en rodillas de ratón sometidas a artrosis experimental. A,** Imágenes representativas de la tinción de *Safranina O-Fast Green* y de la inmunohistoquímica para PPAR $\alpha$  realizadas en rodillas de ratones C57BL/6J de 6 meses de edad sometidos a artrosis experimental durante 10 semanas. Escala 10  $\mu$ m. **B,** Cuantificación del número de células positivas para PPAR $\alpha$ . Los valores se corresponden con la media  $\pm$  SEM de cuatro ratones por grupo, \* $p < 0.05$  vs. OA. Se aplicó un test *t-Student* no pareado y paramétrico.

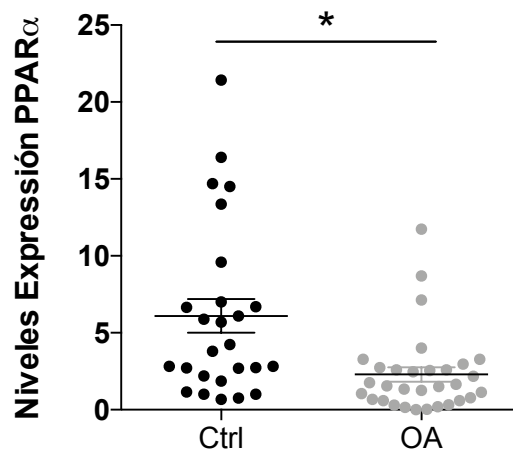
#### 4.2. PPAR $\alpha$ está disminuido en sangre y en cartílago de pacientes con artrosis de rodilla

Para determinar los niveles de expresión de PPAR $\alpha$  en pacientes con artrosis se empleó sangre y cartílago de pacientes con y sin artrosis de rodilla procedentes de la Cohorte Prospectiva de Artrosis de A Coruña (PROCOAC).

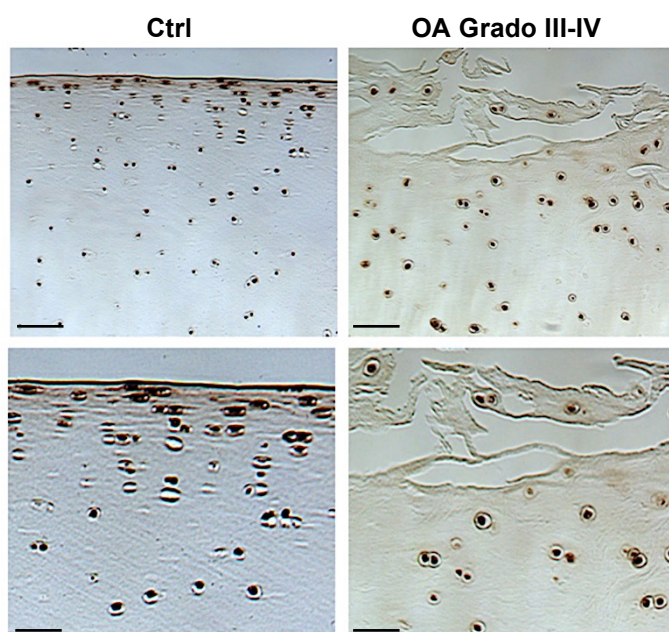
Los resultados mostraron una disminución significativa en los niveles de expresión de PPAR $\alpha$  en sangre de pacientes con artrosis de rodilla (**Figura 48A**). Estos resultados fueron validados en cartílago de pacientes con artrosis de rodilla, donde se observó una disminución significativa en el número de células positivas para PPAR $\alpha$ , predominantemente en la zona superficial comparado con el grupo control (**Figura 48 B y C**).

Estos resultados demuestran que el receptor PPAR $\alpha$  está comprometido en modelos preclínicos de envejecimiento articular y en la artrosis.

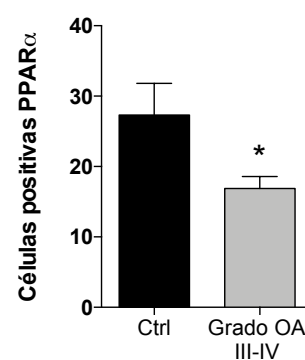
**A**



B



C



**Figura 48. PPAR $\alpha$  está disminuido en sangre y cartílago de pacientes con artrosis de rodilla. A,** Niveles de expresión de PPAR $\alpha$  en sangre de pacientes sin artrosis (Ctrl) y con artrosis de rodilla procedentes de la cohorte PROCOAC. Los resultados se corresponden con la media  $\pm$  SEM de n=26 pacientes sin artrosis y n=31 pacientes con artrosis de rodilla, \*p<0.001 vs. Ctrl. Se aplicó un test *t-Student* no pareado y paramétrico. **B,** Imágenes representativas de la inmunohistoquímica para PPAR $\alpha$  en cartílago sin artrosis (Ctrl) y con artrosis de rodilla. Escala 10  $\mu$ m. **C,** Cuantificación de las células positivas para PPAR $\alpha$ . Los resultados se corresponden con la media  $\pm$  SEM de 5 donantes por grupo, \*p<0.05 vs. Ctrl. Se aplicó un test *t-Student* no pareado y paramétrico.

### 4.3. La activación farmacológica de PPAR $\alpha$ mejora las condiciones clínicas en pacientes artrósicos

Para investigar la relevancia y el potencial traslacional de la activación de PPAR $\alpha$  en pacientes con artrosis de rodilla, se emplearon datos procedentes de la Cohorte Americana de artrosis de rodilla, Osteoarthritis Initiative (OAI). Se trata de un estudio observacional prospectivo, longitudinal y multicéntrico, sobre la artrosis de rodilla. El análisis de los datos fue realizado en colaboración con el grupo de los Drs. Valery e Ivan Shirinsky (Scientific Research Institute of Clinical Immunology, Novosibirsk, Rusia).

La Cohorte OAI está formada por 4796 pacientes. Estableciendo varios criterios de inclusión y de exclusión se obtuvo un total de 3357 sujetos que entraron en el estudio. De este grupo de pacientes sólo había 35 pacientes con tratamiento con fibratos y 3322 que no los tomaban. Aplicando estrategias de emparejamiento genético 1:1 se realizó un análisis final con 35 pacientes en cada grupo (**Figura 53 de Resultados Anexos**). Del total de 35 pacientes, 24 pacientes tomaban Fenofibrato (68,6%), 10 pacientes tomaban Gemfibrozilo (28,6%) y un paciente que inicialmente tomaba Gemfibrozilo se cambió a Fenofibrato. Además, durante el seguimiento hubo tres reemplazamientos de rodilla en el grupo de pacientes del Fenofibrato (4,3%) y siete reemplazamientos de rodilla en el grupo control (11,4%). Para evaluar el estado de las rodillas de los pacientes tratados con y sin fibratos se empleó el “Western Ontario and McMaster Universities Osteoarthritis Index” o índice WOMAC que es un cuestionario estandarizado y patentado y ampliamente utilizado por los reumatólogos para evaluar el estado de los pacientes con artrosis de rodilla y cadera, incluyendo el dolor, la rigidez y el funcionamiento físico de las articulaciones.

Los resultados obtenidos después del análisis indicaron que los pacientes que tomaban fibratos tenían una mejora en la función WOMAC y el WOMAC total y una tendencia a sufrir menos dolor que los pacientes sin tratamiento con fibratos.

Estos resultados sugieren que el tratamiento con fibratos podría mejorar la salud articular de los pacientes con artrosis de rodilla (**Tabla 20**).

Tabla 20. Análisis longitudinal de las subcategorías que forman la escala WOMAC en pacientes que toman fibratos

Índice WOMAC	Coefficiente $\beta$	IC 95%	P valor
Dolor WOMAC	-0,3	-0,63 a -0,035	0,08
Función WOMAC	-1,15	-2,1 a -0,2	0,018
Rigidez WOMAC	-0,07	-0,23 a 0,1	0,43
WOMAC Total	-1,6	-2,93 a -0,21	0,024

## **DISCUSIÓN**

## 1. IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS SENOTERAPÉUTICOS Y MODULADORES DE AUTOFAGIA MEDIANTE TÉCNICAS DE CRIBADO DE ALTO RENDIMIENTO

La artrosis (OA) es una enfermedad crónica, compleja y multifactorial que afecta a toda la articulación y para la cual actualmente no existen tratamientos efectivos. Está considerada como una de las principales causas de discapacidad en personas mayores lo que provoca una reducción de la calidad de vida de los pacientes, lo que implica un importante impacto socioeconómico.

El envejecimiento es uno de los principales factores de riesgo de la artrosis y está caracterizado por la pérdida progresiva de la función celular. Existen nueve marcadores celulares y moleculares que contribuyen al proceso de envejecimiento entre los que se incluyen la senescencia celular, la pérdida de proteostasis o la disfunción mitocondrial (43). Varios de estos procesos contribuyen a que la artrosis presente un fenotipo asociado al envejecimiento. Una presencia crónica de células senescentes en los tejidos envejecidos está asociada con la pérdida de la función tisular. Las células senescentes ejercen un efecto negativo sobre las células y tejidos próximos a través de la secreción de citoquinas pro-inflamatorias, proteasas o factores de crecimiento dando lugar a un fenotipo pro-inflamatorio asociado a senescencia conocido como *Senescence-Associated Secretory Phenotype* (SASP) y potenciando los procesos catabólicos frente a los anabólicos y dificultando la restauración de la homeostasis del cartílago (248, 249). El principal mecanismo que controla la homeostasis celular es la autofagia a través de la cual se eliminan las organelas y las macromoléculas disfuncionales. Se ha visto que una perturbación del sistema proteolítico a través de la autofagia está asociada con el envejecimiento mientras que su estimulación tiene efectos contrarios (182). En artrosis se ha demostrado que la autofagia es un mecanismo protector y fundamental para el mantenimiento de la homeostasis del cartílago normal y que está disminuída en el envejecimiento articular y en la artrosis. Asimismo, se observó que la autofagia está disminuída en modelos de envejecimiento espontáneo y de artrosis experimental en ratón y que la activación farmacológica de autofagia protege del daño articular (186).

Con el objetivo de identificar nuevos fármacos para el tratamiento de la artrosis, nos centramos en la senescencia celular utilizando estrategias senolíticas dirigidas a eliminar selectivamente células senescentes y en la activación de autofagia para poder recuperar y mantener la homeostasis celular. En este sentido, investigaciones centradas en el estudio de la senescencia celular en OA mostraron que la eliminación selectiva de células senescentes en modelos preclínicos de artrosis en



ratón, prevenía de la progresión de la enfermedad y restauraba la estructura tisular (250). Además, *Jeon et al.* (247) mostraron que tras el tratamiento con moléculas senolíticas en cartílago artrósico de rodilla y en condrocitos senescentes obtenidos de pacientes sometidos a artroplastia completa de rodilla se reducía la carga de células senescentes y se mejoraba la expresión del colágeno tipo II y del agregano, dos de los principales componentes de la MEC en el cartílago.

Nuestro estudio se diseñó con el objetivo de identificar moléculas poseedoras de una función dual, es decir, compuestos que actuaran simultáneamente sobre los procesos de senescencia y autofagia en el cartílago articular. Como modelo de enfermedad empleamos la citoquina pro-inflamatoria IL-6. La IL-6 está considerada como uno de los factores más importantes del SASP y refuerza la senescencia a través de la comunicación paracrina con células vecinas no senescentes. Con el modelo propuesto se manifestó un aumento de la actividad de la enzima SA- $\beta$ -Gal y un incremento en la expresión del marcador p21, un inhibidor de quinasas dependientes de ciclina CDK2 y CDK4. Estos resultados concuerdan con lo descrito por *Kojima et al.* (228), ya que la exposición crónica a esta citoquina produce suficiente estrés para inducir una detención en el crecimiento celular. En cuanto al proceso de autofagia, existen estudios que relacionan a mTOR con la actividad secretora de las células senescentes. *Herranz et al.* (251) y *Laberge et al.* (252) mostraron que la inhibición de mTORC1 con Rapamicina inhibía selectivamente el SASP y la tinción de SA- $\beta$ -Gal de las células senescentes. Nuestros resultados confirmaron que la potenciar el SASP con IL-6 incrementaba la expresión de prpS6, sustrato de mTOR, y se reducía el flujo de autofagia. Estos datos indicaron que la exposición de los condrocitos a IL-6 provocó un efecto dual a nivel articular, ocasionando un desequilibrio en la homeostasis y acentuando el proceso de envejecimiento de los condrocitos.

La combinación de técnicas de HTS con un modelo *in vitro* contextualizado en la fisiopatología de la artrosis nos permitió identificar en condrocitos humanos varios compuestos con diferentes mecanismos de acción. Los condrocitos fueron expuestos simultáneamente a IL-6 y a los compuestos de la quimioteca Prestwick durante 72 y 18 horas para cuantificar la actividad SA- $\beta$ -Gal y el flujo de autofagia, respectivamente. El uso de quimiotecas de reposicionamiento nos permitió identificar las dianas terapéuticas sobre las que actuaba cada compuesto. Como resultado se obtuvo un conjunto de 14 moléculas con actividad senoterapéutica y pro-autofágica. Se identificaron compuestos cuyas dianas terapéuticas actúan sobre canales iónicos de Na<sup>+</sup> y de K<sup>+</sup>, sobre mediadores inflamatorios como la COX y sobre receptores de

histamina, serotonina o dopamina. Estos resultados apoyan lo descrito por *Lewis et al.* (253) ya que consideran a los canales iónicos de  $\text{Na}^+$  posibles biomarcadores para la artrosis. Además, actualmente se está trabajando en el desarrollo de nuevas moléculas para el tratamiento del dolor que actúan sobre estos canales. Por otro lado, la COX, una enzima clave en la síntesis de prostaglandinas e inhibida por los AINES (255), es una diana farmacológica para el tratamiento del dolor y de la inflamación en la artrosis (41).

Manteniendo nuestro objetivo de identificar fármacos con potencial terapéutico dirigidos no sólo a paliar el dolor y la inflamación sino a actuar sobre mediadores relacionados con los mecanismos patofisiológicos implicados en el desarrollo de la OA como es la alteración del metabolismo lipídico, se seleccionó el Fenofibrato (FN) (31). El FN es un fibrato y un agonista del receptor nuclear  $\text{PPAR}\alpha$  que actualmente es usado en la clínica por su efecto regulador del metabolismo lipídico al disminuir los niveles de triglicéridos y de colesterol en plasma a través de la oxidación de los ácidos grasos (256). Además, los agonistas por este receptor también son conocidos por ejercer efecto anti-inflamatorio en los hepatocitos, en las células endoteliales, así como en los macrófagos, linfocitos y en las células del músculo liso (257). Este mecanismo resulta de especial interés para proponer este factor de transcripción como diana terapéutica debido a su papel regulador sobre el proceso inflamatorio y el metabolismo lipídico, dos procesos que impactan negativamente en la homeostasis del cartílago (40, 258, 259).

## 2. CONFIRMACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DEL FENOFIBRATO

Una de las características de las células senescentes es el incremento de la expresión de las vías de supervivencia (*Senescent Cell Anti-apoptotic Pathways* SCAPs) y consecuentemente su resistencia a la apoptosis. Los nodos de las SCAPs asociadas a la senescencia son PI3K/AKT, p53/p21, BCL-2/BCL- $X_L$ , el inhibidor del activador de plasminógeno 2 (PAI-2) y los receptores efrina y sus ligandos EFNB1 ó EFNB3 (83). Investigaciones en el campo de la senescencia celular mostraron que las células senescentes son susceptibles de morir vía apoptosis al actuar sobre estas vías de supervivencia (98). Debido a los desórdenes que provocan este tipo de células, estudios recientes se centraron en la búsqueda de moléculas senolíticas, es decir, compuestos que eliminen selectivamente las células senescentes. Los primeros fármacos senolíticos identificados fueron Dasatinib y Quercetina (83). Posteriores investigaciones identificaron al Navitoclax (ABT-263) y TW-37 como agentes senolíticos que actúan en las proteínas anti-apoptóticas de la familia Bcl-2 (173, 174). Otros agentes caracterizados *in vitro* fueron Fisetin, Piperlongumine,

A1155463 y A1331852 (177, 178). Recientemente se ha identificado una nueva clase de compuestos con actividad senolítica en fibroblastos embrionarios de ratón de envejecimiento prematuro (MEFs *Ercc1<sup>-/-</sup>*) y en células humanas IMR90 y WI-38. Se trata de 17-AAG y 17-DMAG cuyo mecanismo de acción consiste en inhibir las chaperonas HSP90 (*Heat Shock Protein*) y por consiguiente disminuir la regulación de la vía anti-apoptótica PI3K/AKT (180).

Nuestros hallazgos demostraron que los agonistas PPAR $\alpha$  eliminaban selectivamente los condrocitos senescentes vía apoptosis. Los agonistas sintéticos Fenofibrato, GW7647 y CP775146 presentaron un perfil similar al Navitoclax en los estudios de muerte celular por apoptosis. Las SCAPs que se estudiaron con los agonistas fueron p21 y de forma indirecta PI3K/AKT. La quinasa PI3K en presencia de células senescentes activa a la enzima AKT y AKT activa a mTOR, modulador negativo de la vía de autofagia. A su vez, si AKT está activada se produce una inhibición de FoxO1, uno de los marcadores más importantes para el mantenimiento de la homeostasis del condrocito (85).

En condrocitos artrósicos y envejecidos después del tratamiento con FN se observó una disminución de la expresión de p21 y de prpS6, sustrato de mTOR, sugiriendo que la activación de PPAR $\alpha$  provocaba una disminución de la expresión de las vías de supervivencia y potenciaba la eliminación de las células senescentes por apoptosis. La caracterización del efecto senolítico que presentaban los ligandos PPAR $\alpha$  en condrocitos se confirmó también en MEFs *Ercc1<sup>-/-</sup>* y en las células humanas de pulmón IMR90.

PPAR $\alpha$  forma parte de la familia de los receptores nucleares PPARs. La implicación de estos factores de transcripción en la homeostasis del cartílago articular también se relacionó con el subtipo PPAR $\gamma$ . En estudios realizados en ratones *knockout* en PPAR $\gamma$  se observó que exhibían un fenotipo acelerado de OA, muerte celular por apoptosis y un aumento en la producción de los factores catabólicos e inflamatorios asociados con un incremento en la degradación del cartílago. Estos efectos estaban acompañados de un descenso de los marcadores de la autofagia y un incremento en la expresión de mTOR, principal regulador negativo de la vía de señalización de autofagia (214, 215). En cuanto a PPAR $\alpha$ , se ha investigado su papel en el proceso de autofagia. A nivel hepático, se han realizado estudios en una línea celular de hepatocitos reportera de autofagia a la que le insertaron el tándem mRFP-GFP-LC3. Tras la activación farmacológica de PPAR $\alpha$  con el agonista sintético GW7647 observaron un incremento de coloración rojo-anaranjado indicando un aumento del flujo de autofagia. Además, este proceso lo

estudiaron en ratones *knockout* en PPAR $\alpha$  demostrando que carecían de la capacidad de degradar por vía autofágica los lípidos en el hígado (lipofagia) (153). Recientes investigaciones en la enfermedad de Alzheimer confirmaron que la activación farmacológica de este receptor nuclear activó el proceso de autofagia en las células de la microglía y en las células del glioma humano que expresaban la proteína precursora  $\beta$ -amiloide observando un aumento de la expresión de LC3II y una degradación de la proteína  $\beta$ -amiloide, un marcador neuropatológico en la enfermedad de Alzheimer. A su vez, en estas dos líneas celulares insertaron el tándem mRFP-GFP-LC3 y mostraron un incremento del flujo de autofagia tras el tratamiento de los fibratos Gemfibrozilo y WY14643. Los resultados obtenidos sugirieron que PPAR $\alpha$  podría ser un factor importante para regular el aclaramiento de la proteína  $\beta$ -amiloide por vías autofágicas (219). El efecto positivo que presenta el receptor nuclear PPAR $\alpha$  sobre el proceso de autofagia lo confirmamos en condrocitos humanos con el tratamiento de FN. Empleando la misma técnica basada en insertar el constructo mRFP-GFP-LC3 en las células y en respuesta a la IL-6 se cuantificó por cambios de pH en los lisosomas el flujo autofágico y se confirmó la formación de los autolisosomas, las organelas encargadas de degradar el material en el último paso de la vía autofágica. Nuestros resultados han indicado que el tratamiento de los condrocitos tanto el Fenofibrato como otros agonistas de PPAR $\alpha$  regulaban el proceso de autofagia mediante un incremento del flujo y una mayor expresión de los marcadores homeostáticos LC3 y FoxO1. Estudios en este área demostraron que existía un defecto de los niveles de LC3 y de la expresión de los factores de transcripción pertenecientes a la familia FoxO en condrocitos artrósicos y envejecidos (184, 260).

Los resultados obtenidos sugirieron que tras la activación del receptor nuclear PPAR $\alpha$  se consiguió eliminar selectivamente los condrocitos senescentes y restablecer la homeostasis en el cartílago. Estos datos se apoyan en estudios publicados centrados en estudiar los efectos negativos asociados a la senescencia celular en donde *Xu et al.* (172) describieron que la inyección de células senescentes en rodilla de ratón inducía dolor y daño articular similar a lo observado en la OA.

Las alteraciones metabólicas como la dislipemia, la obesidad y la diabetes mellitus Tipo 2, componentes del síndrome metabólico, son consideradas factores de riesgo para la artrosis por lo que, estudiar el impacto de los lípidos, la glucosa y las adipocinas sobre las células y tejidos articulares es muy interesante (203). Según lo descrito por *Triantaphyllidou et al.*, (261) alteraciones en el metabolismo del colesterol HDL predispone el desarrollo de OA. En el estudio observaron que los

ratones genéticamente modificados con anomalías en el metabolismo lipídico presentaban mayor predisposición de desarrollar OA de rodilla en comparación con el grupo control (261). Un aumento en la captación de glucosa por parte de los condrocitos artrósicos debido a cambios en la expresión del transportador de glucosa GLUT1 (*membrane glucose transporter 1*) inicia programas catalíticos en los que se inducen la MMP1 y la MMP13 (207). La articulación también se ve afectada por las citoquinas y adipocinas secretadas por el tejido adiposo visceral que estimulan el proceso inflamatorio y catabólico en el cartílago. En un estudio realizado en grasa infrapatelar de pacientes artrósicos se observó una disminución de la secreción de citoquinas pro-inflamatorias en respuesta a IL-1 $\beta$  después del tratamiento con agonistas PPAR $\alpha$  (204, 218).

PPAR $\alpha$  está considerado como un regulador transcripcional del metabolismo lipídico y como respuesta clínica a su activación con fibratos produce un incremento de la transcripción de las principales apolipoproteínas que transportan HDL y una disminución de los triglicéridos que se consideran la principal fuente de los ácidos grasos circulantes (256). Los procesos en los cuales está implicado están controlados por muchos de sus genes diana. Algunos de ellos, ACOX1 y CPT1A, son genes implicados en la  $\beta$ -oxidación y peroxi-oxidación de los ácidos grasos, presentaron un descenso en los niveles de su ARNm en hígado de ratas envejecidas, sugiriendo que el envejecimiento inhibe la activación de PPAR $\alpha$  y como consecuencia afectaba la expresión de sus genes diana (165, 221). Otro estudio demostró que la actividad transcripcional de PPAR $\alpha$  puede verse reducida por una inhibición lisosomal. En este sentido, *Hayden et al.* (262) exploraron el efecto de la inhibición lisosomal con Bafilomicina en células hepáticas de ratón. En los análisis observaron un descenso de los genes diana PPAR $\alpha$ , ACOX1 y CPT1A. Estos resultados fueron confirmados cuantificando los niveles proteicos de PPAR $\alpha$  y de su coactivador PPARGC1A. Con estos hallazgos se sugiere la implicación del factor de transcripción en la regulación de la homeostasis celular para promover el proceso de autofagia y degradar el material disfuncional en los autolisosomas. Estos datos resaltan la importancia de activar PPAR $\alpha$  para restablecer su actividad transcripcional en los procesos en los que está implicado. En condrocitos humanos observamos que tras activarlo con agonistas PPAR $\alpha$  se producía un aumento de la expresión del gen CPT1A, indicando que la oxidación de los ácidos grasos en los condrocitos es mediada por la  $\beta$ -oxidación mitocondrial. Estos resultados sugirieron la necesidad de activar PPAR $\alpha$  para restablecer el metabolismo en el cartílago y frenar la producción de moléculas que participen tanto en alteraciones metabólicas

como en fenómenos de inflamación articular y envejecimiento celular característicos de la fisiopatología de la OA.

### 3. EVALUACIÓN DE LA EFICACIA TERAPÉUTICA DEL FENOFIBRATO

En relación a la regulación de los procesos de degradación e inflamación por PPAR $\alpha$ , *Clockaerts et al.* (216) demostraron que la activación con ligandos sintéticos provocaba un descenso tanto de los marcadores catabólicos MMP1, MMP3 y MMP13 como de los inflamatorios NO y PGE2 en respuesta a la IL-1 $\beta$  en cartílago artrósico. Además, sugirieron que esas propiedades antiinflamatorias estaban asociadas con una inhibición de la translocación nuclear de NF $\kappa$ B. Estas evidencias son similares a los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral en condrocitos humanos envejecidos. En respuesta a IL-1 $\beta$  y tras el tratamiento durante 24 horas con FN se observó en el sobrenadante celular una menor concentración de NO liberado. Asimismo, la expresión del factor de transcripción NF $\kappa$ B descendía en condrocitos envejecidos y en artrósicos en respuesta al tratamiento con FN durante 24 horas.

Para investigar la relevancia de PPAR $\alpha$  como posible diana terapéutica en la patogénesis de la artrosis estudiamos si el silenciamiento de este receptor nuclear afectaba a los mecanismos de supervivencia en los condrocitos. Previos estudios demostraron que el envejecimiento disminuía la expresión de PPAR $\alpha$ . Según *Poynter et al.* (220) al examinar los niveles de expresión de ARNm de PPAR $\alpha$  en bazo de ratón observaron que había un descenso asociado al envejecimiento lo cual estaba acompañado de una producción de citoquinas pro-inflamatorias. Estos hallazgos podrían explicar, aunque no concluir, que al realizar un silenciamiento de PPAR $\alpha$  en condrocitos humanos obtuviéramos una mayor predisposición de las células a sufrir senescencia al aumentar la expresión de p21, un incremento de la expresión del mediador inflamatorio NF $\kappa$ B y cambios en los reguladores homeostáticos a través de un descenso de FoxO1 y un incremento de LC3, el cual podría interpretarse como respuesta compensatoria al desbalance articular. La disminución de la expresión de FoxO1 podría explicarse según lo descrito en la ruta PI3K-AKT-FoxO1 en la cual, en un contexto de senescencia celular, AKT ejerce un efecto inhibitorio sobre FoxO1 (85). Los hallazgos identificados resaltan la importancia de mantener funcional PPAR $\alpha$  para regular la homeostasis en los condrocitos y así prevenir o retrasar la activación de aquellos eventos implicados en el desarrollo de la enfermedad.

#### 4. PAPEL DEL RECEPTOR NUCLEAR PPAR $\alpha$ EN MODELOS PRECLÍNICOS DE ENVEJECIMIENTO ARTICULAR Y ARTROSIS

La evaluación de los niveles de PPAR $\alpha$  en modelos de ratón de envejecimiento espontáneo y de OA inducida quirúrgicamente así como en sangre y tejido de pacientes artrósicos indicaron un defecto de PPAR $\alpha$  en los patrones asociados a la enfermedad. En cambio, se ha visto que tras la activación farmacológica de PPAR $\alpha$  con fibratos en pacientes artrósicos de rodilla procedentes de la cohorte Osteoarthritis Initiative (OAI) se observó un descenso significativo de la discapacidad y una tendencia a disminuir el dolor. Además, en el grupo de pacientes que tomaron fibratos hubo un menor porcentaje de reemplazamiento quirúrgico. Estos hallazgos siguen la línea de investigación aplicada en un estudio de artrosis erosiva de manos en el cual el tratamiento de FN (145 mg/día) a 14 pacientes con artrosis de mano erosiva durante 12 semanas estuvo asociado con un descenso del dolor, de la rigidez matutina y una mejora en la función articular de la mano (263). En cambio, en otro estudio realizado en la OAI se hizo un análisis exploratorio de 28 clases de medicamentos con un total de 2938 pacientes para identificar la progresión de la artrosis en los pacientes usuarios de estos medicamentos y así determinar posibles vías o intervenciones asociadas con la modificación de la enfermedad. A diferencia de lo descrito por *Shirinsky et al.* (263), aquellos que tomaron fibratos no mostraron un retraso en la progresión ni una disminución de dolor. En cambio, otro fármaco perteneciente al grupo de los antilipémicos presentaba tanto en el primer *screening* como en el segundo mejoras a nivel estructural y en sintomatología sugiriendo que intervenciones en el metabolismo del colesterol podrían atenuar el grado de inflamación que se produce en la artrosis (264).

La adquisición de resultados clínicos apoyan la hipótesis de que los fibratos pueden mejorar la función articular en pacientes artrósicos. La realización de futuros estudios sería determinante para incluir a este grupo de fármacos como modificadores de la enfermedad. Dado el papel que desempeña el factor de transcripción PPAR $\alpha$  en el metabolismo lipídico y las consecuencias que provocan los desórdenes metabólicos en la OA, este mecanismo podría considerarse como una diana terapéutica para el tratamiento de la enfermedad.

## **CONCLUSIONES**



## **1. IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS SENOTERAPÉUTICOS Y MODULADORES DE AUTOFAGIA MEDIANTE TÉCNICAS DE CRIBADO DE ALTO RENDIMIENTO**

- 1.1. Se identificó a la IL-6 como un modelo de senescencia y de inhibición del flujo de autofagia en condrocitos
- 1.2. Se desarrolló una metodología de *screening* para identificar compuestos con actividad senoterapéutica y pro-autofágica
- 1.3. Se identificaron 14 compuestos con actividad senoterapéutica y pro-autofágica
- 1.4. Se escogió el Fenofibrato para su posterior confirmación por la relevancia de su mecanismo de acción

## **2. CONFIRMACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DEL FENOFIBRATO**

- 2.1. El Fenofibrato no afecta a la viabilidad del condrocito

El Fenofibrato y los agonistas PPAR $\alpha$ :

- 2.2. Presentan un efecto senolítico en condrocitos humanos
- 2.3. Eliminan selectivamente condrocitos senescentes mediante la activación de la vía de apoptosis
- 2.4. Regulan la homeostasis del condrocito
- 2.5. Regulan la  $\beta$ -oxidación de los ácidos grasos en condrocitos humanos

## **3. EVALUACIÓN DE LA EFICACIA TERAPÉUTICA DEL FENOFIBRATO**

El Fenofibrato:

- 3.1. Regula la expresión de PPAR $\alpha$  en condrocitos artrósicos
- 3.2. Protege de la degradación del cartílago articular
- 3.3. Regula los procesos de senescencia, autofagia e inflamación en condrocitos humanos artrósicos y envejecidos

**4. PAPEL DEL RECEPTOR NUCLEAR PPAR $\alpha$  EN MODELOS PRECLÍNICOS DE ENVEJECIMIENTO ARTICULAR Y DE ARTROSIS**

- 4.1. El receptor nuclear PPAR $\alpha$  está disminuido en modelos de envejecimiento y artrosis en ratón
- 4.2. El receptor nuclear PPAR $\alpha$  está disminuido en sangre y cartílago de pacientes con artrosis
- 4.3. La activación farmacológica de PPAR $\alpha$  con Fenofibrato mejora las condiciones clínicas en pacientes con artrosis

## **CONCLUSIONS**

## **1. IDENTIFICATION OF SENOTHERAPEUTICS AND AUTOPHAGY MODULATORS BY HIGH-THROUGHPUT SCREENING**

- 1.1. IL-6 was identified as a model for chondrocyte senescence and inhibition of autophagy flux in chondrocytes
- 1.2. A detection methodology was developed to identify compounds with senotherapeutic and pro-autophagy activity
- 1.3. Fourteen compounds with senotherapeutic and pro-autophagy activity were identified
- 1.4. Fenofibrate was selected for further confirmation due to the relevance of the target mechanism

## **2. CONFIRMATION OF BIOLOGICAL ACTIVITY OF FENOFIBRATE**

- 2.1. Fenofibrate does not affect the viability of the chondrocyte  
Fenofibrate and PPAR $\alpha$  agonists:
- 2.2. Are senolytic compounds in human chondrocytes
- 2.3. Selectively eliminate senescent chondrocytes by activating the apoptosis pathway
- 2.4. Regulate chondrocyte homeostasis
- 2.5. Regulate the  $\beta$ -oxidation of fatty acids in human chondrocytes

## **3. EVALUATION OF THERAPEUTIC EFFICACY OF FENOFIBRATE**

Fenofibrate

- 3.1. Regulates the expression of PPAR $\alpha$  in OA chondrocytes
- 3.2. Protects from the degradation of articular cartilage
- 3.3. Regulates the processes of senescence, autophagy and inflammation in arthritic and aged human chondrocytes

## **4. ROLE OF THE NUCLEAR RECEPTOR PPAR $\alpha$ IN PRECLINICAL MODELS OF AGING AND OSTEOARTHRITIS**

- 4.1. PPAR $\alpha$  is decreased in models of aging and OA in mice
- 4.2. PPAR $\alpha$  is decreased in blood and cartilage of patients with OA
- 4.3. The pharmacological activation of PPAR $\alpha$  with Fenofibrate improves clinical conditions in patients with OA

## **BIBLIOGRAFÍA**

1. Juneja P, Hubbard JB. Anatomy, Joints. StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing StatPearls Publishing LLC.; 2019.
2. Khan IM, Redman SN, Williams R, Dowthwaite GP, Oldfield SF, Archer CW. The development of synovial joints. *Curr Top Dev Biol.* 2007;79:1-36.
3. Martel-Pelletier J, Barr AJ, Cicuttini FM, Conaghan PG, Cooper C, Goldring MB, et al. Osteoarthritis. *Nat Rev Dis Primers.* 2016;2:16072.
4. Prieto-Alhambra D, Judge A, Javaid MK, Cooper C, Diez-Perez A, Arden NK. Incidence and risk factors for clinically diagnosed knee, hip and hand osteoarthritis: influences of age, gender and osteoarthritis affecting other joints. *Ann Rheum Dis.* 2014;73(9):1659-64.
5. Martel-Pelletier J, Boileau C, Pelletier JP, Roughley PJ. Cartilage in normal and osteoarthritis conditions. *Best Pract Res Clin Rheumatol.* 2008;22(2):351-84.
6. Sophia Fox AJ, Bedi A, Rodeo SA. The basic science of articular cartilage: structure, composition, and function. *Sports Health.* 2009;1(6):461-8.
7. Krishnan Y, Grodzinsky AJ. Cartilage diseases. *Matrix Biol.* 2018;71-72:51-69.
8. Goldring MB. Update on the biology of the chondrocyte and new approaches to treating cartilage diseases. *Best Pract Res Clin Rheumatol.* 2006;20(5):1003-25.
9. Heinegard D, Saxne T. The role of the cartilage matrix in osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol.* 2011;7(1):50-6.
10. Eyre DR, Weis MA, Wu JJ. Articular cartilage collagen: an irreplaceable framework? *Eur Cell Mater.* 2006;12:57-63.
11. Eyre D. Collagen of articular cartilage. *Arthritis Res.* 2002;4(1):30-5.
12. Cremer MA, Rosloniec EF, Kang AH. The cartilage collagens: a review of their structure, organization, and role in the pathogenesis of experimental arthritis in animals and in human rheumatic disease. *J Mol Med (Berl).* 1998;76(3-4):275-88.
13. Hunziker EB, Kapfinger E, Geiss J. The structural architecture of adult mammalian articular cartilage evolves by a synchronized process of tissue resorption and neof ormation during postnatal development. *Osteoarthritis Cartilage.* 2007;15(4):403-13.
14. Goldring SR, Goldring MB. Changes in the osteochondral unit during osteoarthritis: structure, function and cartilage-bone crosstalk. *Nat Rev Rheumatol.* 2016;12(11):632-44.
15. Houard X, Goldring MB, Berenbaum F. Homeostatic mechanisms in articular cartilage and role of inflammation in osteoarthritis. *Curr Rheumatol Rep.* 2013;15(11):375.
16. Wang Y, Wei L, Zeng L, He D, Wei X. Nutrition and degeneration of articular cartilage. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2013;21(8):1751-62.
17. Kraus VB, Blanco FJ, Englund M, Karsdal MA, Lohmander LS. Call for standardized definitions of osteoarthritis and risk stratification for clinical trials and clinical use. *Osteoarthritis Cartilage.* 2015;23(8):1233-41.
18. Kohn MD, Sassoon AA, Fernando ND. Classifications in Brief: Kellgren-Lawrence Classification of Osteoarthritis. *Clin Orthop Relat Res.* 2016;474(8):1886-93.

19. Altman R, Alarcon G, Appelrouth D, Bloch D, Borenstein D, Brandt K, et al. The American College of Rheumatology criteria for the classification and reporting of osteoarthritis of the hip. *Arthritis Rheum.* 1991;34(5):505-14.
20. Altman R, Asch E, Bloch D, Bole G, Borenstein D, Brandt K, et al. Development of criteria for the classification and reporting of osteoarthritis. Classification of osteoarthritis of the knee. Diagnostic and Therapeutic Criteria Committee of the American Rheumatism Association. *Arthritis Rheum.* 1986;29(8):1039-49.
21. Altman R, Alarcon G, Appelrouth D, Bloch D, Borenstein D, Brandt K, et al. The American College of Rheumatology criteria for the classification and reporting of osteoarthritis of the hand. *Arthritis Rheum.* 1990;33(11):1601-10.
22. Hunter DJ, Bierma-Zeinstra S. Osteoarthritis. *Lancet.* 2019;393(10182):1745-59.
23. Yu D, Peat G, Bedson J, Jordan KP. Annual consultation incidence of osteoarthritis estimated from population-based health care data in England. *Rheumatology (Oxford).* 2015;54(11):2051-60.
24. Hunter DJ, Felson DT. Osteoarthritis. *Bmj.* 2006;332(7542):639-42.
25. Loeser RF, Goldring SR, Scanzello CR, Goldring MB. Osteoarthritis: a disease of the joint as an organ. *Arthritis Rheum.* 2012;64(6):1697-707.
26. Palazzo C, Nguyen C, Lefevre-Colau MM, Rannou F, Poiraudreau S. Risk factors and burden of osteoarthritis. *Ann Phys Rehabil Med.* 2016;59(3):134-8.
27. Felson DT, Lawrence RC, Dieppe PA, Hirsch R, Helmick CG, Jordan JM, et al. Osteoarthritis: new insights. Part 1: the disease and its risk factors. *Ann Intern Med.* 2000;133(8):635-46.
28. Johnson VL, Hunter DJ. The epidemiology of osteoarthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol.* 2014;28(1):5-15.
29. Silverwood V, Blagojevic-Bucknall M, Jinks C, Jordan JL, Protheroe J, Jordan KP. Current evidence on risk factors for knee osteoarthritis in older adults: a systematic review and meta-analysis. *Osteoarthritis Cartilage.* 2015;23(4):507-15.
30. Grotle M, Hagen KB, Natvig B, Dahl FA, Kvien TK. Obesity and osteoarthritis in knee, hip and/or hand: an epidemiological study in the general population with 10 years follow-up. *BMC Musculoskelet Disord.* 2008;9:132.
31. Sellam J, Berenbaum F. Is osteoarthritis a metabolic disease? *Joint Bone Spine.* 2013;80(6):568-73.
32. Valdes AM, Spector TD. Genetic epidemiology of hip and knee osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol.* 2011;7(1):23-32.
33. Malfait AM. Osteoarthritis year in review 2015: biology. *Osteoarthritis Cartilage.* 2016;24(1):21-6.
34. Favero M, Ramonda R, Goldring MB, Goldring SR, Punzi L. Early knee osteoarthritis. *RMD Open.* 2015;1(Suppl 1):e000062.
35. Troeberg L, Nagase H. Proteases involved in cartilage matrix degradation in osteoarthritis. *Biochim Biophys Acta.* 2012;1824(1):133-45.

36. Goldring MB, Marcu KB. Cartilage homeostasis in health and rheumatic diseases. *Arthritis Res Ther*. 2009;11(3):224.
37. Xia B, Di C, Zhang J, Hu S, Jin H, Tong P. Osteoarthritis pathogenesis: a review of molecular mechanisms. *Calcif Tissue Int*. 2014;95(6):495-505.
38. Burrage PS, Mix KS, Brinckerhoff CE. Matrix metalloproteinases: role in arthritis. *Front Biosci*. 2006;11:529-43.
39. Mead TJ, Apte SS. ADAMTS proteins in human disorders. *Matrix Biol*. 2018;71-72:225-39.
40. Goldring MB, Otero M. Inflammation in osteoarthritis. *Curr Opin Rheumatol*. 2011;23(5):471-8.
41. Majeed MH, Sherazi SAA, Bacon D, Bajwa ZH. Pharmacological Treatment of Pain in Osteoarthritis: A Descriptive Review. *Curr Rheumatol Rep*. 2018;20(12):88.
42. Jones IA, Togashi R, Wilson ML, Heckmann N, Vangsness CT, Jr. Intra-articular treatment options for knee osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol*. 2019;15(2):77-90.
43. Lopez-Otin C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G. The hallmarks of aging. *Cell*. 2013;153(6):1194-217.
44. Soto-Gamez A, Demaria M. Therapeutic interventions for aging: the case of cellular senescence. *Drug Discov Today*. 2017;22(5):786-95.
45. Hernandez-Segura A, Nehme J, Demaria M. Hallmarks of Cellular Senescence. *Trends Cell Biol*. 2018;28(6):436-53.
46. Hayflick L, Moorhead PS. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res*. 1961;25:585-621.
47. Hayflick L. THE LIMITED IN VITRO LIFETIME OF HUMAN DIPLOID CELL STRAINS. *Exp Cell Res*. 1965;37:614-36.
48. Munoz-Espin D, Serrano M. Cellular senescence: from physiology to pathology. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2014;15(7):482-96.
49. Adams PD. Healing and hurting: molecular mechanisms, functions, and pathologies of cellular senescence. *Mol Cell*. 2009;36(1):2-14.
50. Shay JW, Wright WE. Telomeres and telomerase: three decades of progress. *Nat Rev Genet*. 2019;20(5):299-309.
51. Lu W, Zhang Y, Liu D, Songyang Z, Wan M. Telomeres-structure, function, and regulation. *Exp Cell Res*. 2013;319(2):133-41.
52. Armanios M. Telomeres and age-related disease: how telomere biology informs clinical paradigms. *J Clin Invest*. 2013;123(3):996-1002.
53. Blasco MA. Telomere length, stem cells and aging. *Nat Chem Biol*. 2007;3(10):640-9.
54. Collado M, Blasco MA, Serrano M. Cellular senescence in cancer and aging. *Cell*. 2007;130(2):223-33.
55. Petrova NV, Velichko AK, Razin SV, Kantidze OL. Small molecule compounds that induce cellular senescence. *Aging Cell*. 2016;15(6):999-1017.



56. Chen QM, Liu J, Merrett JB. Apoptosis or senescence-like growth arrest: influence of cell-cycle position, p53, p21 and bax in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> response of normal human fibroblasts. *Biochem J.* 2000;347(Pt 2):543-51.
57. Di Micco R, Fumagalli M, Cicalese A, Piccinin S, Gasparini P, Luise C, et al. Oncogene-induced senescence is a DNA damage response triggered by DNA hyper-replication. *Nature.* 2006;444(7119):638-42.
58. Kuilman T, Michaloglou C, Vredeveld LC, Douma S, van Doorn R, Desmet CJ, et al. Oncogene-induced senescence relayed by an interleukin-dependent inflammatory network. *Cell.* 2008;133(6):1019-31.
59. Chen Z, Trotman LC, Shaffer D, Lin HK, Dotan ZA, Niki M, et al. Crucial role of p53-dependent cellular senescence in suppression of Pten- deficient tumorigenesis. *Nature.* 2005;436(7051):725-30.
60. Kuilman T, Peeper DS. Senescence-messaging secretome: SMS-ing cellular stress. *Nat Rev Cancer.* 2009;9(2):81-94.
61. Lopes-Paciencia S, Saint-Germain E, Rowell MC, Ruiz AF, Kalegari P, Ferbeyre G. The senescence-associated secretory phenotype and its regulation. *Cytokine.* 2019;117:15-22.
62. Franceschi C, Bonafe M, Valensin S, Olivieri F, De Luca M, Ottaviani E, et al. Inflamm-aging. An evolutionary perspective on immunosenescence. *Ann N Y Acad Sci.* 2000;908:244-54.
63. Freund A, Orjalo AV, Desprez PY, Campisi J. Inflammatory networks during cellular senescence: causes and consequences. *Trends Mol Med.* 2010;16(5):238-46.
64. Loeser RF, Collins JA, Diekmann BO. Ageing and the pathogenesis of osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol.* 2016;12(7):412-20.
65. Coppe JP, Desprez PY, Krtolica A, Campisi J. The senescence-associated secretory phenotype: the dark side of tumor suppression. *Annu Rev Pathol.* 2010;5:99-118.
66. Acosta JC, Banito A, Wuestefeld T, Georgilis A, Janich P, Morton JP, et al. A complex secretory program orchestrated by the inflammasome controls paracrine senescence. *Nat Cell Biol.* 2013;15(8):978-90.
67. Nelson G, Wordsworth J, Wang C, Jurk D, Lawless C, Martin-Ruiz C, et al. A senescent cell bystander effect: senescence-induced senescence. *Aging Cell.* 2012;11(2):345-9.
68. Malaquin N, Martinez A, Rodier F. Keeping the senescence secretome under control: Molecular reins on the senescence-associated secretory phenotype. *Exp Gerontol.* 2016;82:39-49.
69. Campisi J, d'Adda di Fagagna F. Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007;8(9):729-40.
70. Chien Y, Scuoppo C, Wang X, Fang X, Balgley B, Bolden JE, et al. Control of the senescence-associated secretory phenotype by NF-kappaB promotes senescence and enhances chemosensitivity. *Genes Dev.* 2011;25(20):2125-36.

71. Coppe JP, Rodier F, Patil CK, Freund A, Desprez PY, Campisi J. Tumor suppressor and aging biomarker p16(INK4a) induces cellular senescence without the associated inflammatory secretory phenotype. *J Biol Chem*. 2011;286(42):36396-403.
72. Kang C, Xu Q, Martin TD, Li MZ, Demaria M, Aron L, et al. The DNA damage response induces inflammation and senescence by inhibiting autophagy of GATA4. *Science*. 2015;349(6255):aaa5612.
73. Rodier F, Coppe JP, Patil CK, Hoeijmakers WA, Munoz DP, Raza SR, et al. Persistent DNA damage signalling triggers senescence-associated inflammatory cytokine secretion. *Nat Cell Biol*. 2009;11(8):973-9.
74. Fumagalli M, Rossiello F, Mondello C, d'Adda di Fagagna F. Stable cellular senescence is associated with persistent DDR activation. *PLoS One*. 2014;9(10):e110969.
75. Malumbres M. Cyclin-dependent kinases. *Genome Biol*. 2014;15(6):122.
76. Lim S, Kaldis P. Cdks, cyclins and CKIs: roles beyond cell cycle regulation. *Development*. 2013;140(15):3079-93.
77. Malumbres M, Harlow E, Hunt T, Hunter T, Lahti JM, Manning G, et al. Cyclin-dependent kinases: a family portrait. *Nat Cell Biol*. 11. England2009. p. 1275-6.
78. Harbour JW, Dean DC. The Rb/E2F pathway: expanding roles and emerging paradigms. *Genes Dev*. 2000;14(19):2393-409.
79. Venturelli S, Berger A, Weiland T, Essmann F, Waibel M, Nuebling T, et al. Differential induction of apoptosis and senescence by the DNA methyltransferase inhibitors 5-azacytidine and 5-aza-2'-deoxycytidine in solid tumor cells. *Mol Cancer Ther*. 2013;12(10):2226-36.
80. Passegue E, Wagner EF. JunB suppresses cell proliferation by transcriptional activation of p16(INK4a) expression. *Embo j*. 2000;19(12):2969-79.
81. Ohtani N, Zebedee Z, Huot TJ, Stinson JA, Sugimoto M, Ohashi Y, et al. Opposing effects of Ets and Id proteins on p16INK4a expression during cellular senescence. *Nature*. 2001;409(6823):1067-70.
82. Li J, Poi MJ, Tsai MD. Regulatory mechanisms of tumor suppressor P16(INK4A) and their relevance to cancer. *Biochemistry*. 2011;50(25):5566-82.
83. Zhu Y, Tchkonja T, Pirtskhalava T, Gower AC, Ding H, Giorgadze N, et al. The Achilles' heel of senescent cells: from transcriptome to senolytic drugs. *Aging Cell*. 2015;14(4):644-58.
84. Lisabeth EM, Falivelli G, Pasquale EB. Eph receptor signaling and ephrins. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2013;5(9).
85. Chandralapaty S. Negative feedback and adaptive resistance to the targeted therapy of cancer. *Cancer Discov*. 2012;2(4):311-9.
86. Vousden KH, Prives C. Blinded by the Light: The Growing Complexity of p53. *Cell*. 2009;137(3):413-31.
87. Yosef R, Pilpel N, Papsimadov N, Gal H, Ovadya Y, Vadai E, et al. p21 maintains senescent cell viability under persistent DNA damage response by restraining JNK and caspase signaling. *Embo j*. 2017;36(15):2280-95.

88. Yip KW, Reed JC. Bcl-2 family proteins and cancer. *Oncogene*. 2008;27(50):6398-406.
89. Yosef R, Pilpel N, Tokarsky-Amiel R, Biran A, Ovadya Y, Cohen S, et al. Directed elimination of senescent cells by inhibition of BCL-W and BCL-XL. *Nat Commun*. 2016;7:11190.
90. Kurz DJ, Decary S, Hong Y, Erusalimsky JD. Senescence-associated (beta)-galactosidase reflects an increase in lysosomal mass during replicative ageing of human endothelial cells. *J Cell Sci*. 2000;113 ( Pt 20):3613-22.
91. Lee BY, Han JA, Im JS, Morrone A, Johung K, Goodwin EC, et al. Senescence-associated beta-galactosidase is lysosomal beta-galactosidase. *Aging Cell*. 2006;5(2):187-95.
92. Debaq-Chainiaux F, Erusalimsky JD, Campisi J, Toussaint O. Protocols to detect senescence-associated beta-galactosidase (SA-beta-gal) activity, a biomarker of senescent cells in culture and in vivo. *Nat Protoc*. 2009;4(12):1798-806.
93. Kuilman T, Michaloglou C, Mooi WJ, Peeper DS. The essence of senescence. *Genes Dev*. 2010;24(22):2463-79.
94. DiLoreto R, Murphy CT. The cell biology of aging. *Mol Biol Cell*. 2015;26(25):4524-31.
95. Gurlay CW, Ayscough KR. The actin cytoskeleton: a key regulator of apoptosis and ageing? *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2005;6(7):583-9.
96. Lloyd AC. The regulation of cell size. *Cell*. 2013;154(6):1194-205.
97. Scaffidi P, Misteli T. Lamin A-dependent nuclear defects in human aging. *Science*. 2006;312(5776):1059-63.
98. van Deursen JM. The role of senescent cells in ageing. *Nature*. 2014;509(7501):439-46.
99. Dasari A, Bartholomew JN, Volonte D, Galbiati F. Oxidative stress induces premature senescence by stimulating caveolin-1 gene transcription through p38 mitogen-activated protein kinase/Sp1-mediated activation of two GC-rich promoter elements. *Cancer Res*. 2006;66(22):10805-14.
100. Cho KA, Ryu SJ, Oh YS, Park JH, Lee JW, Kim HP, et al. Morphological adjustment of senescent cells by modulating caveolin-1 status. *J Biol Chem*. 2004;279(40):42270-8.
101. Volonte D, Zou H, Bartholomew JN, Liu Z, Morel PA, Galbiati F. Oxidative stress-induced inhibition of Sirt1 by caveolin-1 promotes p53-dependent premature senescence and stimulates the secretion of interleukin 6 (IL-6). *J Biol Chem*. 2015;290(7):4202-14.
102. Yu DM, Jung SH, An HT, Lee S, Hong J, Park JS, et al. Caveolin-1 deficiency induces premature senescence with mitochondrial dysfunction. *Aging Cell*. 2017;16(4):773-84.
103. Korolchuk VI, Miwa S, Carroll B, von Zglinicki T. Mitochondria in Cell Senescence: Is Mitophagy the Weakest Link? *EBioMedicine*. 2017;21:7-13.
104. Herranz N, Gil J. Mitochondria and senescence: new actors for an old play. *Embo j*. 2016;35(7):701-2.

105. Correia-Melo C, Marques FD, Anderson R, Hewitt G, Hewitt R, Cole J, et al. Mitochondria are required for pro-ageing features of the senescent phenotype. *Embo j.* 2016;35(7):724-42.
106. Mizushima N. Autophagy: process and function. *Genes Dev.* 2007;21(22):2861-73.
107. Cuervo AM. Autophagy: in sickness and in health. *Trends Cell Biol.* 2004;14(2):70-7.
108. Mizushima N. The pleiotropic role of autophagy: from protein metabolism to bactericide. *Cell Death Differ.* 2005;12 Suppl 2:1535-41.
109. Galluzzi L, Baehrecke EH, Ballabio A, Boya P, Bravo-San Pedro JM, Cecconi F, et al. Molecular definitions of autophagy and related processes. *Embo j.* 2017;36(13):1811-36.
110. Tsukada M, Ohsumi Y. Isolation and characterization of autophagy-defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* 1993;333(1-2):169-74.
111. Levine B, Klionsky DJ. Autophagy wins the 2016 Nobel Prize in Physiology or Medicine: Breakthroughs in baker's yeast fuel advances in biomedical research. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2017;114(2):201-5.
112. Rockel JS, Kapoor M. Autophagy: controlling cell fate in rheumatic diseases. *Nat Rev Rheumatol.* 2016;12(9):517-31.
113. Lynch-Day MA, Klionsky DJ. The Cvt pathway as a model for selective autophagy. *FEBS Lett.* 2010;584(7):1359-66.
114. Cuervo AM. Autophagy and aging: keeping that old broom working. *Trends Genet.* 2008;24(12):604-12.
115. Ciechanover A. Proteolysis: from the lysosome to ubiquitin and the proteasome. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 6. England2005. p. 79-87.
116. Mizushima N. A brief history of autophagy from cell biology to physiology and disease. *Nat Cell Biol.* 2018;20(5):521-7.
117. Amaya C, Fader CM, Colombo MI. Autophagy and proteins involved in vesicular trafficking. *FEBS Lett.* 2015;589(22):3343-53.
118. Ohsumi Y, Mizushima N. Two ubiquitin-like conjugation systems essential for autophagy. *Semin Cell Dev Biol.* 2004;15(2):231-6.
119. Mizushima N, Yoshimori T, Levine B. Methods in mammalian autophagy research. *Cell.* 2010;140(3):313-26.
120. Cuervo AM. Chaperone-mediated autophagy: selectivity pays off. *Trends Endocrinol Metab.* 2010;21(3):142-50.
121. Gatica D, Lahiri V, Klionsky DJ. Cargo recognition and degradation by selective autophagy. *Nat Cell Biol.* 2018;20(3):233-42.
122. Choi AM, Ryter SW, Levine B. Autophagy in human health and disease. *N Engl J Med.* 2013;368(7):651-62.
123. Glick D, Barth S, Macleod KF. Autophagy: cellular and molecular mechanisms. *J Pathol.* 2010;221(1):3-12.
124. Nakatogawa H, Suzuki K, Kamada Y, Ohsumi Y. Dynamics and diversity in autophagy mechanisms: lessons from yeast. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2009;10(7):458-67.

125. Hansen M, Rubinsztein DC, Walker DW. Autophagy as a promoter of longevity: insights from model organisms. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2018;19(9):579-93.
126. Lu J, He L, Behrends C, Araki M, Araki K, Jun Wang Q, et al. NRBF2 regulates autophagy and prevents liver injury by modulating Atg14L-linked phosphatidylinositol-3 kinase III activity. *Nat Commun.* 2014;5:3920.
127. Backer JM. The regulation and function of Class III PI3Ks: novel roles for Vps34. *Biochem J.* 2008;410(1):1-17.
128. Xie Z, Klionsky DJ. Autophagosome formation: core machinery and adaptations. *Nat Cell Biol.* 2007;9(10):1102-9.
129. Lamb CA, Yoshimori T, Tooze SA. The autophagosome: origins unknown, biogenesis complex. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2013;14(12):759-74.
130. Antonioli M, Di Rienzo M, Piacentini M, Fimia GM. Emerging Mechanisms in Initiating and Terminating Autophagy. *Trends Biochem Sci.* 2017;42(1):28-41.
131. Fujita N, Itoh T, Omori H, Fukuda M, Noda T, Yoshimori T. The Atg16L complex specifies the site of LC3 lipidation for membrane biogenesis in autophagy. *Mol Biol Cell.* 2008;19(5):2092-100.
132. McEwan DG, Popovic D, Gubas A, Terawaki S, Suzuki H, Stadel D, et al. PLEKHM1 regulates autophagosome-lysosome fusion through HOPS complex and LC3/GABARAP proteins. *Mol Cell.* 2015;57(1):39-54.
133. Settembre C, Fraldi A, Medina DL, Ballabio A. Signals from the lysosome: a control centre for cellular clearance and energy metabolism. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2013;14(5):283-96.
134. Yoo YJ, Kim H, Park SR, Yoon YJ. An overview of rapamycin: from discovery to future perspectives. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 2017;44(4-5):537-53.
135. Laplante M, Sabatini DM. mTOR signaling in growth control and disease. *Cell.* 2012;149(2):274-93.
136. Lapierre LR, Kumsta C, Sandri M, Ballabio A, Hansen M. Transcriptional and epigenetic regulation of autophagy in aging. *Autophagy.* 2015;11(6):867-80.
137. Hung CM, Garcia-Haro L, Sparks CA, Guertin DA. mTOR-dependent cell survival mechanisms. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2012;4(12).
138. Germain P, Staels B, Dacquet C, Spedding M, Laudet V. Overview of nomenclature of nuclear receptors. *Pharmacol Rev.* 2006;58(4):685-704.
139. Perissi V, Rosenfeld MG. Controlling nuclear receptors: the circular logic of cofactor cycles. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2005;6(7):542-54.
140. Nuclear Receptors Nomenclature C. A unified nomenclature system for the nuclear receptor superfamily. *Cell.* 97. United States 1999. p. 161-3.
141. Bain DL, Heneghan AF, Connaghan-Jones KD, Miura MT. Nuclear receptor structure: implications for function. *Annu Rev Physiol.* 2007;69:201-20.

142. Roshan-Moniri M, Hsing M, Butler MS, Cherkasov A, Rennie PS. Orphan nuclear receptors as drug targets for the treatment of prostate and breast cancers. *Cancer Treat Rev.* 2014;40(10):1137-52.
143. Gronemeyer H, Gustafsson JA, Laudet V. Principles for modulation of the nuclear receptor superfamily. *Nat Rev Drug Discov.* 2004;3(11):950-64.
144. Boitier E, Gautier JC, Roberts R. Advances in understanding the regulation of apoptosis and mitosis by peroxisome-proliferator activated receptors in pre-clinical models: relevance for human health and disease. *Comp Hepatol.* 2003;2(1):3.
145. Grygiel-Gorniak B. Peroxisome proliferator-activated receptors and their ligands: nutritional and clinical implications--a review. *Nutr J.* 2014;13:17.
146. Willson TM, Brown PJ, Sternbach DD, Henke BR. The PPARs: from orphan receptors to drug discovery. *J Med Chem.* 2000;43(4):527-50.
147. Berger J, Moller DE. The mechanisms of action of PPARs. *Annu Rev Med.* 2002;53:409-35.
148. Nettles KW, Greene GL. Ligand control of coregulator recruitment to nuclear receptors. *Annu Rev Physiol.* 2005;67:309-33.
149. Rigano D, Sirignano C, Tagliatela-Scafati O. The potential of natural products for targeting PPARalpha. *Acta Pharm Sin B.* 2017;7(4):427-38.
150. Evans RM, Barish GD, Wang YX. PPARs and the complex journey to obesity. *Nat Med.* 2004;10(4):355-61.
151. Kersten S. Integrated physiology and systems biology of PPARalpha. *Mol Metab.* 2014;3(4):354-71.
152. Zoete V, Grosdidier A, Michielin O. Peroxisome proliferator-activated receptor structures: ligand specificity, molecular switch and interactions with regulators. *Biochim Biophys Acta.* 2007;1771(8):915-25.
153. Lee JM, Wagner M, Xiao R, Kim KH, Feng D, Lazar MA, et al. Nutrient-sensing nuclear receptors coordinate autophagy. *Nature.* 2014;516(7529):112-5.
154. Kersten S, Seydoux J, Peters JM, Gonzalez FJ, Desvergne B, Wahli W. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha mediates the adaptive response to fasting. *J Clin Invest.* 1999;103(11):1489-98.
155. Han L, Shen WJ, Bittner S, Kraemer FB, Azhar S. PPARs: regulators of metabolism and as therapeutic targets in cardiovascular disease. Part I: PPAR-alpha. *Future Cardiol.* 2017;13(3):259-78.
156. Gross B, Pawlak M, Lefebvre P, Staels B. PPARs in obesity-induced T2DM, dyslipidaemia and NAFLD. *Nat Rev Endocrinol.* 2017;13(1):36-49.
157. Katsiki N, Nikolic D, Montalto G, Banach M, Mikhailidis DP, Rizzo M. The role of fibrate treatment in dyslipidemia: an overview. *Curr Pharm Des.* 2013;19(17):3124-31.
158. Duval C, Muller M, Kersten S. PPARalpha and dyslipidemia. *Biochim Biophys Acta.* 2007;1771(8):961-71.

159. Colin S, Briand O, Touche V, Wouters K, Baron M, Pattou F, et al. Activation of intestinal peroxisome proliferator-activated receptor- $\alpha$  increases high-density lipoprotein production. *Eur Heart J*. 2013;34(32):2566-74.
160. Shipman KE, Strange RC, Ramachandran S. Use of fibrates in the metabolic syndrome: A review. *World J Diabetes*. 2016;7(5):74-88.
161. Staels B, Maes M, Zambon A. Fibrates and future PPAR $\alpha$  agonists in the treatment of cardiovascular disease. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*. 2008;5(9):542-53.
162. Staels B, Koenig W, Habib A, Merval R, Lebret M, Torra IP, et al. Activation of human aortic smooth-muscle cells is inhibited by PPAR $\alpha$  but not by PPAR $\gamma$  activators. *Nature*. 1998;393(6687):790-3.
163. Marx N, Sukhova GK, Collins T, Libby P, Plutzky J. PPAR $\alpha$  activators inhibit cytokine-induced vascular cell adhesion molecule-1 expression in human endothelial cells. *Circulation*. 1999;99(24):3125-31.
164. Mandard S, Muller M, Kersten S. Peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$  target genes. *Cell Mol Life Sci*. 2004;61(4):393-416.
165. Bougarne N, Weyers B, Desmet SJ, Deckers J, Ray DW, Staels B, et al. Molecular Actions of PPAR $\alpha$  in Lipid Metabolism and Inflammation. *Endocr Rev*. 2018;39(5):760-802.
166. Han L, Shen WJ, Bittner S, Kraemer FB, Azhar S. PPARs: regulators of metabolism and as therapeutic targets in cardiovascular disease. Part II: PPAR- $\beta$ / $\delta$  and PPAR- $\gamma$ . *Future Cardiol*. 2017;13(3):279-96.
167. Tontonoz P, Spiegelman BM. Fat and beyond: the diverse biology of PPAR $\gamma$ . *Annu Rev Biochem*. 2008;77:289-312.
168. Morrisette-Thomas V, Cohen AA, Fulop T, Riesco E, Legault V, Li Q, et al. Inflammaging does not simply reflect increases in pro-inflammatory markers. *Mech Ageing Dev*. 2014;139:49-57.
169. Livshits G, Zhai G, Hart DJ, Kato BS, Wang H, Williams FM, et al. Interleukin-6 is a significant predictor of radiographic knee osteoarthritis: The Chingford Study. *Arthritis Rheum*. 2009;60(7):2037-45.
170. Courties A, Gualillo O, Berenbaum F, Sellam J. Metabolic stress-induced joint inflammation and osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*. 2015;23(11):1955-65.
171. Kirkland JL, Tchkonja T. Cellular Senescence: A Translational Perspective. *EBioMedicine*. 2017;21:21-8.
172. Xu M, Pirtskhalava T, Farr JN, Weigand BM, Palmer AK, Weivoda MM, et al. Senolytics improve physical function and increase lifespan in old age. *Nat Med*. 2018;24(8):1246-56.
173. Wendt MD. Discovery of ABT-263, a Bcl-family protein inhibitor: observations on targeting a large protein-protein interaction. *Expert Opin Drug Discov*. 2008;3(9):1123-43.
174. Vogler M. Targeting BCL2-Proteins for the Treatment of Solid Tumours. *Adv Med*. 2014;2014:943648.

175. Chang J, Wang Y, Shao L, Laberge RM, Demaria M, Campisi J, et al. Clearance of senescent cells by ABT263 rejuvenates aged hematopoietic stem cells in mice. *Nat Med.* 2016;22(1):78-83.
176. Zhu Y, Tchkonina T, Fuhrmann-Stroissnigg H, Dai HM, Ling YY, Stout MB, et al. Identification of a novel senolytic agent, navitoclax, targeting the Bcl-2 family of anti-apoptotic factors. *Aging Cell.* 2016;15(3):428-35.
177. Zhu Y, Doornebal EJ, Pirtskhalava T, Giorgadze N, Wentworth M, Fuhrmann-Stroissnigg H, et al. New agents that target senescent cells: the flavone, fisetin, and the BCL-XL inhibitors, A1331852 and A1155463. *Aging (Albany NY).* 2017;9(3):955-63.
178. Wang Y, Chang J, Liu X, Zhang X, Zhang S, Zhou D, et al. Discovery of piperlongumine as a potential novel lead for the development of senolytic agents. *Aging (Albany NY).* 2016;8(11):2915-26.
179. Taipale M, Jarosz DF, Lindquist S. HSP90 at the hub of protein homeostasis: emerging mechanistic insights. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2010;11(7):515-28.
180. Fuhrmann-Stroissnigg H, Ling YY, Zhao J, McGowan SJ, Zhu Y, Brooks RW, et al. Identification of HSP90 inhibitors as a novel class of senolytics. *Nat Commun.* 2017;8(1):422.
181. Rubinsztein DC, Marino G, Kroemer G. Autophagy and aging. *Cell.* 2011;146(5):682-95.
182. Madeo F, Tavernarakis N, Kroemer G. Can autophagy promote longevity? *Nat Cell Biol.* 2010;12(9):842-6.
183. Madeo F, Zimmermann A, Maiuri MC, Kroemer G. Essential role for autophagy in life span extension. *J Clin Invest.* 2015;125(1):85-93.
184. Carames B, Taniguchi N, Otsuki S, Blanco FJ, Lotz M. Autophagy is a protective mechanism in normal cartilage, and its aging-related loss is linked with cell death and osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 2010;62(3):791-801.
185. Sasaki H, Takayama K, Matsushita T, Ishida K, Kubo S, Matsumoto T, et al. Autophagy modulates osteoarthritis-related gene expression in human chondrocytes. *Arthritis Rheum.* 2012;64(6):1920-8.
186. Carames B, Olmer M, Kiosses WB, Lotz MK. The relationship of autophagy defects to cartilage damage during joint aging in a mouse model. *Arthritis Rheumatol.* 2015;67(6):1568-76.
187. Hui W, Young DA, Rowan AD, Xu X, Cawston TE, Proctor CJ. Oxidative changes and signalling pathways are pivotal in initiating age-related changes in articular cartilage. *Ann Rheum Dis.* 2016;75(2):449-58.
188. Chen J, Crawford R, Xiao Y. Vertical inhibition of the PI3K/Akt/mTOR pathway for the treatment of osteoarthritis. *J Cell Biochem.* 2013;114(2):245-9.
189. Zhang Y, Vasheghani F, Li YH, Blati M, Simeone K, Fahmi H, et al. Cartilage-specific deletion of mTOR upregulates autophagy and protects mice from osteoarthritis. *Ann Rheum Dis.* 2015;74(7):1432-40.



190. Webb AE, Brunet A. FOXO transcription factors: key regulators of cellular quality control. *Trends Biochem Sci.* 2014;39(4):159-69.
191. Matsuzaki T, Alvarez-Garcia O, Mokuda S, Nagira K, Olmer M, Gamini R, et al. FoxO transcription factors modulate autophagy and proteoglycan 4 in cartilage homeostasis and osteoarthritis. *Sci Transl Med.* 2018;10(428).
192. Vinatier C, Dominguez E, Guicheux J, Carames B. Role of the Inflammation-Autophagy-Senescence Integrative Network in Osteoarthritis. *Front Physiol.* 2018;9:706.
193. Benjamin D, Colombi M, Moroni C, Hall MN. Rapamycin passes the torch: a new generation of mTOR inhibitors. *Nat Rev Drug Discov.* 2011;10(11):868-80.
194. Vakifahmetoglu-Norberg H, Xia HG, Yuan J. Pharmacologic agents targeting autophagy. *J Clin Invest.* 2015;125(1):5-13.
195. Zhou G, Myers R, Li Y, Chen Y, Shen X, Fenyk-Melody J, et al. Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *J Clin Invest.* 2001;108(8):1167-74.
196. Egan DF, Shackelford DB, Mihaylova MM, Gelino S, Kohnz RA, Mair W, et al. Phosphorylation of ULK1 (hATG1) by AMP-activated protein kinase connects energy sensing to mitophagy. *Science.* 2011;331(6016):456-61.
197. Alers S, Löffler AS, Wesselborg S, Stork B. Role of AMPK-mTOR-Ulk1/2 in the regulation of autophagy: cross talk, shortcuts, and feedbacks. *Mol Cell Biol.* 2012;32(1):2-11.
198. Hyun B, Shin S, Lee A, Lee S, Song Y, Ha NJ, et al. Metformin Down-regulates TNF- $\alpha$  Secretion via Suppression of Scavenger Receptors in Macrophages. *Immune Netw.* 2013;13(4):123-32.
199. Yan H, Zhou HF, Hu Y, Pham CT. Suppression of experimental arthritis through AMP-activated protein kinase activation and autophagy modulation. *J Rheum Dis Treat.* 2015;1(1):5.
200. Qin N, Wei L, Li W, Yang W, Cai L, Qian Z, et al. Local intra-articular injection of resveratrol delays cartilage degeneration in C57BL/6 mice by inducing autophagy via AMPK/mTOR pathway. *J Pharmacol Sci.* 2017;134(3):166-74.
201. Schneider P, Korolenko TA, Busch U. A review of drug-induced lysosomal disorders of the liver in man and laboratory animals. *Microsc Res Tech.* 1997;36(4):253-75.
202. Gunja N, Roberts D, McCoubrie D, Lamberth P, Jan A, Simes DC, et al. Survival after massive hydroxychloroquine overdose. *Anaesth Intensive Care.* 2009;37(1):130-3.
203. Zhuo Q, Yang W, Chen J, Wang Y. Metabolic syndrome meets osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol.* 2012;8(12):729-37.
204. Conde J, Scotecce M, Lopez V, Gomez R, Lago F, Pino J, et al. Adipokines: novel players in rheumatic diseases. *Discov Med.* 2013;15(81):73-83.
205. Lago F, Dieguez C, Gomez-Reino J, Gualillo O. The emerging role of adipokines as mediators of inflammation and immune responses. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2007;18(3-4):313-25.
206. Dumond H, Presle N, Terlain B, Mainard D, Loeuille D, Netter P, et al. Evidence for a key role of leptin in osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 2003;48(11):3118-29.

207. Rosa SC, Rufino AT, Judas FM, Tenreiro CM, Lopes MC, Mendes AF. Role of glucose as a modulator of anabolic and catabolic gene expression in normal and osteoarthritic human chondrocytes. *J Cell Biochem.* 2011;112(10):2813-24.
208. Hiraiwa H, Sakai T, Mitsuyama H, Hamada T, Yamamoto R, Omachi T, et al. Inflammatory effect of advanced glycation end products on human meniscal cells from osteoarthritic knees. *Inflamm Res.* 2011;60(11):1039-48.
209. Nah SS, Choi IY, Yoo B, Kim YG, Moon HB, Lee CK. Advanced glycation end products increases matrix metalloproteinase-1, -3, and -13, and TNF-alpha in human osteoarthritic chondrocytes. *FEBS Lett.* 2007;581(9):1928-32.
210. Lippiello L, Walsh T, Fienhold M. The association of lipid abnormalities with tissue pathology in human osteoarthritic articular cartilage. *Metabolism.* 1991;40(6):571-6.
211. Tsezou A, Iliopoulos D, Malizos KN, Simopoulou T. Impaired expression of genes regulating cholesterol efflux in human osteoarthritic chondrocytes. *J Orthop Res.* 2010;28(8):1033-9.
212. Akagi M, Kanata S, Mori S, Itabe H, Sawamura T, Hamanishi C. Possible involvement of the oxidized low-density lipoprotein/lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 system in pathogenesis and progression of human osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage.* 2007;15(3):281-90.
213. Gierman LM, van der Ham F, Koudijs A, Wielinga PY, Kleemann R, Kooistra T, et al. Metabolic stress-induced inflammation plays a major role in the development of osteoarthritis in mice. *Arthritis Rheum.* 2012;64(4):1172-81.
214. Vasheghani F, Monemdjou R, Fahmi H, Zhang Y, Perez G, Blati M, et al. Adult cartilage-specific peroxisome proliferator-activated receptor gamma knockout mice exhibit the spontaneous osteoarthritis phenotype. *Am J Pathol.* 2013;182(4):1099-106.
215. Vasheghani F, Zhang Y, Li YH, Blati M, Fahmi H, Lussier B, et al. PPARgamma deficiency results in severe, accelerated osteoarthritis associated with aberrant mTOR signalling in the articular cartilage. *Ann Rheum Dis.* 2015;74(3):569-78.
216. Clockaerts S, Bastiaansen-Jenniskens YM, Feijt C, Verhaar JA, Somville J, De Clerck LS, et al. Peroxisome proliferator activated receptor alpha activation decreases inflammatory and destructive responses in osteoarthritic cartilage. *Osteoarthritis Cartilage.* 2011;19(7):895-902.
217. van Eekeren IC, Clockaerts S, Bastiaansen-Jenniskens YM, Lubberts E, Verhaar JA, van Osch GJ, et al. Fibrates as therapy for osteoarthritis and rheumatoid arthritis? A systematic review. *Ther Adv Musculoskelet Dis.* 2013;5(1):33-44.
218. Clockaerts S, Bastiaansen-Jenniskens YM, Feijt C, De Clerck L, Verhaar JA, Zuurmond AM, et al. Cytokine production by infrapatellar fat pad can be stimulated by interleukin 1beta and inhibited by peroxisome proliferator activated receptor alpha agonist. *Ann Rheum Dis.* 2012;71(6):1012-8.

219. Luo R, Su LY, Li G, Yang J, Liu Q, Yang LX, et al. Activation of PPARA-mediated autophagy reduces Alzheimer disease-like pathology and cognitive decline in a murine model. *Autophagy*. 2019;1-18.
220. Poynter ME, Daynes RA. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha activation modulates cellular redox status, represses nuclear factor-kappaB signaling, and reduces inflammatory cytokine production in aging. *J Biol Chem*. 1998;273(49):32833-41.
221. Chung KW, Lee EK, Kim DH, An HJ, Kim ND, Im DS, et al. Age-related sensitivity to endotoxin-induced liver inflammation: Implication of inflammasome/IL-1beta for steatohepatitis. *Aging Cell*. 2015;14(4):524-33.
222. Roy A. Early Probe and Drug Discovery in Academia: A Minireview. *High Throughput*. 2018;7(1).
223. Carnero A. High throughput screening in drug discovery. *Clin Transl Oncol*. 2006;8(7):482-90.
224. Ashburn TT, Thor KB. Drug repositioning: identifying and developing new uses for existing drugs. *Nat Rev Drug Discov*. 2004;3(8):673-83.
225. Kraus VB. Biomarkers as drug development tools: discovery, validation, qualification and use. *Nat Rev Rheumatol*. 2018;14(6):354-62.
226. Macarron R, Hertzberg RP. Design and implementation of high-throughput screening assays. *Methods Mol Biol*. 2009;565:1-32.
227. Zhang JH, Chung TD, Oldenburg KR. A Simple Statistical Parameter for Use in Evaluation and Validation of High Throughput Screening Assays. *J Biomol Screen*. 1999;4(2):67-73.
228. Jin G, Wong ST. Toward better drug repositioning: prioritizing and integrating existing methods into efficient pipelines. *Drug Discov Today*. 2014;19(5):637-44.
229. Chong CR, Sullivan DJ, Jr. New uses for old drugs. *Nature*. 2007;448(7154):645-6.
230. Kojima H, Inoue T, Kunimoto H, Nakajima K. IL-6-STAT3 signaling and premature senescence. *Jakstat*. 2013;2(4):e25763.
231. Alwin Prem Anand A, Gowri Sankar S, Kokila Vani V. Immortalization of neuronal progenitors using SV40 large T antigen and differentiation towards dopaminergic neurons. *J Cell Mol Med*. 2012;16(11):2592-610.
232. Finger F, Schorle C, Zien A, Gebhard P, Goldring MB, Aigner T. Molecular phenotyping of human chondrocyte cell lines T/C-28a2, T/C-28a4, and C-28/I2. *Arthritis Rheum*. 2003;48(12):3395-403.
233. Goldring MB, Birkhead JR, Suen LF, Yamin R, Mizuno S, Glowacki J, et al. Interleukin-1 beta-modulated gene expression in immortalized human chondrocytes. *J Clin Invest*. 1994;94(6):2307-16.
234. Kanigowska P, Shen Y, Zheng Y, Rosser S, Cai Y. Smart DNA Fabrication Using Sound Waves: Applying Acoustic Dispensing Technologies to Synthetic Biology. *J Lab Autom*. 2016;21(1):49-56.

235. Nagano T, Nakano M, Nakashima A, Onishi K, Yamao S, Enari M, et al. Identification of cellular senescence-specific genes by comparative transcriptomics. *Sci Rep.* 2016;6:31758.
236. Niedernhofer LJ, Garinis GA, Raams A, Lalai AS, Robinson AR, Appeldoorn E, et al. A new progeroid syndrome reveals that genotoxic stress suppresses the somatotroph axis. *Nature.* 2006;444(7122):1038-43.
237. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C(T)}$  Method. *Methods.* 2001;25(4):402-8.
238. Blasioli DJ, Kaplan DL. The roles of catabolic factors in the development of osteoarthritis. *Tissue Eng Part B Rev.* 2014;20(4):355-63.
239. Glasson SS, Chambers MG, Van Den Berg WB, Little CB. The OARSI histopathology initiative - recommendations for histological assessments of osteoarthritis in the mouse. *Osteoarthritis Cartilage.* 2010;18 Suppl 3:S17-23.
240. Taniguchi N, Carames B, Ronfani L, Ulmer U, Komiya S, Bianchi ME, et al. Aging-related loss of the chromatin protein HMGB2 in articular cartilage is linked to reduced cellularity and osteoarthritis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106(4):1181-6.
241. Fernandez-Moreno M, Soto-Hermida A, Vazquez-Mosquera ME, Cortes-Pereira E, Pertega S, Relano S, et al. A replication study and meta-analysis of mitochondrial DNA variants in the radiographic progression of knee osteoarthritis. *Rheumatology (Oxford).* 2017;56(2):263-70.
242. Washburn RA, Smith KW, Jette AM, Janney CA. The Physical Activity Scale for the Elderly (PASE): development and evaluation. *J Clin Epidemiol.* 1993;46(2):153-62.
243. Bellamy N, Buchanan WW, Goldsmith CH, Campbell J, Stitt LW. Validation study of WOMAC: a health status instrument for measuring clinically important patient relevant outcomes to antirheumatic drug therapy in patients with osteoarthritis of the hip or knee. *J Rheumatol.* 1988;15(12):1833-40.
244. Stuart EA. Matching methods for causal inference: A review and a look forward. *Stat Sci.* 2010;25(1):1-21.
245. Austin PC. Balance diagnostics for comparing the distribution of baseline covariates between treatment groups in propensity-score matched samples. *Stat Med.* 2009;28(25):3083-107.
246. Hulsmans M, Geeraert B, Arnould T, Tsatsanis C, Holvoet P. PPAR agonist-induced reduction of M<sub>cp1</sub> in atherosclerotic plaques of obese, insulin-resistant mice depends on adiponectin-induced Irak3 expression. *PLoS One.* 2013;8(4):e62253.
247. Jeon OH, David N, Campisi J, Elisseeff JH. Senescent cells and osteoarthritis: a painful connection. *J Clin Invest.* 2018;128(4):1229-37.
248. Campisi J. Aging, cellular senescence, and cancer. *Annu Rev Physiol.* 2013;75:685-705.
249. Coppe JP, Patil CK, Rodier F, Sun Y, Munoz DP, Goldstein J, et al. Senescence-associated secretory phenotypes reveal cell-nonautonomous functions of oncogenic RAS and the p53 tumor suppressor. *PLoS Biol.* 2008;6(12):2853-68.

250. Jeon OH, Kim C, Laberge RM, Demaria M, Rathod S, Vasserot AP, et al. Local clearance of senescent cells attenuates the development of post-traumatic osteoarthritis and creates a pro-regenerative environment. *Nat Med.* 2017;23(6):775-81.
251. Herranz N, Gallage S, Mellone M, Wuestefeld T, Klotz S, Hanley CJ, et al. mTOR regulates MAPKAPK2 translation to control the senescence-associated secretory phenotype. *Nat Cell Biol.* 2015;17(9):1205-17.
252. Laberge RM, Sun Y, Orjalo AV, Patil CK, Freund A, Zhou L, et al. mTOR regulates the pro-tumorigenic senescence-associated secretory phenotype by promoting IL1A translation. *Nat Cell Biol.* 2015;17(8):1049-61.
253. Lewis R, Barrett-Jolley R. Changes in Membrane Receptors and Ion Channels as Potential Biomarkers for Osteoarthritis. *Front Physiol.* 2015;6:357.
254. Emery EC, Luiz AP, Wood JN. Nav1.7 and other voltage-gated sodium channels as drug targets for pain relief. *Expert Opin Ther Targets.* 2016;20(8):975-83.
255. Flower RJ. The development of COX2 inhibitors. *Nat Rev Drug Discov.* 2003;2(3):179-91.
256. Brown JD, Plutzky J. Peroxisome proliferator-activated receptors as transcriptional nodal points and therapeutic targets. *Circulation.* 2007;115(4):518-33.
257. Zandbergen F, Plutzky J. PPARalpha in atherosclerosis and inflammation. *Biochim Biophys Acta.* 2007;1771(8):972-82.
258. Sherwood JC, Bertrand J, Eldridge SE, Dell'Accio F. Cellular and molecular mechanisms of cartilage damage and repair. *Drug Discov Today.* 2014;19(8):1172-7.
259. Ioan-Facsinay A, Kloppenburg M. Bioactive lipids in osteoarthritis: risk or benefit? *Curr Opin Rheumatol.* 2018;30(1):108-13.
260. Akasaki Y, Hasegawa A, Saito M, Asahara H, Iwamoto Y, Lotz MK. Dysregulated FOXO transcription factors in articular cartilage in aging and osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage.* 2014;22(1):162-70.
261. Triantaphyllidou IE, Kalyvoti E, Karavia E, Lilis I, Kypreos KE, Papachristou DJ. Perturbations in the HDL metabolic pathway predispose to the development of osteoarthritis in mice following long-term exposure to western-type diet. *Osteoarthritis Cartilage.* 2013;21(2):322-30.
262. Siong Tan HW, Anjum B, Shen HM, Ghosh S, Yen PM, Sinha RA. Lysosomal inhibition attenuates peroxisomal gene transcription via suppression of PPARA and PPARGC1A levels. *Autophagy.* 2019:1-5.
263. Shirinsky IV, Shirinsky VS. Treatment of erosive osteoarthritis with peroxisome proliferator-activated receptor alpha agonist fenofibrate: a pilot study. *Rheumatol Int.* 2014;34(5):613-6.
264. Driban JB, Lo GH, Eaton CB, Lapane KL, Nevitt M, Harvey WF, et al. Exploratory analysis of osteoarthritis progression among medication users: data from the Osteoarthritis Initiative. *Ther Adv Musculoskelet Dis.* 2016;8(6):207-19.

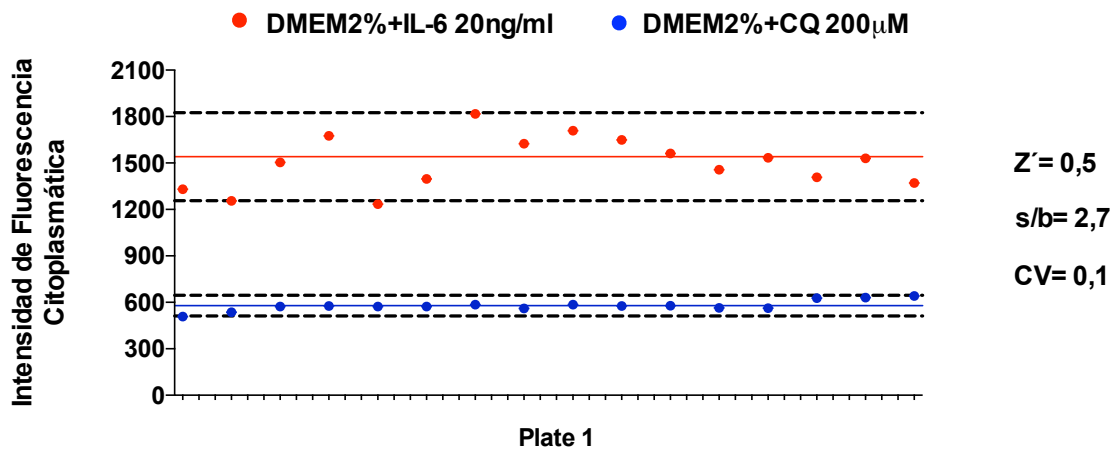
## **INFORMACIÓN SUPLEMENTARIA**

## RESULTADOS SUPLEMENTARIOS

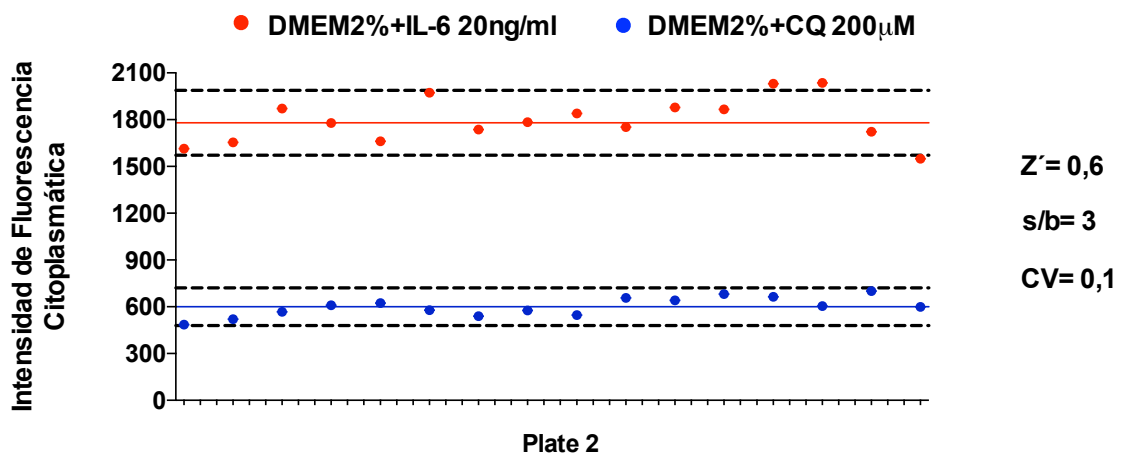
### 1. Parámetros estadísticos del *screening* primario

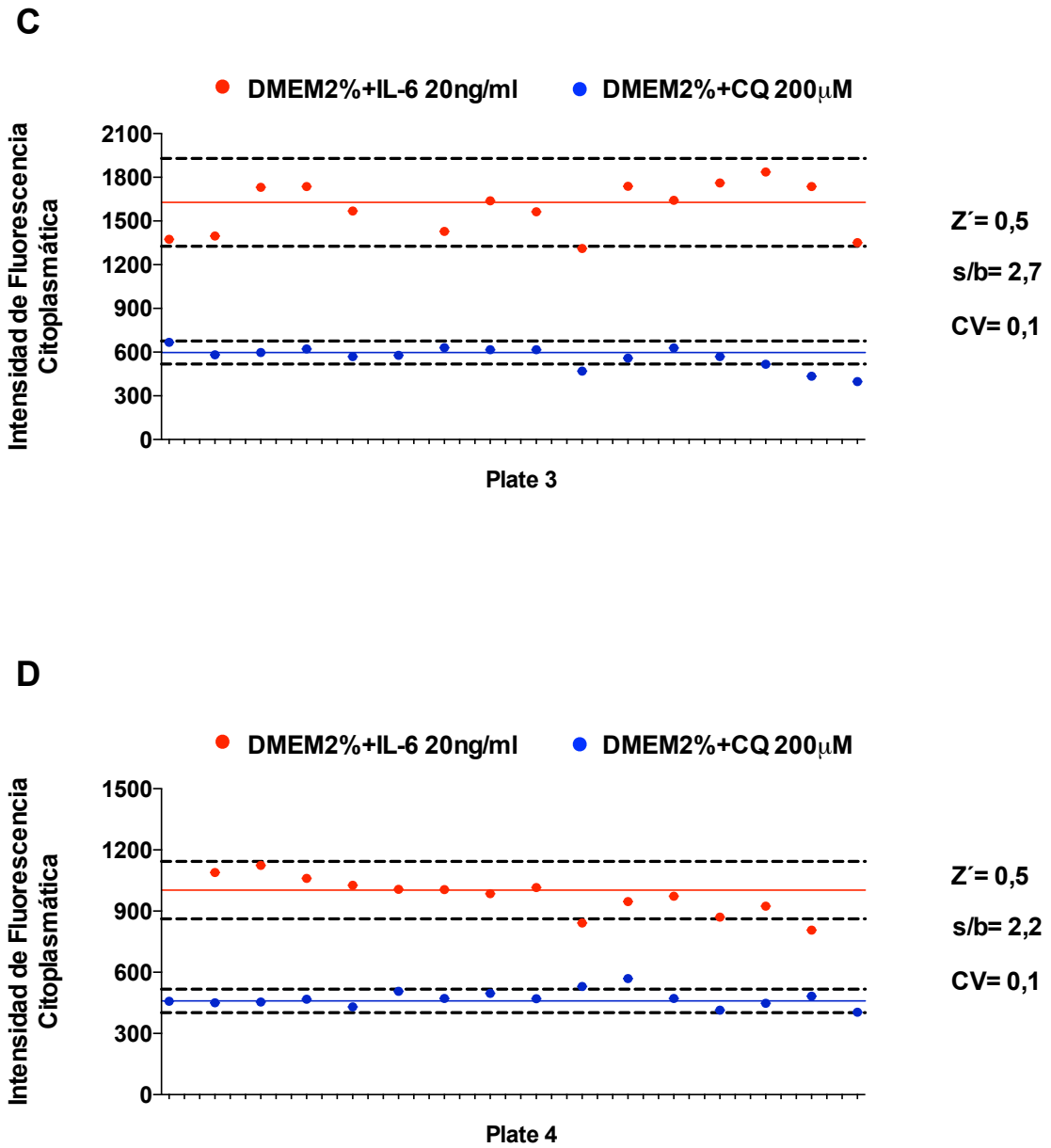
El cálculo del factor  $Z'$  se hizo teniendo en cuenta la media del control positivo y negativo y sus correspondientes desviaciones estándar. La representación gráfica del factor  $Z'$  de cada placa de células empleadas en el *screening* primario se muestran en la **Figura 49**.

**A**



**B**



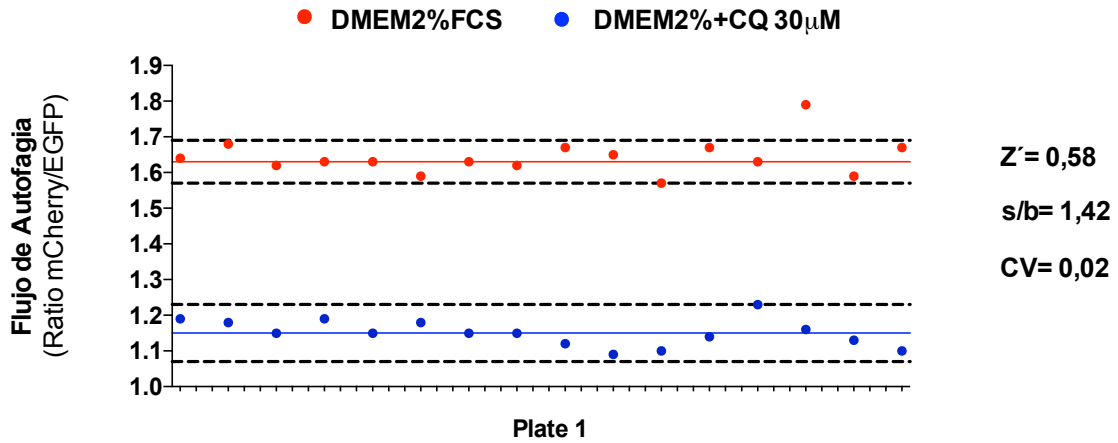


**Figura 49. Representación gráfica del factor  $Z'$  obtenido en el *screening* primario.** El cálculo del factor  $Z'$  se hizo teniendo en cuenta la media del control positivo y tres veces su desviación estándar y la media del control negativo y tres veces su desviación estándar. Como control positivo de senescencia se usó IL-6 (20 ng/ml) y como control negativo CQ (200 µM). **A, B, C, D,** Representación gráfica del factor  $Z'$  de las placas 1, 2, 3 y 4, respectivamente.



## 2. Parámetros estadísticos del *screening* secundario

El cálculo del factor  $Z'$  se hizo teniendo en cuenta la media del control positivo y negativo y sus correspondientes desviaciones estándar. La representación gráfica del factor  $Z'$  de la placa de células empleadas en el *screening* secundario se muestra en la **Figura 50**.



**Figura 50. Representación gráfica del factor  $Z'$  obtenido en el *screening* secundario.** El cálculo del factor  $Z'$  se hizo teniendo en cuenta la media del control positivo y tres veces su desviación estándar y la media del control negativo y tres veces su desviación estándar. Como control positivo del flujo de autofagia se usó DMEM suplementado con un 2% de FCS y como control negativo CQ (30 µM).

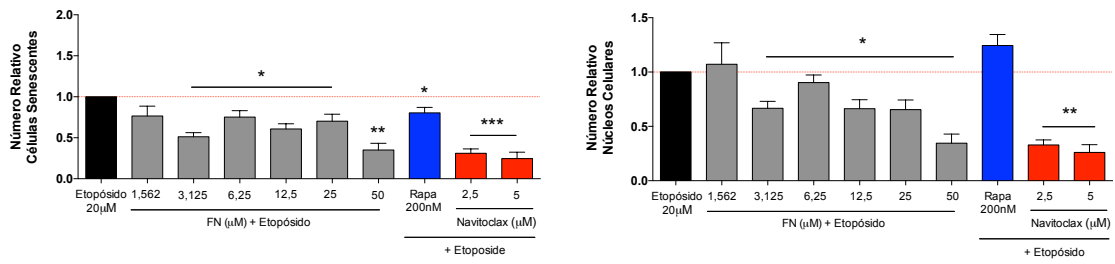
### 3. Los agonistas del receptor nuclear PPAR $\alpha$ presentan un efecto senolítico en las células humanas de pulmón IMR90

Para validar la estrategia elegida en la caracterización del efecto senoterapéutico que presentaron los agonistas en condrocitos, se realizó el mismo ensayo de senescencia en las células humanas de pulmón IMR90.

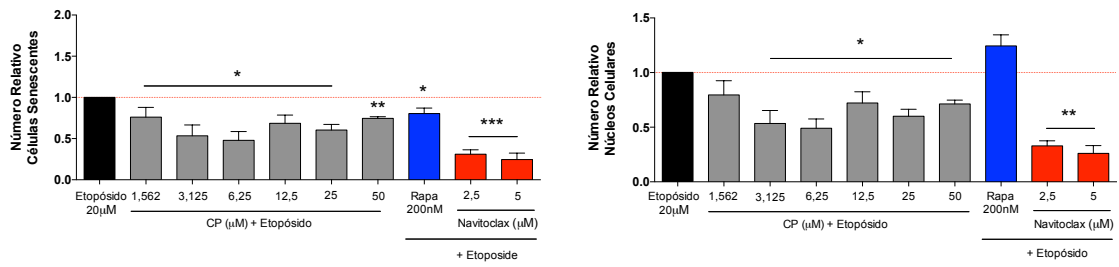
El método usado para inducir senescencia consistió en añadir Etopósido durante cinco días. Después las células fueron tratadas con los agonistas PPAR $\alpha$  (1,56  $\mu$ M – 50  $\mu$ M) y con los compuestos referentes por su actividad senolítica y senomórfica, Navitoclax y Rapamicina durante 48 horas. Antes de detectar la actividad SA- $\beta$ -Gal con el sustrato fluorescente C<sub>12</sub>FDG y cuantificar los núcleos celulares con Hoechst 33342, se añadió Bafilomicina para incrementar el acúmulo de gránulos en los lisosomas de la enzima  $\beta$ -Galactosidasa.

La lectura, análisis y cuantificación del número de células senescentes y del número total de núcleos celulares se hizo utilizando el sistema de HTS IN Cell Analyzer 6000 y el *software* IN Cell Developer Toolbox. Los tres compuestos, FN, CP y GW mostraron un perfil senolítico al provocar la disminución tanto de las células positivas en C<sub>12</sub>FDG como de los núcleos celulares. El Navitoclax a las dos concentraciones presentó el mismo comportamiento y la Rapamicina actuó como senomórfico por aumentar el número de células finales y disminuir las senescentes (**Figuras 51 A, B, C y D**).

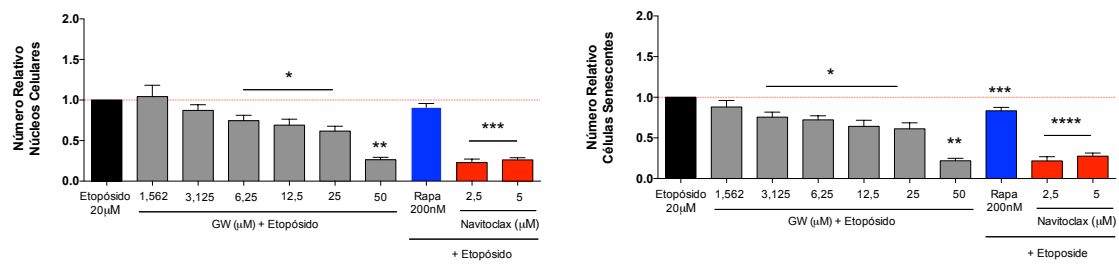
**A**



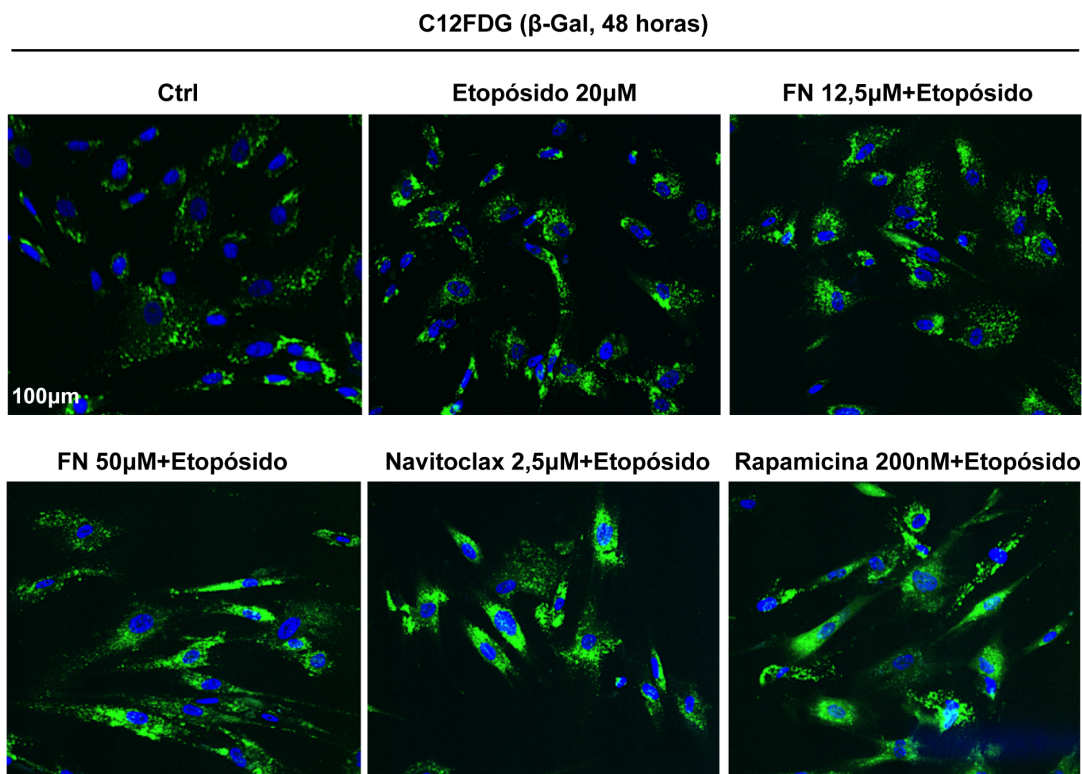
**B**



**C**



D



**Figura 51. Los agonistas PPAR $\alpha$  son senolíticos en las células de pulmón IMR90. A.** Cuantificación del número de células senescentes y del número de núcleos celulares después de tratar las células IMR90 durante 48 h con Etopósido (20  $\mu$ M), FN (1,56  $\mu$ M – 50 $\mu$ M), Rapamicina (Rapa, 200 nM) y Navitoclax (2,5  $\mu$ M) en placas de 96 pocillos. Los valores del número de células senescentes se corresponden con la media  $\pm$  SEM de cuatro réplicas/condición, \* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.001, \*\*\* $p$ <0.0001 vs. Etopósido. Los valores del número de núcleos se corresponden con la media  $\pm$  SEM de cuatro réplicas/condición, \* $p$ <0.01, \*\* $p$ <0.0001 vs. Etopósido, se aplicó un test *t-Student* no pareado y paramétrico. **B.** Cuantificación del número de células senescentes y del número de núcleos celulares después de tratar las células IMR90 durante 48 h con Etopósido (20  $\mu$ M), CP (1,56  $\mu$ M – 50  $\mu$ M), Rapa (200 nM) y Navitoclax (2,5  $\mu$ M) en placas de 96 pocillos. Los valores del número de células senescentes se corresponden con la media  $\pm$  SEM de cuatro réplicas/condición, \* $p$ <0.01, \*\* $p$ <0.001, \*\*\* $p$ <0.0001 vs. Etopósido. Los valores del número de núcleos se corresponden con la media  $\pm$  SEM de cuatro réplicas/condición, \* $p$ <0.01, \*\* $p$ <0.0001 vs. Etopósido, se aplicó un test *t-Student* no pareado y paramétrico. **C.** Cuantificación del número de células senescentes y del número de núcleos celulares después de tratar las células IMR90 durante 48 h con Etopósido (20  $\mu$ M), GW (1,56  $\mu$ M – 50  $\mu$ M), Rapa (200 nM) y Navitoclax (2,5  $\mu$ M) en placas de 96 pocillos. Los valores del número de células senescentes se corresponden con la media  $\pm$  SEM de cuatro réplicas/condición, \* $p$ <0.01, \*\* $p$ <0.0001, \*\*\* $p$ <0.05, \*\*\*\* $p$ <0.0001 vs. Etopósido. Los valores del número de núcleos se corresponden con la media  $\pm$  SEM de cuatro réplicas/condición, \* $p$ <0.01, \*\* $p$ <0.001, \*\*\* $p$ <0.0001 vs. Etopósido, se aplicó un test *t-Student* no pareado y paramétrico. **D.** Imágenes representativas de la actividad SA- $\beta$ -Gal en IMR90 en respuesta al tratamiento con Etopósido y con tres agonistas PPAR $\alpha$ . Se utilizó un doble marcaje para identificar la enzima  $\beta$ -galactosidasa con C12FDG y los núcleos celulares con Hoechst 33342. Aumento 10X.

#### 4. Los agonistas del receptor nuclear PPAR $\alpha$ presentan un efecto senolítico en los fibroblastos embrionarios de ratón MEFs Ercc1<sup>-/-</sup>

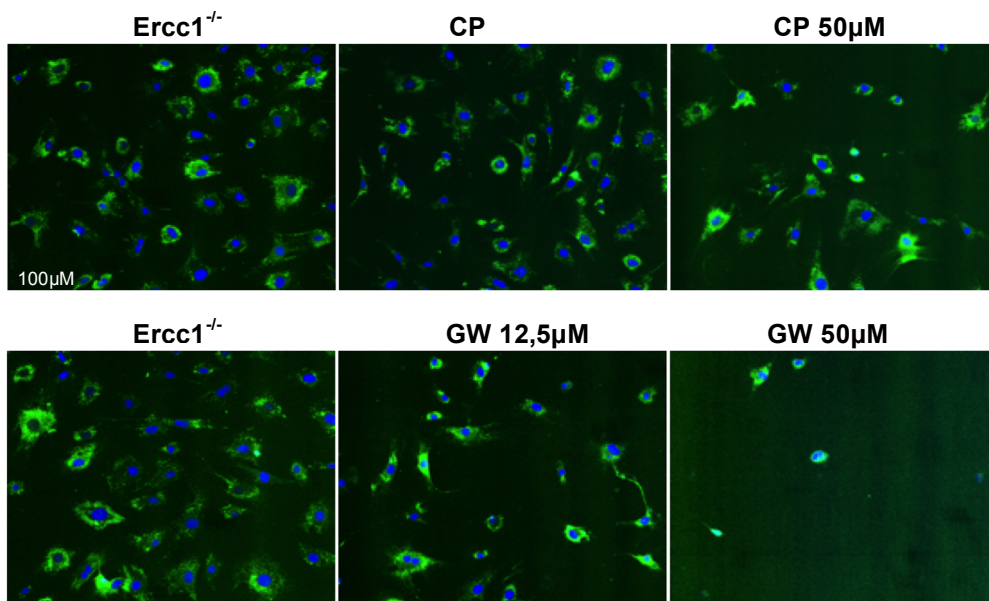
Los fibroblastos embrionarios de ratón MEFs Ercc1<sup>-/-</sup> caracterizados por carecer de la endonucleasa de reparación del ADN Ercc1-XPF se utilizaron como modelo de envejecimiento prematuro para confirmar el efecto senolítico de los agonistas PPAR $\alpha$ .

Para inducir senescencia fueron simultáneamente sometidas a estrés oxidativo y a replicación celular. Después las células fueron tratadas con los agonistas PPAR $\alpha$  (1,56  $\mu$ M – 50  $\mu$ M) y con los compuestos referentes por su actividad senolítica y senomórfica, Navitoclax y Rapamicina durante 48 horas. Antes de detectar la actividad SA- $\beta$ -Gal con el sustrato fluorescente C12FDG y cuantificar los núcleos celulares con Hoechst 33342, se añadió Bafilomicina para incrementar el acúmulo de gránulos en los lisosomas de la enzima  $\beta$ -Galactosidasa.

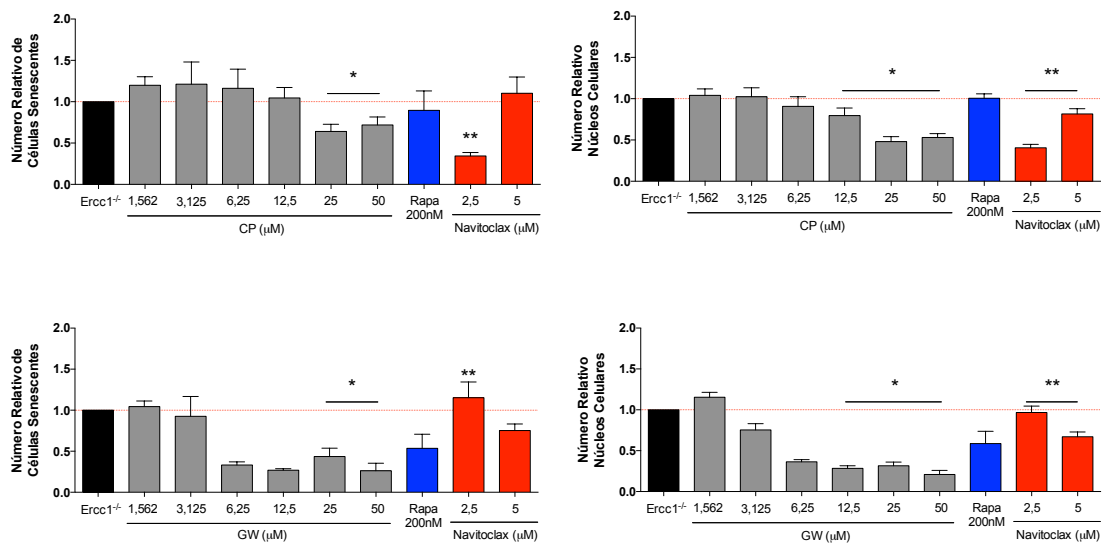
La lectura, análisis y cuantificación del número de células senescentes y del número total de núcleos celulares se hizo utilizando el sistema de HTS IN Cell Analyzer 6000 y el *software* IN Cell Developer Toolbox. Los compuestos CP y GW mostraron un perfil senolítico al provocar la disminución tanto de las células positivas en C12FDG como de los núcleos celulares. El Navitoclax a la concentración de 2,5  $\mu$ M presentó un mayor comportamiento senolítico y la Rapamicina actuó como senomórfico por aumentar el número de células finales y disminuir las senescentes (**Figura 52 A y B**).

**A**

C12FDG (β-Gal, 48 horas)

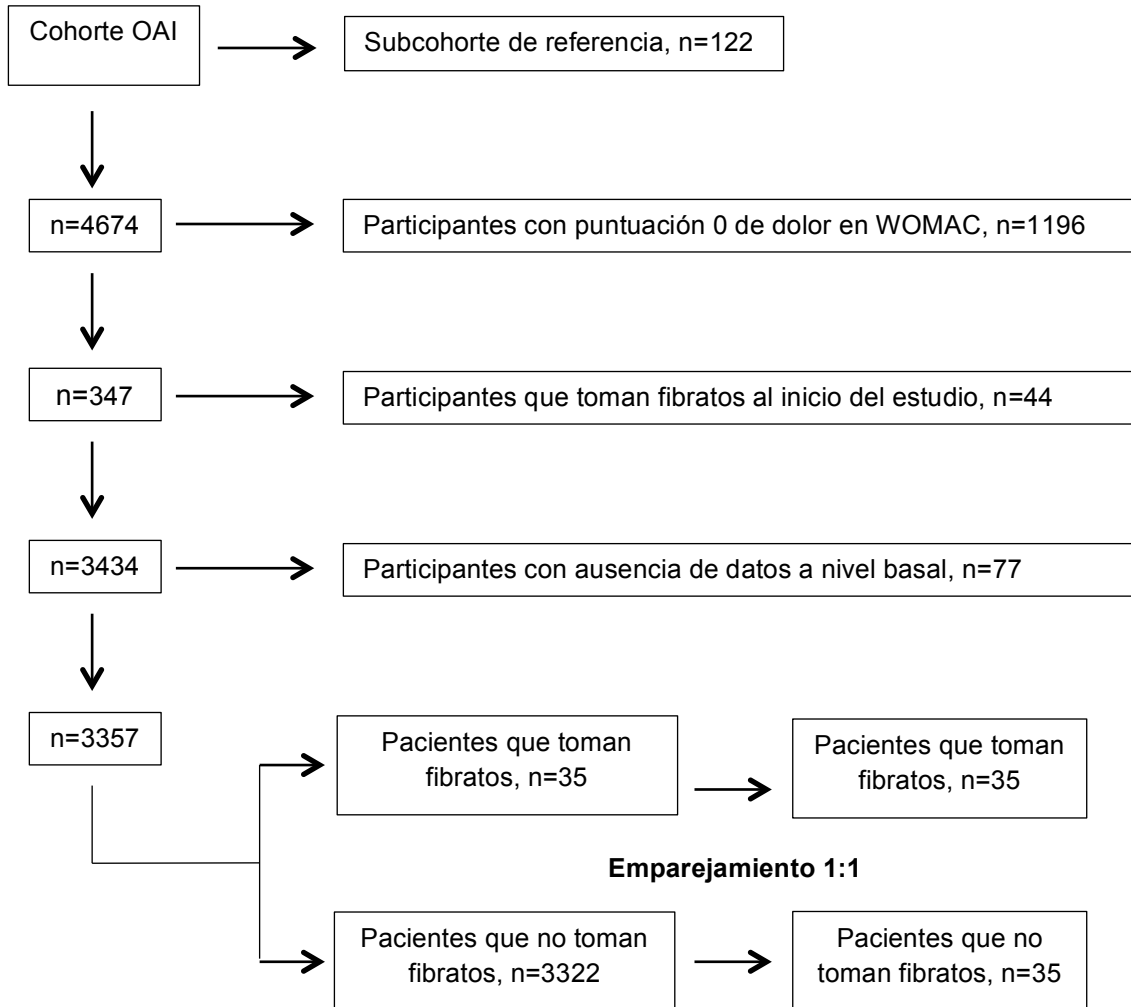


**B**



**Figura 52. Los agonistas PPAR $\alpha$  son senolíticos en las células MEFs Ercc1<sup>-/-</sup>.** **A**, Imágenes representativas de la actividad SA- $\beta$ -Gal en Ercc1<sup>-/-</sup> en respuesta al tratamiento de los agonistas PPAR $\alpha$ . Se utilizó un doble marcaje para identificar SA- $\beta$ -Gal con C<sub>12</sub>FDG y los núcleos celulares con Hoechst 33342. Aumento 10X. **B**, Cuantificación del número de células senescentes y del número de núcleos celulares después de tratar los fibroblastos de ratón MEFs Ercc1<sup>-/-</sup> durante 48 h con CP y GW (1,56  $\mu$ M – 50  $\mu$ M), Rapamicina (200 nM) y Navitoclax (2,5 y 5  $\mu$ M) en placas de 96 pocillos. Los valores del número de células senescentes se corresponden con la media  $\pm$  SEM de cuatro réplicas/condición. \*p<0.01, \*\*p<0.0001 vs. Ercc1<sup>-/-</sup>. Los valores del número de núcleos se corresponden con la media  $\pm$  SEM de cuatro réplicas/condición. \*p<0.001, \*\*p<0.05 vs. Ercc1<sup>-/-</sup>. Se aplicó un test *t-Student* no pareado y paramétrico.

**5. La activación farmacológica de PPAR $\alpha$  mejora las condiciones clínicas en pacientes artrósicos**



**Figura 53. Estratificación de los pacientes que toman fibratos procedentes de la cohorte OAI**

## 6. El Fenofibrato presenta efecto senolítico y pro-autofágico en condrocitos

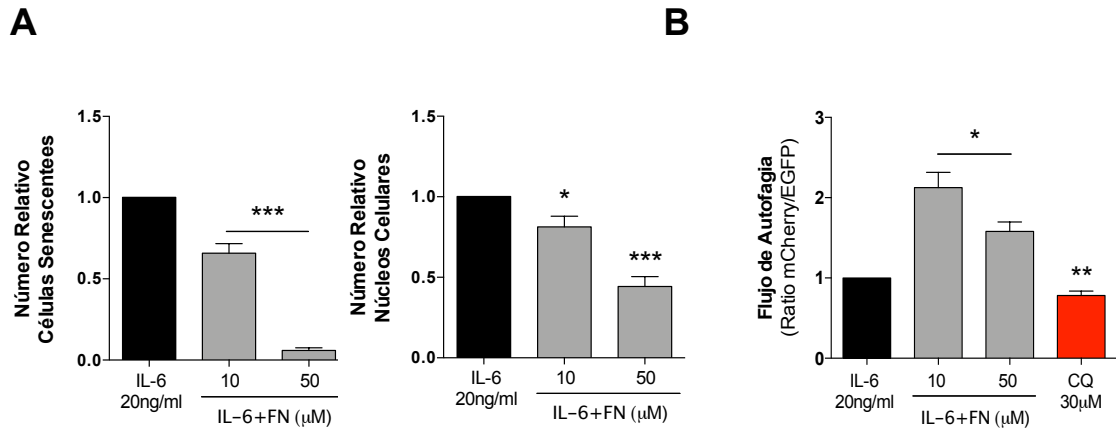
La caracterización del efecto senoterapéutico del *hit* identificado en el screening consistió en la confirmación mediante ensayos de senescencia si el Fenofibrato presentaba efecto senolítico o senomórfico. Para ello se estableció una relación entre el número total de células y el número de células senescentes presentes después del tratamiento.

Se define un agente senolítico como aquel que presenta la capacidad de eliminar selectivamente las células senescentes sin afectar a las proliferativas ni a las quiescentes. En cambio, los agentes senomórficos disminuyen el número de células senescentes sin alterar la cantidad total de células. El mecanismo por el cual ejercen esta función se desconoce con exactitud.

Se empleó la línea celular de condrocitos T/C28a2 para cuantificar el número de células senescentes y el número de núcleos celulares haciendo uso del sustrato fluorescente C<sub>12</sub>FDG. Las células fueron tratadas con IL-6 y con Fenofibrato durante 72 horas. La lectura y el análisis se hicieron con el equipo de imagen IN Cell Analyzer 6000 y el *software* IN Cell Developer Toolbox. Los resultados indicaron que el Fenofibrato disminuyó el número de células positivas en b-gal y el número total de condrocitos (**Figura 54A**).

Confirmado el efecto senolítico, el siguiente paso consistió en comprobar que el compuesto presentaba actividad pro-autofágica. Para ello se empleó la línea celular de condrocitos reportera de autofagia T/C28a2-mCherry-EGFP-pBABE la cual fue estimulada con IL-6 y con Fenofibrato durante 18 horas. Como inhibidor del proceso se usó Cloroquina. A partir del ratio mCherry/EGFP se cuantificaron los puntos fluorescentes que se formaban en los lisosomas indicando que el agonista regulaba positivamente el flujo de autofagia (**Figura 54B**). La lectura y el análisis se obtuvieron empleando el equipo Operetta y el *software* Harmony.





**Figura 54. El Fenofibrato se comporta como senolítico y pro-autofágico en condrocitos. A,** Cuantificación del número de células senescentes y del número de núcleos celulares después de tratar los condrocitos con FN (10 μM y 50 μM) y con IL-6 (20 ng/ml) durante 72 h en placas de 96 pocillos. Los valores de ambos parámetros se corresponden con la media ± SEM de 16 réplicas/condición, \*\*\* $p < 0.0001$  vs. IL-6 en número de células senescentes; \* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.0001$  vs. IL-6 en número de núcleos celulares. **B,** Cuantificación del flujo de autofagia estableciendo el ratio mCherry/EGFP procedente de la intensidad relativa de los puntos lisosomales. Los condrocitos fueron tratados con FN (10 μM y 50 μM), con IL-6 (20 ng/ml) y con CQ (30 μM) durante 18 h. Los valores se corresponden con la media ± SEM de 24 réplicas/condición, \*\*\* $p < 0.0001$  vs. IL-6, se aplicó un test *t-Student* no pareado y paramétrico.

## **PUBLICACIONES**

## **PUBLICACIONES**

### **Publicación asociada a la Tesis Doctoral**

**Nogueira-Recalde U**, Lorenzo-Gómez I, Blanco FJ, Loza MI, Grassi D, Shirinsky V, Shirinsky I, Lotz M, Robbins PD, Domínguez E, Caramés B. Fibrates as drugs with senolytic and autophagic activity for osteoarthritis therapy. *EBioMedicine*. 2019 Jul 5. pii: S2352-3964(19)30430-X. doi: 10.1016/j.ebiom.2019.06.049.

### **Otras publicaciones**

Ribeiro M, López de Figueroa P, **Nogueira-Recalde U**, Centeno A, Mendes AF, Blanco FJ, Caramés B. Diabetes-accelerated experimental osteoarthritis is prevented by autophagy activation. *Osteoarthritis Cartilage*. 2016;24(12):2116-2125.



Contents lists available at ScienceDirect

EBioMedicine

journal homepage: [www.ebiomedicine.com](http://www.ebiomedicine.com)
**EBioMedicine**  
 Published by THE LANCET

Research paper

## Fibrates as drugs with senolytic and autophagic activity for osteoarthritis therapy

 Uxía Nogueira-Recalde<sup>a</sup>, Irene Lorenzo-Gómez<sup>a</sup>, Francisco J. Blanco<sup>a</sup>, María I. Loza<sup>b</sup>, Diego Grassi<sup>c</sup>, Valery Shirinsky<sup>d</sup>, Ivan Shirinsky<sup>d</sup>, Martin Lotz<sup>e</sup>, Paul D. Robbins<sup>f</sup>, Eduardo Domínguez<sup>b,\*\*</sup>, Beatriz Caramés<sup>a,\*</sup>
<sup>a</sup> Uxía Nogueira-Recalde, Irene Lorenzo Gómez, Francisco J. Blanco and Beatriz Caramés, Grupo de Biología del Cartilago, Servicio de Reumatología, Instituto de Investigación Biomédica de A Coruña (INIBIC), Complejo Hospitalario Universitario de A Coruña, Sergas, A Coruña, Spain

<sup>b</sup> Eduardo Domínguez: Biofarma Research Group, Center for Research in Molecular Medicine and Chronic Diseases (CIMUS), Universidad de Santiago de Compostela, Spain

<sup>c</sup> Institute for Interdisciplinary Neuroscience (IINS), Bordeaux, Nouvelle-Aquitaine, France

<sup>d</sup> Scientific Research Institute of Clinical immunology, Novosibirsk, Russia

<sup>e</sup> Department of Molecular Medicine, Scripps Research, La Jolla, CA, USA

<sup>f</sup> Institute on the Biology of Aging and Metabolism, Department of Biochemistry, Molecular Biology and Biophysics, University of Minnesota, Minneapolis, MN, USA

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 16 May 2019

Received in revised form 21 June 2019

Accepted 25 June 2019

Available online xxx

## Keywords:

Senescence

Autophagy

Screening

Therapeutics

Ageing

Osteoarthritis

## ABSTRACT

**Background:** Ageing-related failure of homeostasis mechanisms contributes to articular cartilage degeneration and osteoarthritis (OA), for which disease-modifying treatments are not available. Our objective was to identify molecules to prevent OA by regulating chondrocyte senescence and autophagy.

**Methods:** Human chondrocytes with IL-6 induced senescence and autophagy suppression and SA- $\beta$ -gal as a reporter of senescence and LC3 as reporter of autophagic flux were used to screen the Prestwick Chemical Library of approved drugs. Preclinical cellular, tissue and blood from OA and blood from OA and ageing models were used to test the efficacy and relevance of activating PPAR $\alpha$  related to cartilage degeneration.

**Findings:** Senotherapeutic molecules with pro-autophagic activity were identified. Fenofibrate (FN), a PPAR $\alpha$  agonist used for dyslipidaemias in humans, reduced the number of senescent cells *via* apoptosis, increased autophagic flux, and protected against cartilage degradation. FN reduced both senescence and inflammation and increased autophagy in both ageing human and OA chondrocytes whereas PPAR $\alpha$  knockdown conferred the opposite effect. Moreover, PPAR $\alpha$  expression was reduced through both ageing and OA in mice and also in blood and cartilage from knees of OA patients. Remarkably, in a retrospective study, fibrate treatment improved OA clinical conditions in human patients from the Osteoarthritis Initiative (OAI) Cohort.

**Interpretation:** These results demonstrate that FDA-approved fibrate drugs targeting lipid metabolism protect against cartilage degeneration seen with ageing and OA. Thus, these drugs could have immediate clinically utility for age-related cartilage degeneration and OA treatment.

**Fund:** This study was supported by Instituto de Salud Carlos III- Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades, Spain, Plan Estatal 2013–2016 and Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER), “Una manera de hacer Europa”, P114/01324 and P117/02059, by Innopharma Pharmacogenomics platform applied to the validation of targets and discovery of drugs candidates to preclinical phases, Ministerio de Economía y Competitividad, by grants of the National Institutes of Health to PDR (P01 AG043376 and U19 AG056278). We thank FOREUM Foundation for Research in Rheumatology for their support.

© 2019 The Authors. Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

## 1. Introduction

Increasing evidence about the molecular mechanisms of ageing suggests that many chronic diseases such as osteoarthritis (OA) are associated with the hallmarks of ageing, including cellular senescence and defective autophagy [1]. OA is the most prevalent joint disease, and has a major impact on global health impact in the ageing population, but neither preventive measures nor disease-modifying treatments are yet available [2].

\* Correspondence to: B. Caramés, Grupo de Biología del Cartilago, Servicio de Reumatología, Instituto de Investigación Biomédica de A Coruña (INIBIC), Complejo Hospitalario Universitario de A Coruña, Sergas, As Xubias, 84 15006 A Coruña, Spain.

\*\* Correspondence to: E. Domínguez, Biofarma Research Group, Center for Research in Molecular Medicine and Chronic Diseases (CIMUS), Universidad de Santiago de Compostela, Avenida de Barcelona s/n 15782 Santiago de Compostela, Spain.

E-mail addresses: [eduardo.dominguez@usc.es](mailto:eduardo.dominguez@usc.es) (E. Domínguez), [beatriz.carames.perez@sergas.es](mailto:beatriz.carames.perez@sergas.es) (B. Caramés).

## Research in context

### Evidence before this study

Ageing is a major risk factor in patients with cartilage degeneration and Osteoarthritis (OA). Selective targeting of senescent chondrocytes provides beneficial effects by attenuating inflammation and enhancing structural support of articular cartilage. Small molecules capable of eliminating chondrocytes with senescence features might prevent cartilage dysfunction related to ageing.

### Added value of this study

In this study, we screened for compounds that both decrease senescence and increase autophagy by a cell-based high-throughput screening (HTS) in human chondrocytes. Importantly, we have identified Fenofibrate, a PPAR $\alpha$  agonist targeting lipid metabolism, as a potential treatment against cartilage ageing and OA. OA patients treated with fibrates have improved physical functions and therefore better mobility (human cohort study).

### Implications of all the available evidence

This study provides novel evidence that activating PPAR $\alpha$  by fibrates prevent cartilage degradation by modulating key mechanisms such as senescence and autophagy in chondrocytes and cartilage. Collectively, our data establish that fibrates could be translated into disease-modifying therapeutics for OA patients.

Accumulation of senescent cells in tissues contributes to age-related diseases [3–7]. Articular cartilage of patients with OA shows features of senescence, including increased expression of nitric oxide, pro-inflammatory cytokines, particularly IL-1 $\beta$  [8]; p16 [9]; activated DNA damage response; ROS secretion and SA- $\beta$ -Gal activity [10]. Senescence-associated secretory phenotype (SASP) factors released from chondrocytes, such as pro-inflammatory cytokines and extracellular matrix degrading enzymes, have been identified as major mediators contributing to the development and progression of OA [11,12]. Similarly, intra-articular injection of senescent cells in mice results in OA-like pathology [13]. Cartilage ageing can be modified by selective elimination of senescent chondrocytes to prevent the detrimental microenvironment changes occurring in joint dysfunction. A major step into the translation of senolytic treatments for OA was demonstrated by the beneficial effects of selective clearance of senescence chondrocytes using the Bcl-2 family inhibitor Navitoclax in animal models [14]. Physical activity intervention in rats ameliorates the deleterious effects of chondrocyte senescence and ageing [15], indicating that cartilage degeneration responds to environmental signals. The broad impact of senolytic treatment is also highlighted by the efficacy of dasatinib and quercetin combination in several models of age-related disease, which results in an extension of healthspan and lifespan in mice [6], as well as protects from idiopathic fibrosis in a first-in-human trial [16]. Comprehensive reviews have highlighted the relevance of senescence in disease and in particular for pathogenesis of OA [17–20].

There is strong evidence linking deficient autophagy, essential for cellular homeostasis, with cartilage ageing and OA [21,22]. Given its broad clinical implications and its relevance in the pathogenesis of disease, autophagy has become a major target for drug discovery and development [23,24]. Autophagy modulation by different means is a promising therapeutic approach and the discussion is currently focused on which indication will become the first clinically approved [25]. Indeed, pharmacological activation of autophagy with small molecules

has shown efficacy in preclinical models of OA [20]. Activating FoxO transcription factors protect against OA-associated cartilage damage [26]. However, targeting these homeostasis mechanisms to identify and test efficacy of potential disease-modifying treatments for cartilage ageing and OA has been proven to be challenging.

Cellular senescence and autophagy are not only essential for homeostasis but are potential therapeutic targets for age-related diseases [27]. We aim to test this therapeutic hypothesis in preclinical models of OA, where senescence and autophagy play a relevant role. A novel cell-based dual imaging screening assay was developed to identify both senotherapeutics, able to either suppress markers of senescence (senomorphics) or to induce apoptosis of senescent cells (senolytics), and autophagy modulators. Senescence was induced in the T/C28a2 human chondrocyte cell line by IL-6 treatment and the percentage of cells positive for senescence-associated  $\beta$ -galactosidase (SA- $\beta$ -Gal) activity was quantitated using the C<sub>12</sub>FDG fluorescence substrate as a reporter [28]. The Prestwick chemical library of 1120 off-patent drugs, combining high chemical and pharmacological diversity with demonstrated bioavailability and safety in humans was used to screen for senescence modulators. These were subsequently tested for autophagic flux activity in stably transfected chondrocytes using a LC3 reporter [29–31]. Among the identified compounds and mechanisms, we selected fenofibrate (FN), a peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPAR $\alpha$ ) agonist, that is in clinical use for the treatment of lipid metabolism dysfunction for further studies [32]. Our data provides compelling evidence that activating PPAR $\alpha$  initiates a transcriptional program that enhances chondrocyte homeostasis. Moreover, FN and other ligands were able to prevent cartilage degradation and to positively modulate key molecular mechanisms such as senescence and autophagy in chondrocytes and cartilage. We also demonstrate that PPAR $\alpha$  expression in mice was reduced due to ageing or OA and also in blood and cartilage from knees of OA patients. Collectively, our data establish strong preclinical evidence that could lead to the development of novel disease-modifying therapies targeting lipid metabolism to prevent and treat OA.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Chemicals and materials

Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Lonza, Basel, Switzerland, cat# BE-604F), Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM, ATCC®, cat# 30–2003), Fetal Calf Serum (FCS, Gibco by Life Technologies, CA, cat# 26010–074), FBS (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, cat# F9665), Penicillin-Streptomycin (P/S, Sigma-Aldrich, cat# P0781), Puromycin (Sigma-Aldrich, cat# P8833), Glutamax (Thermo Fisher Scientific, CA, cat# 35050–061), Sodium pyruvate solution (Sigma-Aldrich, cat# S8636), MEM Non-essential Amino Acid Solution (Sigma-Aldrich, cat# M7145), pBABE-puro mCherry-EGFP-LC3B (Addgene, Cambridge, MA, cat# 22418, RRID:Addgene\_22418), FuGene (Promega, Spain, cat# E2691), Opti-MEM® (1 $\times$ ) (Thermo Fisher Scientific, cat# 11058), Hank's Balanced Salt Solution (HBSS, Sigma-Aldrich, cat# H6648), ImaGene Green™ C12FDG LacZ Gene Expression kit (Life Technologies, USA, cat# D2893), Hoechst 33342 (Thermo Fisher Scientific, cat# 62249), Paraformaldehyde (PFA, Sigma-Aldrich, cat# 158127), Annexin V-FITC Apoptosis Detection kit (Immunostep, Spain, cat# ANXVKF-100 T), Griess Reagent (Enzo Life Sciences, Ann Arbor, MI, cat# alx-400-004-L050), Luminata™ Classico Western HRP Substrate, Millipore Corporation, MA, USA, Cat# WBLUC0100), Pierce® BCA Protein Assay (Thermo Fisher Scientific, cat# 23225), RNA isolation [Trizol (Thermo Fisher Scientific, cat# 15596026), RiboPure RNA Purification kit blood (Thermo Fisher Scientific, cat# AM1928), NZY First-Strand cDNA Synthesis kit (NZYTech, Portugal, cat# MB12501), iScript cDNA Synthesis kit (Bio-Rad, CA, cat# 1708890)], ImmPRESS DAB Reagent (Vector Labs, Burlingame, CA cat# MP-7401, RRID:AB\_2336529), DAB-Peroxidase substrate Kit (Vector Labs, cat# SK-4100, RRID:AB\_

2336382), Prestwick Chemical Library (Prestwick Chemical, Illkirch, France), Fenofibrate (Sigma-Aldrich, MO, cat# F6020, <https://www.drugbank.ca/drugs/DB01039>), GW7647 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, cat# G6793, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/3392731>), CP775146 (Sigma-Aldrich, cat# PZ0173, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/10410059>), Rapamycin (Calbiochem, Germany, cat# 5053210, <https://www.drugbank.ca/drugs/DB00877>), Navitoclax (ChemieTek, IN, USA, cat# CT-A263, <https://www.drugbank.ca/drugs/DB12340>), Etoposide (Sigma, cat# E1383, <https://www.drugbank.ca/drugs/DB00773>), Cloroquine (CQ, Sigma-Aldrich, cat# C6628), Bafilomycin (Sigma-Aldrich, cat# B1793), Interleukin-6 (IL-6, Sigma-Aldrich, cat# SRP3096), Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ , Sigma-Aldrich, cat# I9401), Tumor Necrosis Factor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ , Sigma-Aldrich, cat# T6674), Actinomycin D (Sigma-Aldrich, cat# A9415), p21 (Cell Signalling Technology, Netherlands, cat# 2947, RRID:AB\_823586), p16 (Abcam, UK, cat# ab51243, RRID:AB\_2059963), phospho-S6 Ribosomal Protein (prpS6, Cell Signalling Technology, cat# 4858, RRID:AB\_916156), LC3 (Cell Signalling Technology, cat# 3868, RRID:AB\_2137707), NF $\kappa$ B (Cell Signalling Technology, cat# 8242, RRID:AB\_10859369), PPAR $\alpha$  (Thermo Fisher Scientific, cat# PA1-822A, RRID:AB\_2165595),  $\alpha$ -tubulin (Sigma-Aldrich, cat# T9026, RRID:AB\_477593), Horseradish peroxidase (HRP)-conjugated anti-rabbit IgG (Sigma-Aldrich, cat# NA934, RRID:AB\_2722659), Horseradish peroxidase (HRP)-conjugated anti-mouse IgG (Sigma-Aldrich, cat# NA931, RRID:AB\_772210), Taqman probes (Hs00797944s1 MAP1LC3 FAM, cat# 4331182, Hs00231106 m1 FOXO1 FAM, cat# 4331182, Hs00355782 m1 CDKN1A FAM, cat# 4331182, Hs05332856 s1 NF $\kappa$ B FAM, cat# 4351372, Hs00912671 m1 CPT1A FAM, Hs01074241 m1 ACOX1 FAM, CA, cat# 4331182, Hs00947536 m1 PPAR $\alpha$  FAM, CA, cat# 4331182, Thermo Fisher Scientific), h36B4\_592F 5'CCACGCTGCTGAACATGC3', h36B4\_658R 5'TCGAACACCTGCTGGATGAC3, Integrated DNA Technologies, IDT, CA, cat# 76583076 and cat# 76583077) and h36B4\_VIC AACATCTCCCCTTCTCCTTTGGGCT-TAMRA probe (Thermo Fisher Scientific, cat# 450024), siRNA PPAR $\alpha$  (ID: 5439, cat# AM51331; Ambion, Austin, TX, USA), Lipofectamine RNAiMAX transfection reagent (Life Technologies, NY, USA, cat# 13778030), Silencer Cy-labelled negative Ctrl N.1 siRNA (Ambion, cat# AM4621), Echo@550 Acoustic Liquid Dispensing Technology (Labcyte, San José, CA), Janus (Perkin Elmer, USA), Multidrop<sup>TM</sup>Combi Reagent Dispenser (Thermo Fisher Scientific, CA), Microplate Washer (Biotek, CA), Operetta High-Content Imaging System (Perkin Elmer, USA), Harmony@ Image Analysis Software (Perkin Elmer), FACScalibur cytometer (Becton Dickinson, CA, RRID:SCR\_000401), software CellQuestPro (Becton Dickinson), Amersham Imager 600 (GE Healthcare, Weltham, MA), Image J software (National Institute of Health, USA, RRID:SCR\_003070), Nanoquant Infinite M200 (Tecan, Switzerland), NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific, RRID:SCR\_016517), Thermal Cycler (Thermo Fisher Scientific), LightCycler 480 Instrument II (Roche Life Science), qBASE+ qPCR analysis software (Biogazelle, Switzerland, RRID:SCR\_003370), Prism 6.0 software (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA, RRID:SCR\_002798).

## 2.2. T/C28a2 chondrocytes

The immortalized human juvenile chondrocyte cell line T/C28a2 [33], was cultured in DMEM supplemented with 10% FCS and 100 IU/ml Penicillin / 100  $\mu$ g/ml Streptomycin at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub>.

## 2.3. Chondrocyte isolation and culture

OA human cartilage was obtained from patients undergoing knee replacement (mean  $\pm$  SD: 76.8  $\pm$  4.71 years old,  $n$  = 5). Normal-Ageing human cartilage was harvested at the time of autopsy from the femoral condyles and the tibia plateaus of patients who had no history of joint disease (mean  $\pm$  SD: 76.1  $\pm$  14.50 years old,  $n$  = 10). Cartilage slices were minced and incubated with trypsin (0.5 mg/ml) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) for 10 min at 37 °C, and then shaken overnight at

at 37 °C with collagenase IV (Sigma-Aldrich) in DMEM with 5% FCS. The digest was centrifuged and the cells were incubated in DMEM with 10% FCS at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub>. Only first passage cells were used in the experiments.

## 2.4. Cartilage explants

Cartilage explants from human normal ageing patients (mean  $\pm$  SD: 73.33  $\pm$  17.95 years old,  $n$  = 3) were employed to evaluate cartilage degradation in response to IL-1 $\beta$ .

## 2.5. Samples consent statement

The samples needed to carry out this study were obtained from the collection of samples for the investigation of Rheumatic Diseases of Dr. Francisco J. Blanco García, from Xerencia de Xestión Integrada de A Coruña (XXIAC) and Instituto de Investigación Biomédica de A Coruña (INIBIC). This collection was registered in the National Registry of Biobanks, with registration code: C.0000424 and approved by the Ethics Committee of Galicia with registration code: 2013/107. The information and informed consent sheet was given to all participants in the research, whose biological samples and clinical data may be susceptible to be used in this study and are authorized by the Ethics Committee of Galicia, Law 14/2007, of the July 3, and Biomedical Research 1716/2011 of November 18. All the information obtained from the analysis of the samples will be treated at all times under the criteria of confidentiality and in accordance with the security requirements required by the Spanish legislation on data protection.

In addition, all methods were performed in accordance with the relevant guidelines and regulations and The Ethics Committee of Galicia, Spain approved this study.

## 2.6. Blood from the Spanish OA Cohort PROCOAC (PROspective Cohort of Osteoarthritis of A Coruña)

Total RNA was extracted from blood from Non-OA patients (Age: mean  $\pm$  SD: 60.95  $\pm$  6.51 years old, Body Mass Index (BMI): mean  $\pm$  SD: 24.96  $\pm$  3.34, Grade KL 0, Females,  $n$  = 25) and knee OA patients (mean  $\pm$  SD: 67.42  $\pm$  6.45 years old, BMI: mean  $\pm$  SD: 29.30  $\pm$  2.83, Grade KL 3 and 4, Females,  $n$  = 30) from the Spanish Cohort PROCOAC [34].

## 2.7. Prestwick chemical library

Prestwick chemical library was purchased from Prestwick Chemical. This collection contains 1120 pharmacological active compounds, 100% approved drugs (FDA, EMA and other agencies) selected by a team of medicinal chemists and pharmacists for their high chemical and pharmacological diversity as well as for their known bioavailability and safety in humans. The compounds were pre-dissolved at 10 mM concentration in DMSO.

## 2.8. Senescence-associated $\beta$ -galactosidase activity screening

A Multidrop Combi Reagent Dispenser was used for seeding cells into 384-well plates (3000 cells/well; Cell Carrier, Perkin Elmer) in DMEM supplemented with 10% FCS and 1% P/S and cells were cultured until confluence. Then cells were treated in DMEM 2% FCS with IL-6 20 ng/ml or with Prestwick chemical library at 10  $\mu$ M. Echo@550 Acoustic Liquid Dispensing Technology was used to add 75 nl of each sample to the interval plate. An automated workstation JANUS and liquid handling was employed to transfer 50  $\mu$ l per well of IL-6 with the compounds from the interval plate to the assay plate. The final assay volume was 50  $\mu$ l. To measure senescence-associated- $\beta$ -galactosidase (SA- $\beta$ -Gal) activity in live cells, we employed ImaGene Green<sup>TM</sup> C<sub>12</sub>FDG lacZ Gene Expression Kit (C<sub>12</sub>FDG) according to the supplier's

instructions. Cells were incubated with C<sub>12</sub>FDG substrate reagent (30  $\mu$ M) and Hoechst 33342 (2.5  $\mu$ l/ml) for 1 h at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub>. SA- $\beta$ -Gal activity was stopped with phenylethyl  $\beta$ -d-thiogalactoside (PETG, 1 mM) for 5 min at room temperature (RT) and cells were fixed with PFA 4% for 10 min at RT. CQ (200  $\mu$ M) was employed as a negative control for SA- $\beta$ -Gal activity. For data acquisition, images were captured by using the Operetta® High Content Screening system. This system is an automated microscope, which allows automated image acquisition and analysis. Each well was divided in four stacks with a working distance of 0.2  $\mu$ m. The first height was 7.6  $\mu$ m and the last height was 8.2  $\mu$ m. We selected three channels for analysis: Brightfield, Hoechst and Fluorescein. The images were captured using a 20 $\times$  objective, long WD. Hoechst allows to identify cell nuclei (excitation = 360–400 nm, emission = 410–480 nm, exposure time = 100 ms) and Fluorescein to identify SA- $\beta$ -Gal activity (excitation = 460–490 nm, emission = 500–550 nm, exposure time = 1800 ms). Brightfield images were captured by using exposure time = 20 ms.

## 2.9. Data analysis for chondrocyte senescence

SA- $\beta$ -Gal data from the screening assay was analysed by using Harmony® Image Analysis Software. We calculated the average intensity of cytoplasmic fluorescein and number of nuclei in test samples, as well as in positive and negative controls. Then, we determined a threshold to define the maximum of senescence. For this, we subtracted twice the standard deviation from the intensity of cytoplasmic fluorescein was subtracted two values from the standard deviation (mean - 2SD). We use the mean - 2SD value to select compounds from the Prestwick chemical library. We determined Z'factor, coefficient of variation (CV) values and signal-to-background (s/b) ratio for each plate [35]. Screening assay plate data was considered acceptable if Z'  $\geq$  0.5 (Supplementary Fig. 1).

## 2.10. Autophagy screen

pBABE-puro mCherry-EGFP-LC3B plasmid was obtained from Addgene. mCherry-EGFP-LC3 retrovirus was produced as described previously [36]. HEK 293-T17 (ATCC®, cat# CRL-11268, RRID:CVCL\_1926) cells were used to facilitate retroviral packaging. We employed FuGene Transfection Reagent, a nonliposomal mixture of lipids as a plasmid delivery method. After confirmation of transfection by microscopy, cells were sorted. Next, we selected the brightest clones by testing the expression of mCherry and GFP by flow cytometry. Finally, Operetta was used to evaluate the autophagic flux of selected clones by imaging. Stable clones were maintained in the presence of Puromycin (2.5  $\mu$ g/ml). A Multidrop Combi Reagent Dispenser was used for seeding cells into 384-well plates (8000 cells/well) in DMEM media supplemented with 10% FCS, 1% P/S and 2.5  $\mu$ g/ml Puromycin. Cells were incubated overnight at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub>. Echo®550 Acoustic Liquid Dispensing Technology was used to transfer compounds that were positive in the anti-senescence screen. The controls in this assay included DMEM supplemented with 2% FCS, IL-6 (20 ng/ml) and Chloroquine (30  $\mu$ M). Once the cells adhered to the well, we removed the medium of the final plate and an automated JANUS workstation was employed to transfer 50  $\mu$ l per well from interval plates to assay plates. Plates were incubated for 16 h at 37 °C in an atmosphere of 5% CO<sub>2</sub>. After incubation, cells were fixed with PFA 4% for 10 min at 37 °C, washed with HBSS and then, the nuclei were stained with Hoechst (2.5  $\mu$ g/ml) for 10 min at 37 °C. A Microplate Washer Robot and a Multidrop Combi Reagent Dispenser were used. We used a high-throughput method for quantifying autophagic flux. We employed the same HTS platform as in the SA- $\beta$ -Gal assay. The images were captured using Operetta. Each well was divided into four stacks with a working distance of 0.2  $\mu$ m. The first height was 7.6  $\mu$ m and the last height was 8.2  $\mu$ m. Cells were selected using four channels: Brightfield, Hoechst 33342, Fluorescein (EGFP), RFP (mCherry).

The images were captured using a 20 $\times$  objective, long WD as described in the senescence screen.

### 2.11. Data analysis of autophagic flux

Screening data were analysed using Harmony software. We calculated mCherry/EGFP Relative Spot Intensity with Harmony Analysis software. We obtained the mean and standard deviation of the positive and negative controls. We determined Z'factor, CV values and s/b (signal-to-background) ratio for each plate [35]. We use the (mean + 2SD) value to select compounds from the Prestwick chemical library. Screening assay plate data was considered acceptable if Z'  $\geq$  0.5 (Supplementary Fig. 2).

### 2.12. Determination of senotherapeutic activity

Human chondrocytes (T/C28a2) were seeded ( $1 \times 10^4$  cells/well) in 96-well plates cultured for 24 h and then treated with IL-6 (20 ng/ml) and a PPAR $\alpha$  agonists (Fenofibrate, CP775146, GW7647) at the indicated concentrations. Navitoclax (2.5  $\mu$ M) and Rapamycin (10  $\mu$ M) were used because of their senolytic and senomorphic effects, respectively. Following addition of the drugs, cells were incubated for 72 h. For fluorescence analysis of SA- $\beta$ -Gal activity, we followed the same protocol as mentioned in SA- $\beta$ -Gal Activity Screening. For quantitative analysis of total cell number (Hoechst staining) and number of senescent cells (C<sub>12</sub>FDG staining), a laser-based scanning confocal imager (IN Cell Analyzer 6000, GE Healthcare) was used. An acquisition protocol was established using the Acquisition software v4.5, including parameters such as the plates and wells that were imaged, wavelengths, and exposure time. The acquired images were analysed using the Multi Target Analysis Module that allows the creation of various decision trees and the application of appropriate classification filters to different image stacks. All samples were analysed in duplicate with 3–5 fields per well and mean values and standard deviations being calculated accordingly.

### 2.13. Assessment of cell death

Annexin V apoptosis detection kit was used according to the manufacturer's instructions (Immunostep). Chondrocytes were labelled with Annexin V and Propidium iodide. For each condition, 10,000 events were collected and FACSCalibur and CellQuestPro software was used to analyse the data. Results were represented as percentage of Annexin-V positive cells and percentage of Propidium iodide positive cells.

### 2.14. Quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (qRT-PCR)

Total RNA was extracted from blood of Non-OA and Knee OA patients using Ribopure RNA purification kit and from human T/C28a2 chondrocytes using TRIZOL reagent. Then, 1.5  $\mu$ g of RNA was used for complementary DNA (cDNA) synthesis using iScript cDNA synthesis kit and NZY First-Strand cDNA Synthesis kit for blood and cells, respectively. qRT-PCR was performed using Taqman Fast Advance Master Mix. Target gene expression was calculated using the comparative CT method ( $\Delta\Delta$ CT) and normalized to an internal control gene 36B4 (qBASE+ qPCR analysis software). The following Taqman probes were used: Hs00797944 s1 MAP1LC3 FAM, Hs00231106 m1 FOXO1 FAM, Hs00355782 m1 CDKN1A FAM, Hs05332856 s1 NF $\kappa$ B FAM, Hs00912671 m1 CPT1A FAM, Hs01074241 m1 ACOX1 FAM and Hs00947536 m1 PPAR $\alpha$  FAM.

### 2.15. Safranin O staining

Cartilage explants from human normal ageing patients were employed to evaluate cartilage degradation in response to IL-1 $\beta$ . Serial sections (4  $\mu$ m) were cut, stained with Safranin O–fast green to evaluate proteoglycan loss.

### 2.16. Nitric oxide assay

Griess reaction was used to quantify Nitric oxide (NO) production in the medium of primary human chondrocytes. An equal volume of Griess reagent and cellular supernatant (50:50  $\mu$ l) were mixed and shaken for 10 min in the dark. Absorbance was measured at 570 nm on a microplate reader (Nanoquant Infinite M200).

### 2.17. Western blotting

Western blotting was performed with a chemiluminescence detection system. Cell lysates were obtained from OA and ageing primary human chondrocytes. Protein Sample preparation and Western Blotting was performed as described previously [37]. The membranes were incubated with primary antibodies against p21 (1:1000), p16 (1:1000), pppS6 (1:2000), LC3 (1:1000), NF- $\kappa$ B p65 (1:1000) and PPAR $\alpha$  (1:1000) at 4 °C overnight.  $\alpha$ -Tubulin antibody (1:5000) was incubated for 1 h at room temperature. Next, the membranes were incubated with horseradish peroxidase (HRP)-conjugated anti rabbit IgG for 1 h at RT. Membranes were washed 3 times with TBS-T and protein bands were detected using a chemiluminescence substrate and a detection system (Amersham Imager 600). The intensity of the bands was quantified by using ImageJ software.

### 2.18. Autophagy inhibition by transfection with PPAR $\alpha$ small interference RNA

T/C28a2 human chondrocytes were transiently transfected with small interference RNA (siRNA) for PPAR $\alpha$ , using Lipofectamine RNAiMAX transfection reagent according to the manufacturer's instructions. Silencer Cy-labelled negative Ctrl N.1 siRNA was employed as control.

### 2.19. Histological analyses

Human knee cartilage samples from normal ageing donors ( $n = 3$ ) were fixed in 10% zinc-buffered formalin for 24 h. Knee joints from 6, 12, 18 and 30-month-old C57BL/6 J mice with spontaneous ageing-related OA ( $n = 3$  per time point) and from C57BL/6 J mice with OA induced by transection of the medial meniscotibial ligament and the medial collateral ligament (MMTL+MCL) (sham surgery and 10 weeks after surgery;  $n = 3$ ) were fixed in 10% zinc-buffered formalin for 24 h and decalcified in TBD-2 for 48 h. Sections were stained with Safranin O–fast green. Histological scoring of OA-like changes on the medial femoral condyle and tibial plateau from mice was performed using the Osteoarthritis Research Society International (OARSI) scoring system (score range 0 to 6) [38]. Paraffin sections from mouse models were provided from Dr. Martin Lotz at the Scripps Research, La Jolla, CA, USA.

### 2.20. Immunohistochemistry

Human cartilage and mouse knee joint sections were deparaffinized, washed, and blocked with 10% goat serum. Primary antibody against PPAR $\alpha$  (1:500) was applied and incubated overnight at 4 °C, followed by ImmPRESS reagents. The signal was developed with Diaminobenzidine-Peroxidase substrate Kit. The number of PPAR $\alpha$ -positive cells was quantified.

### 2.21. Quantification of positive chondrocytes in human cartilage and mouse knee joint sections

In human cartilage, 3 pictures per section were taken under 10 $\times$  magnification. In mouse knee joints from spontaneous ageing-related OA model and surgically induced OA, 3 pictures were taken under 10 $\times$  magnification, showing the center of the femoral condyle that is not covered by the menisci as well as the medial and lateral femoral condyles. Then, the total number of PPAR $\alpha$ -positive cells was counted in each section [39].

### 2.22. Statistical analysis

To test for normal distribution of the data, we used the Kolmogorov-Smirnov test. In general, the data sets followed a normal distribution. Statistically significant differences between 2 groups were determined by Student's *t*-test, while differences between multiple groups were determined analyzing variance (ANOVA) in conjunction with Tukey's multiple comparison. The data analysis and statistical inference was performed by using Prism 6.0 software. The results are reported as the mean  $\pm$  SEM. *p* values <.05 were considered significant.

### 2.23. Analysis of knee osteoarthritis patients treated with fibrates from Osteoarthritis Initiative (OAI) Cohort

For the present study, we used longitudinal data obtained from the multicenter, longitudinal, prospective observational study of knee OA, Osteoarthritis Initiative (OAI). The OAI data are publicly available at <https://oai.nih.gov>. Specific datasets used were: "MIF00", "MIF01", "MIF03", "MIF05" (release versions 0.2.2, 1.2.1, 3.2.1, and 5.2.1, respectively); "AllClinical00", "AllClinical01", "AllClinical03", "AllClinical05" (release versions 0.2.3, 1.2.2, 3.2.1, and 5.2.1, respectively); "Enrollees00 (release version 25)"; "Outcomes99" (release version 10).

The detailed information about the OAI protocol can be found at the osteoarthritis initiative protocol for the cohort study, from <http://data-archive.nimh.nih.gov/binaries/content/documents/ndacms/resources/oai/oai-study-protocol/oai-study-protocol/ndacms%3Aresource>. The OAI cohort consists of a progression subcohort (patients with symptomatic tibiofemoral knee OA,  $n = 1390$ ), an incidence subcohort (subjects with increased risk of OA,  $n = 3284$ ) and a reference control subcohort ( $n = 122$ ). In this analysis we used the longitudinal data from both the progression and incidence subcohorts. The main inclusion criteria were the following: age between 45 and 79 years for both subcohorts, symptomatic tibiofemoral knee OA for the progression subcohort, and the presence of established or putative risk factors for incident knee OA for the incidence subcohort. The OAI participants were recruited and enrolled between February 2004 and May 2006 at four recruitment centres in the United States. This study was approved by institutional review board committees from each recruitment centre. Before entering the study, all participants provided written informed consent. The prespecified sample size was 5000 participants (4000 in the incidence subcohort, 800 in the progression subcohort). It was expected that this sample size would provide an adequate number of knees with incident and worsening OA-related structural and clinical changes in order to achieve the primary aims of the OAI study.

#### 2.23.1. Clinical measures

Height was measured in millimetres using a calibrated, wall-mounted stadiometer. The measurement was performed twice with the subject in light clothing, without shoes, and during inspiration. Body weight was measured in kilograms with a calibrated, standard balance beam scale. The measurement was performed twice with the subject in light clothing without shoes, heavy jewellery or wallets. Body mass index (BMI) was calculated based on weight (in kg) divided by height (in cm) squared. Prior knee surgery was evaluated using interview. Self-reported physical activity was measured using the Physical



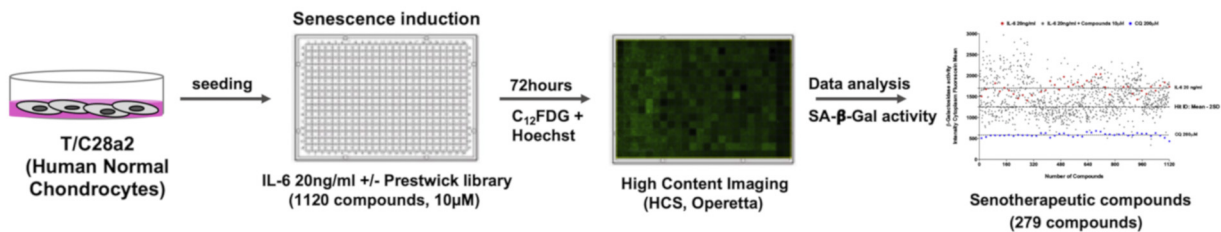
Activity Scale for the Elderly (PASE) [40]. To evaluate the severity of OA symptoms, the self-reported Western Ontario McMaster Osteoarthritis Index (WOMAC) (5 point Likert scale) for addressing pain, function, and stiffness was used [41]. The possible range for pain was 0–20, for physical function was 0–68, and for stiffness was 0–8. In OAI, WOMAC subscores are reported separately for each knee. For the analyses, we used the highest from the left and right sided scores for the WOMAC

subcategories. The outcomes were assessed at baseline and annually until year 3. The WOMAC scores after joint replacement were coded as missing values.

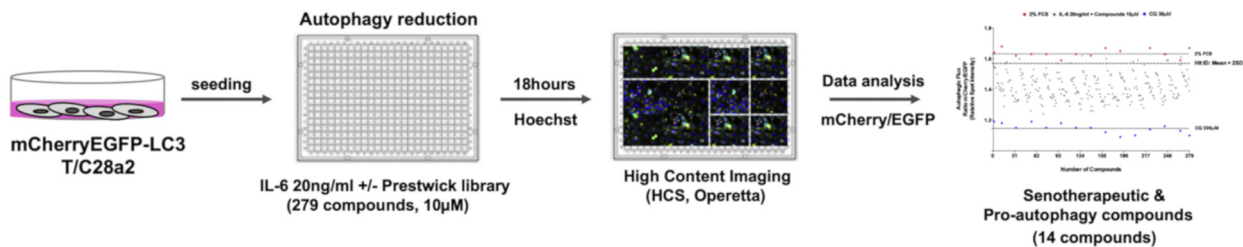
To acquire information about the use of fibrates, a medication inventory method was used. In this method the participants bring in all of the medications they are currently taking, and the brand name, generic name or active ingredients are recorded and matched to an entry in

a

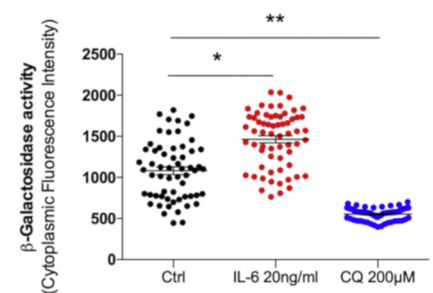
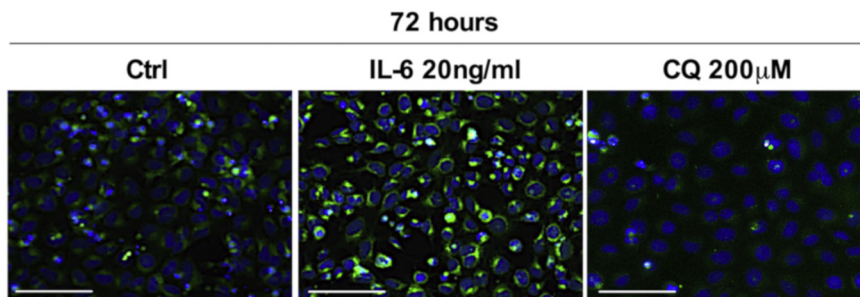
### Primary screening



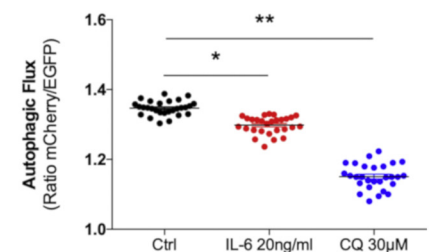
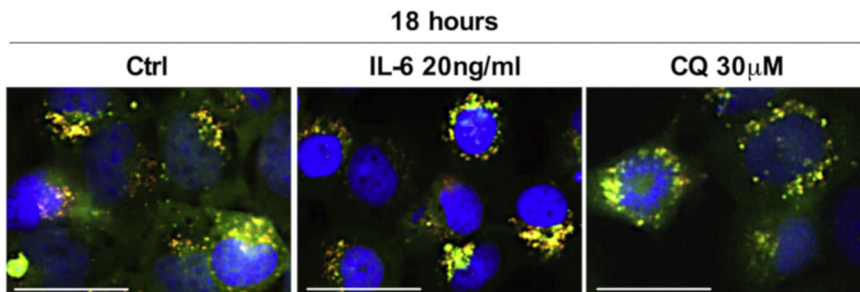
### Secondary screening



b



c



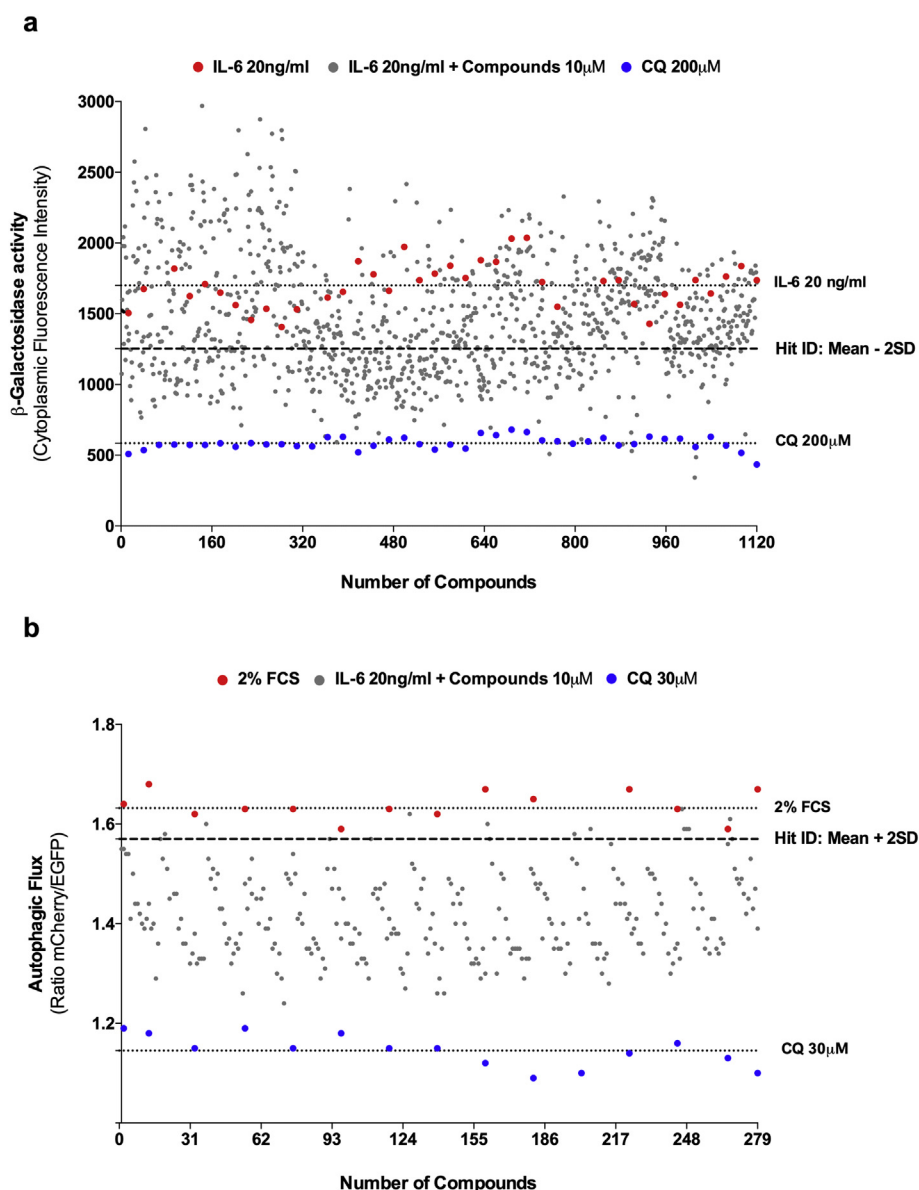
**Fig. 1.** Cell-based imaging screening to identify senescence and autophagy modulators. a. Schematic imaging screening development. Primary screening was performed in T/C28a2 human chondrocytes treated with IL-6 (20 ng/ml) +/- Prestwick Chemical Library (1120 compounds, 10  $\mu$ M) for 72 h in a 384 well plate. Hoechst 33342 (1  $\mu$ M) was employed for 10 min for nuclei staining. Then, chondrocyte senescence was determined with  $C_{12}$ FDG to quantify senescence-associated  $\beta$ -Galactosidase (SA- $\beta$ -Gal) activity by using a High Content Imaging System (HCIS). Secondary screening was performed in an autophagy reporter cell line in human chondrocytes (mCherryEGFP-LC3 T/C28a2) treated with IL-6 (20 ng/ml) +/- Prestwick Chemical Library (279 compounds, 10  $\mu$ M) for 18 h in a 384 well plate. Hoechst 33342 (1  $\mu$ M) was employed for 10 min for nuclei staining. b. IL-6 (20 ng/ml) induced chondrocyte senescence at 72 h. Cellular senescence was determined with the Galactosidase substrate,  $C_{12}$ FDG by HCIS. Chloroquine (CQ, 200  $\mu$ M) was employed as SA- $\beta$ -Gal inhibitor. Scale bar, 100  $\mu$ m. SA- $\beta$ -Gal activity was represented by the intensity of the cytoplasmic fluorescein. Values are mean  $\pm$  SEM of 60 well/condition, \* $p$  < .0001, \*\* $p$  < .0001 vs. Ctrl, two-tailed unpaired Student's  $t$ -test. c. IL-6 (20 ng/ml) reduced autophagic flux at 18 h. Chloroquine (CQ, 30  $\mu$ M) was employed as autophagic flux inhibitor. Scale bar, 50  $\mu$ m. Autophagic flux was represented by the ratio between mCherry/EGFP. Values are mean  $\pm$  SEM of 28 well/condition, \* $p$  < .0001, \*\* $p$  < .0001 vs. Ctrl, two-tailed unpaired Student's  $t$ -test.

an online medication dictionary [42]. Fibrate users were defined as those with at least one recorded use during first three years of the study, excluding baseline use (a “new-user” design). We considered participants to be users regardless of consistency of fibrate use and its duration, thus mimicking intent-to-treat analysis in randomized controlled studies.

### 2.23.2. Statistical analysis

The genetic matching method was used to match fibrate users with non-users. Genetic matching is a multivariable matching approach making the distribution of baseline characteristics in “treatment” and “control” groups as similar as possible. Genetic matching uses an automated evolutionary search algorithm to determine the weight each covariate is given. This method combines multivariate matching on the covariates and propensity score-matching that allows to optimize

covariate balance between matched samples. Compared with other matching methods, genetic matching has been found to improve covariate balance and reduce bias [43]. We used one-to-one matching with replacement as it was shown to lead to less bias [44]. The following potential confounding variables were used for the matching: demographic characteristics, body mass index, prior knee surgery, baseline outcome measures, and PASE. After all matches were done, differences between the two groups were compared by standardized differences,  $\geq 0.1$  was defined as meaningful disbalance [45]. After matching was performed, generalized estimating equations (GEE) were used to model the relationship between outcomes measured over time and fibrate use. For the assessment of changes in outcome measures over time, we used the user\*time interaction term. A  $\beta$ -coefficient for this interaction term indicates yearly change in the outcome parameter assuming linear development over time. The GEE models were fitted using robust



**Fig. 2.** Identification of senescence and autophagy modulators. a. Primary screening was performed in T/C28a2 human chondrocytes treated with IL-6 (20 ng/ml) +/- Prestwick Chemical Library 10  $\mu$ M (1120 compounds) at 72 h. CQ (200  $\mu$ M) for 30 min was employed as negative control of SA- $\beta$ -Gal activity. SA- $\beta$ -Gal activity was determined by  $C_{12}$ FDG and represented by mean of cytoplasmic fluorescein intensity. 279 compounds were identified as senotherapeutics. Compounds were considered hits by *mean* - 2SD on average *Z*factor of 0.53. b. Secondary screening in mCherryEGFP T/C28a2 human chondrocytes treated with IL-6 (20 ng/ml) +/- of Prestwick Chemical Library 10  $\mu$ M (279 compounds) at 18 h. CQ (30  $\mu$ M) was employed as negative control for autophagic flux. Autophagic flux was determined by the ratio mCherry/EGFP. 14 compounds were identified as hits by *mean* + 2SD on average *Z*factor of 0.58.

**Table 1**  
Identified compounds with senotherapeutic and pro-autophagy activity.

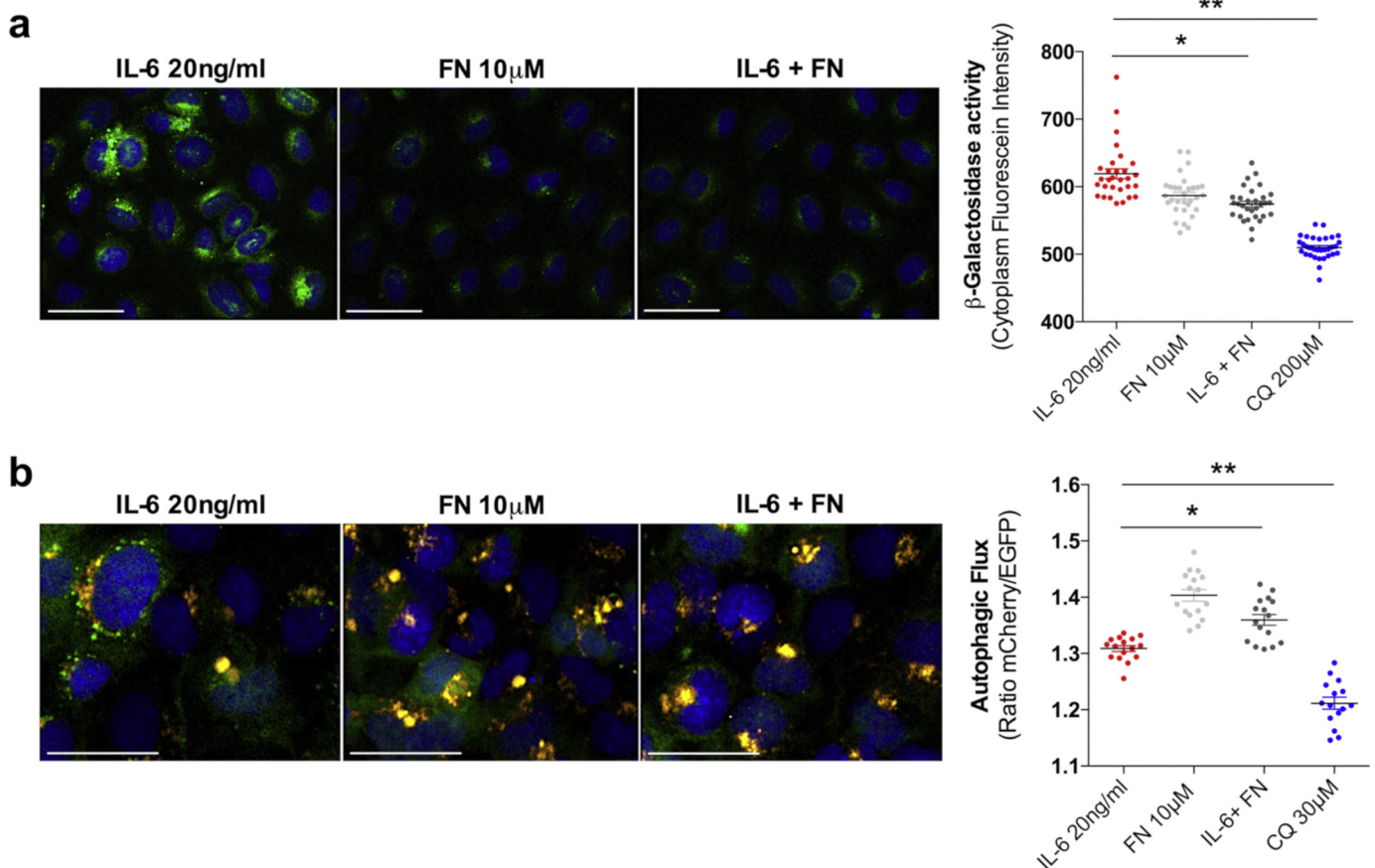
Compounds	$\beta$ -Gal activity	Cell number	Autophagic flux	Target
Bupivacaine hydrochloride	1142	865	1.60	Sodium ion channels
Minoxidil	1185	950	1.59	Potassium channels
Fenofibrate	1234	997	1.57	Peroxisome Proliferator Receptor $\alpha$
Pentolinium bitartrate	1162	964	1.59	Unknown
Tomatine	1142	970	1.57	Unknown
Benzydamine hydrochloride	1196	1016	1.57	Cyclooxygenase
Ciproheptadine hydrochloride	1031	914	1.6	Histamine H1 and Serotonin receptors
Lomefloxacin hydrochloride	1155	1046	1.58	DNA replication
Flutamide	1091	995	1.57	Androgen receptor
Digitoxigenin	1382	1262	1.59	Na,K ATPase
Guanethidine sulfate	1101	1030	1.58	Adrenergic system
Antipyrine	997	1046	1.61	Prostaglandin G/H synthase 1 and 2
Astemizole	712	770	1.63	Histamine H1 receptor
Pherphenazine	878	985	1.62	Dopamine D2 receptor

standard errors computed by a “sandwich” estimator. An exchangeable correlation structure was used to correct for the correlation between repeated measurements. Although selection of proper correlation structure is the assumption in GEE models, the method is robust against violation of this assumption. GEE allows for not using imputation methods for the missing data, because the participants with missing data are not excluded from the analysis [46]. Genetic matching was performed using “Matchit” package for R (version 3.0.2) [47]. GEE analyses were done with “gee” package for R (version 4.13–19) [48]. All statistical analyses were performed using R software (version 3.5.1).

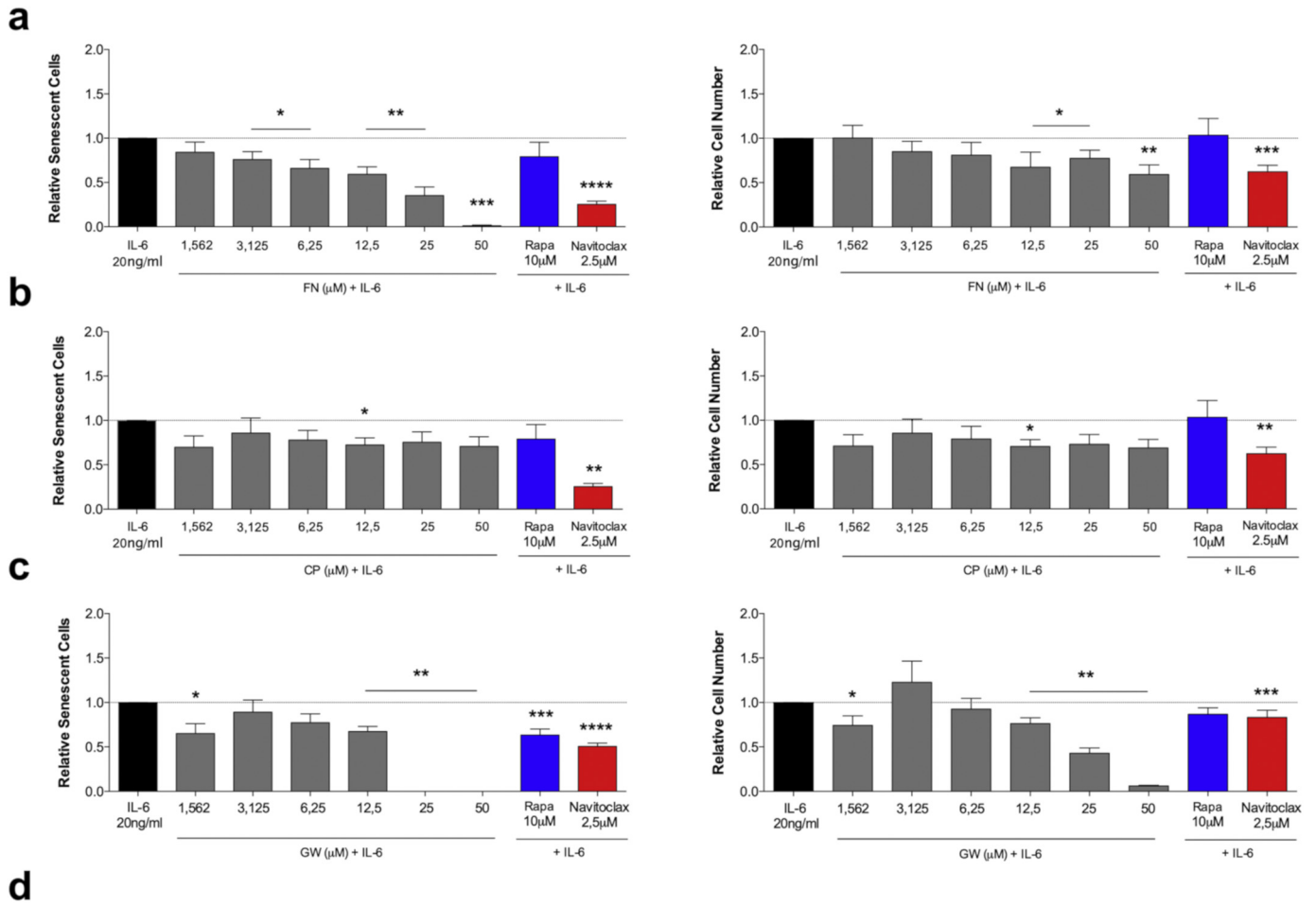
### 3. Results

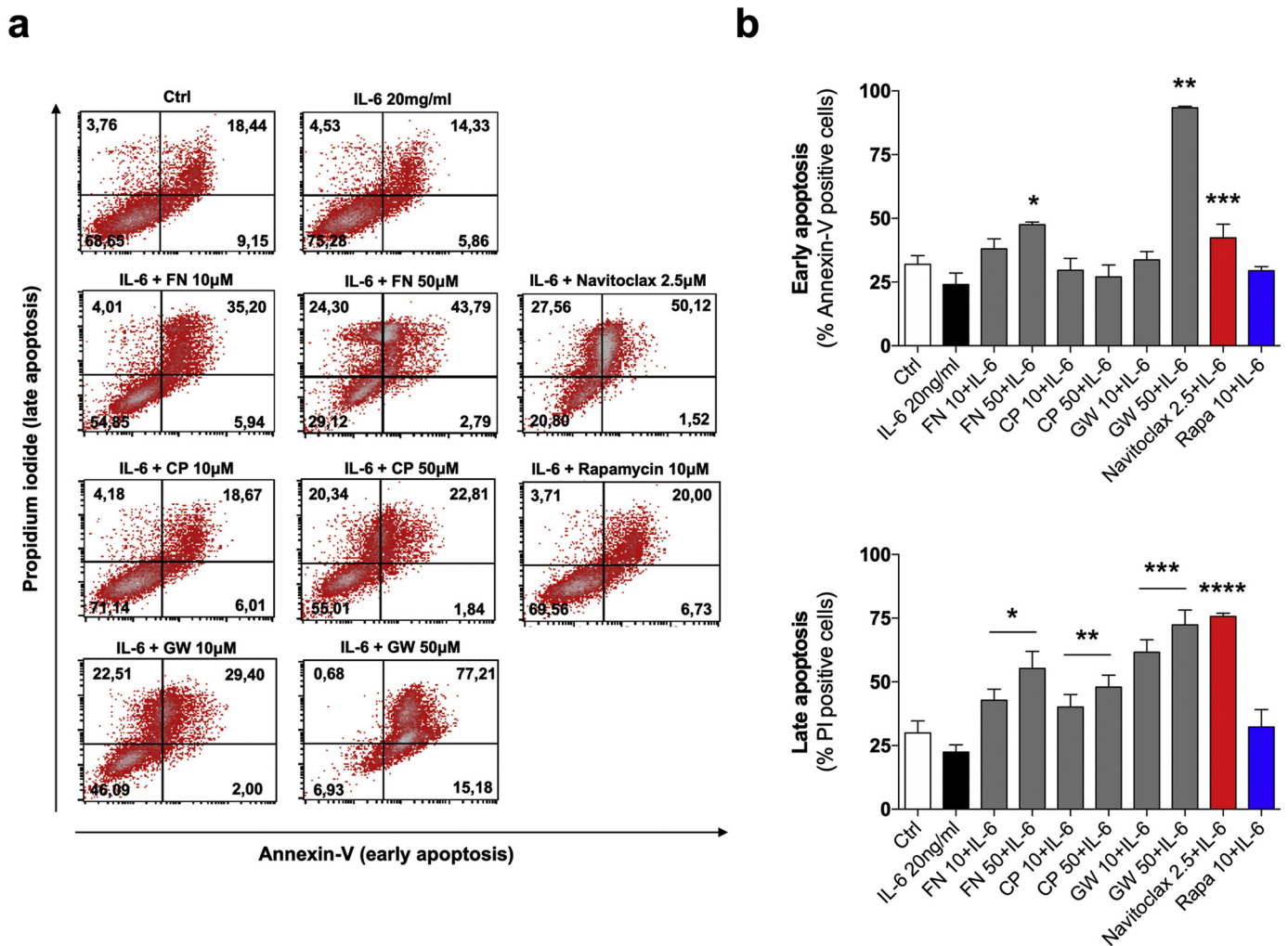
#### 3.1. Identification of senescence and autophagy modulators

A cell-based imaging assay in human chondrocytes was used to identify compounds that modulate senescence and autophagy as novel OA disease-modifying therapeutics. Chondrocytes were treated simultaneously with IL-6 and compounds from the Prestwick Chemical library. To quantify senescence, fluorescent SA- $\beta$ -Gal activity was analysed using the C<sub>12</sub>FDG substrate and the ratio of fluorescent signal



**Fig. 3.** Fenofibrate, a PPAR $\alpha$  agonist, reduces chondrocyte senescence and induces autophagic flux. **a.** T/C28a2 human chondrocytes were treated with IL-6 (20 ng/ml), or FN (10  $\mu$ M), or in combination for 72 h in a 384 well plate. CQ (200  $\mu$ M) was employed as inhibitor of SA- $\beta$ -Gal activity. Scale bar, 100  $\mu$ m. Values are mean  $\pm$  SEM of 30 well/condition,  $^*p < .0001$ ,  $^{**}p < .0001$  vs. IL-6, two-tailed unpaired Student's *t*-test. **b.** mCherry-EGFP-LC3 T/C28a2 human chondrocytes were treated with IL-6 (20 ng/ml), or FN (10  $\mu$ M), or in combination for 18 h in a 384 well plate. CQ (200  $\mu$ M) was employed as inhibitor of autophagic flux. Scale bar, 50  $\mu$ m. Values are mean  $\pm$  SEM of 16 well/condition,  $^*p < .0001$ ,  $^{**}p < .0001$  vs. IL-6, two-tailed unpaired Student's *t*-test.





**Fig. 5.** FN selectively kill senescent chondrocytes through inducing cell death by apoptosis. **a.** Flow cytometry determination of early apoptosis by Annexin-V staining, and late apoptosis by propidium iodide (PI) staining in T/C28a2 human chondrocytes treated with IL-6 (20 ng/ml), or in combination with FN, CP and GW (10, 50 µM), Rapa (10 µM), or with Navitoclax (2.5 µM) for 72 h in a 12 well plate. **b.** Quantitative analysis of chondrocyte death by Annexin-V and PI staining in human chondrocytes. Values are mean ± SEM of three independent observations. Early apoptosis: \* $p < .01$ , \*\* $p < .0001$ , \*\*\* $p < .05$  vs. IL-6; Late apoptosis: \* $p < .05$ , \*\* $p < .05$ , \*\*\* $p < .01$ , and \*\*\*\* $p < .0001$  vs. IL-6, two-tailed unpaired Student's *t*-test.

intensity in LC3 punctae was used as a marker of LC3-mediated autophagic flux (Fig. 1a). In this system, IL-6 induced a significant increase in both the percentage of cells positive for SA-β-Gal activity at 72 h (Fig. 1b) and overall SA-β-Gal activity. Similarly, IL-6 induced a significant decrease in autophagic flux as well as the percent of cells positive for autophagy at 18 h (Fig. 1c). Chloroquine (CQ), an intracellular β-Gal and autophagic flux inhibitor, was employed as a negative control. In addition, p21, an important senescence marker [49] and phosphoribosomal S6 (prbS6), a direct target of the mammalian target of rapamycin (mTOR) [50], were significantly increased after IL-6 stimulation (Supplementary Fig. 3).

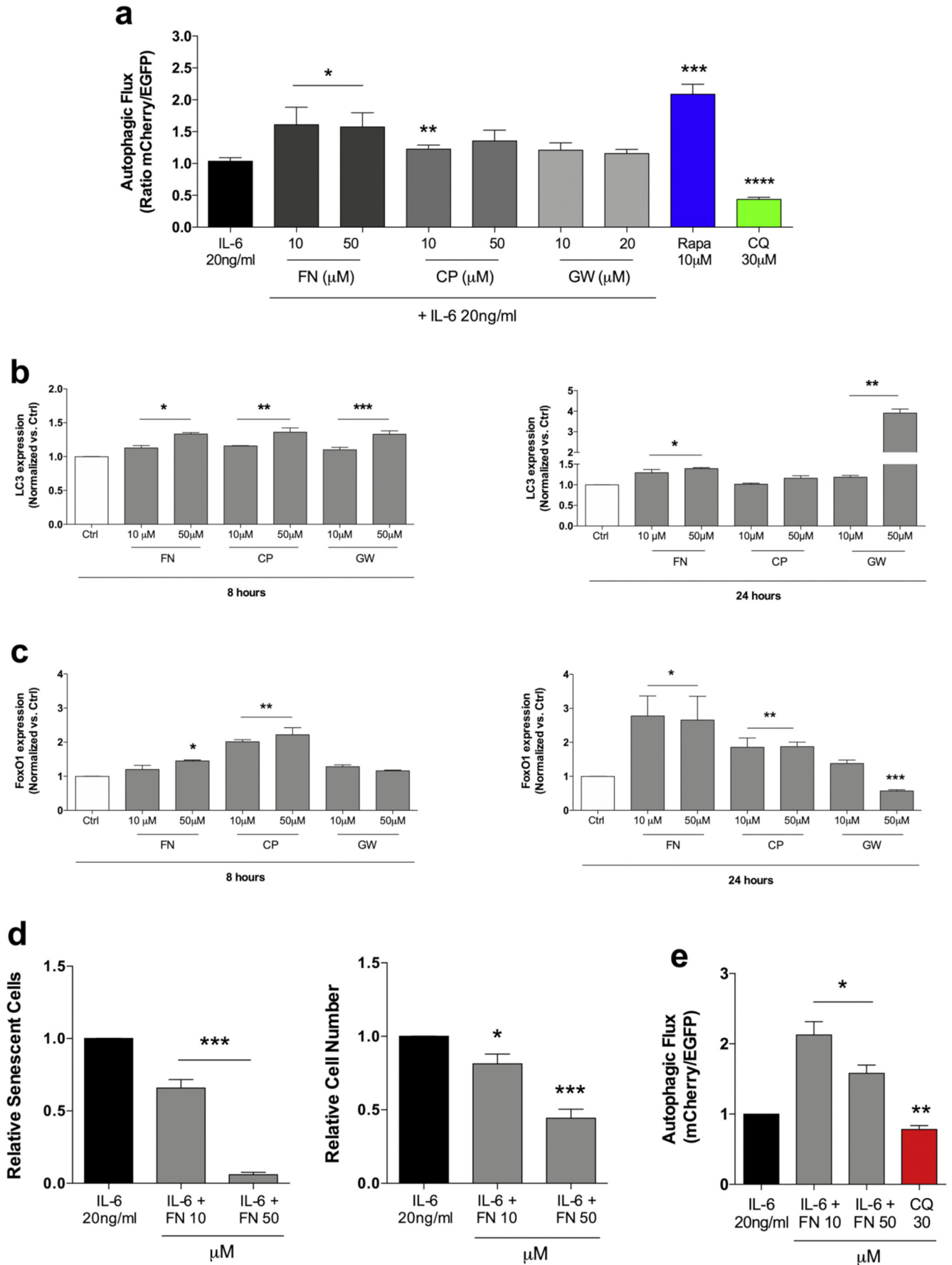
Results showed that 279 compounds from the Prestwick library decreased IL-6 induced senescence (Fig. 2a). From this set of 279, 14 compounds also increased autophagic flux and were selected as dual senescence and autophagy modulators for confirmatory studies

(Fig. 2b). The compounds identified primarily targeted ion channels and hormone receptors related to metabolism (Table 1). Peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARα), a therapeutic target for lipid metabolism dysfunction [32] was considered relevant for chondrocyte homeostasis so PPARα modulators were selected for further studies. Fenofibrate (FN), a PPARα agonist significantly reduced SA-β-Gal activity in IL-6 treated chondrocytes at 72 h (Fig. 3a) and this was accompanied by an increase in autophagic flux at 18 h (Fig. 3b), confirming its senotherapeutic and autophagy promoting activity.

### 3.2. PPARα agonists function as senolytics to selectively kill senescent chondrocytes through cell death by apoptosis

To characterize the senotherapeutic activity of FN and other selective PPARα agonists, such as CP775146 and GW7647, the agonists

**Fig. 4.** PPARα agonists are senolytics in human chondrocytes. **a.** T/C28a2 human chondrocytes were treated with IL-6 (20 ng/ml) in combination with FN (1,582 – 50 µM), Rapa (10 µM), or Navitoclax (2.5 µM) for 72 h in a 96 well plate. Relative senescence cells: values are mean ± SEM of 4 well/condition, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.0001$  and \*\*\*\* $p < 0.0001$  vs. IL-6. Relative cell number: values are mean ± SEM of 4 well/condition, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  and \*\*\* $p < 0.01$  vs. IL-6, two-tailed unpaired Student's *t*-test. **b.** T/C28a2 human chondrocytes were treated with IL-6 (20 ng/ml) in combination with CP (1,582 – 50 µM), Rapa (10 µM), or Navitoclax (2.5 µM) for 72 h in a 96 well plate. Relative senescence cells: values are mean ± SEM of 4 well/condition, \* $p < 0.01$ , \*\* $p < 0.0001$  vs. IL-6. Relative cell number: values are mean ± SEM of 4 well/condition, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.001$ , \*\*\* $p < 0.01$  and \*\*\*\* $p < 0.0001$  vs. IL-6. **c.** T/C28a2 human chondrocytes were treated with IL-6 (20 ng/ml) in combination with GW (1,582 – 50 µM), Rapa (10 µM), or Navitoclax (2.5 µM) for 72 h in a 96 well plate. Relative senescence cells: values are mean ± SEM of 4 well/condition, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.001$ , \*\*\* $p < 0.01$  and \*\*\*\* $p < 0.0001$  vs. IL-6. Relative cell number: values are mean ± SEM of 4 well/condition, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.001$  and \*\*\*\* $p < 0.05$  vs. IL-6, two-tailed unpaired Student's *t*-test. **d.** Representative images of SA-β-Gal activity from T/C28a2 human chondrocytes treated with FN in response to IL-6 treatment. Scale bar, 100 µm.



(1.5–50  $\mu\text{M}$ ) were added to chondrocytes treated with IL-6 (20 ng/ml) for 72 h. The PPAR $\alpha$  agonists showed senolytic activity in human chondrocytes by reducing both the number of senescent cells and total number of cells. FN showed a dose-dependent senolytic effect (Fig. 4a), GW7647 was toxic at 50  $\mu\text{M}$  (Fig. 4b) and CP775146 was senolytic only at 12.5  $\mu\text{M}$  (Fig. 4c). Navitoclax and Rapamycin (Rapa) were employed as positive control for senolytic and senomorphic activity, respectively.

To investigate how senescent cells were eliminated by PPAR $\alpha$  agonists, chondrocyte death was determined by evaluating early and late apoptosis, using annexin-V and propidium iodide (PI), respectively (Fig. 5a). Quantification of apoptosis demonstrated that PPAR $\alpha$  agonists (10 and 50  $\mu\text{M}$ ) selectively eliminated senescent cells by increasing apoptosis following IL-6-mediated induction of senescence (Fig. 5b). FN showed similar effects to navitoclax (a reference control for senolytic activity), while the senomorphic drug rapamycin did not increase apoptosis. These results suggest that the senolytic activity of FN in human chondrocytes is associated with selective induction of apoptosis.

Moreover, to evaluate the senolytic effect of PPAR $\alpha$  activation, senescent human IMR90 lung fibroblasts and DNA repair deficient *Ercc1*<sup>-/-</sup> MEFs fibroblasts were employed [28,51]. The results showed that PPAR $\alpha$  agonists act as senolytics in both models, indicating the potential senotherapeutic effect of activating lipid metabolism in multiple senescent cell types (Supplementary Fig. 4 and Supplementary Fig. 5).

### 3.3. Homeostasis markers are positively regulated by PPAR $\alpha$ agonists

To determine the effects of PPAR $\alpha$  modulators on cellular homeostasis mechanisms such as autophagy and FoxO signalling pathway, human chondrocytes were treated with PPAR $\alpha$  agonists (10 and 50  $\mu\text{M}$ ) following exposure to IL-6. Only FN increased autophagic flux at both concentrations while the other PPAR $\alpha$  agonists showed lower and mostly non-significant effects. Rapamycin and chloroquine (CQ) showed the expected effects as positive and negative controls for autophagic flux (Fig. 6a). In addition, PPAR $\alpha$  agonists also increased LC3 and *FoxO1* gene expression at 8 and 24 h (Fig. 6 b, c). Taken together, these results demonstrate that FN regulates homeostasis in human chondrocytes as both a senolytic and autophagy modulating compound (Fig. 6d).

### 3.4. FN protects against cartilage degradation and regulates senescence, autophagy and inflammation

Treatment with FN reduced proteoglycan loss in cartilage explants and protected against cartilage degradation in response to IL-1 $\beta$  treatment (Fig. 7a). This protective role was correlated with a reduction of nitric oxide (NO) production (Fig. 7b). Moreover, FN treatment did not induce cell death in primary non-senescent human chondrocytes (Supplementary Fig. 6).

Human OA and ageing primary chondrocytes were employed to further investigate the influence of FN on senescence, autophagy, inflammation and cartilage degradation. The levels of expression of the senescence markers *p21* and *p16*, the key autophagy regulator LC3 and the p65/RelA subunit of NF- $\kappa$ B, a key regulator of SASP, were evaluated as well as the extent of phosphorylation of pS6 as a marker for mTOR activity. In OA chondrocytes, FN reduced expression of *p21* and the NF- $\kappa$ B p65 subunit *RELA* (Fig. 7c) and reduced phosphor-S6. In

ageing chondrocytes FN, reduced expression of *p16*, *p21* and NF $\kappa$ B/*RELA* and increased expression of LC3 while reducing the level of phospho-S6 (Fig. 7d). This regulation of senescence and autophagy markers in the chondrocyte cultures is likely conferred through the deletion of senescent chondrocytes. Remarkably, genetic deletion of PPAR $\alpha$  promoted senescence and SASP/inflammation by increasing *p21* and NF- $\kappa$ B/*RELA* expression levels respectively as well as increased LC3 and reduced *FOXO1* expression (Fig. 7e-i). These data are consistent with FN treatment inducing the selective elimination of senescent cells and favorably modulating inflammatory and metabolic responses involved in OA pathogenesis.

### 3.5. FN increases PPAR $\alpha$ expression and regulates the $\beta$ -oxidation transcriptional program in human chondrocytes

PPAR $\alpha$  regulates fatty acid (FA)  $\beta$ -oxidation and is involved in regulation of energy homeostasis [52]. PPAR $\alpha$  also appears to auto-regulate its own expression. Thus, we examined if FN regulates PPAR $\alpha$  in human chondrocytes. FN treatment increased PPAR $\alpha$  expression at both gene and protein level (Fig. 8a, b) and that PPAR $\alpha$  agonists regulated FA  $\beta$ -oxidation genes in human chondrocytes (Fig. 8c, d).

### 3.6. PPAR $\alpha$ is downregulated in mouse models of ageing and OA

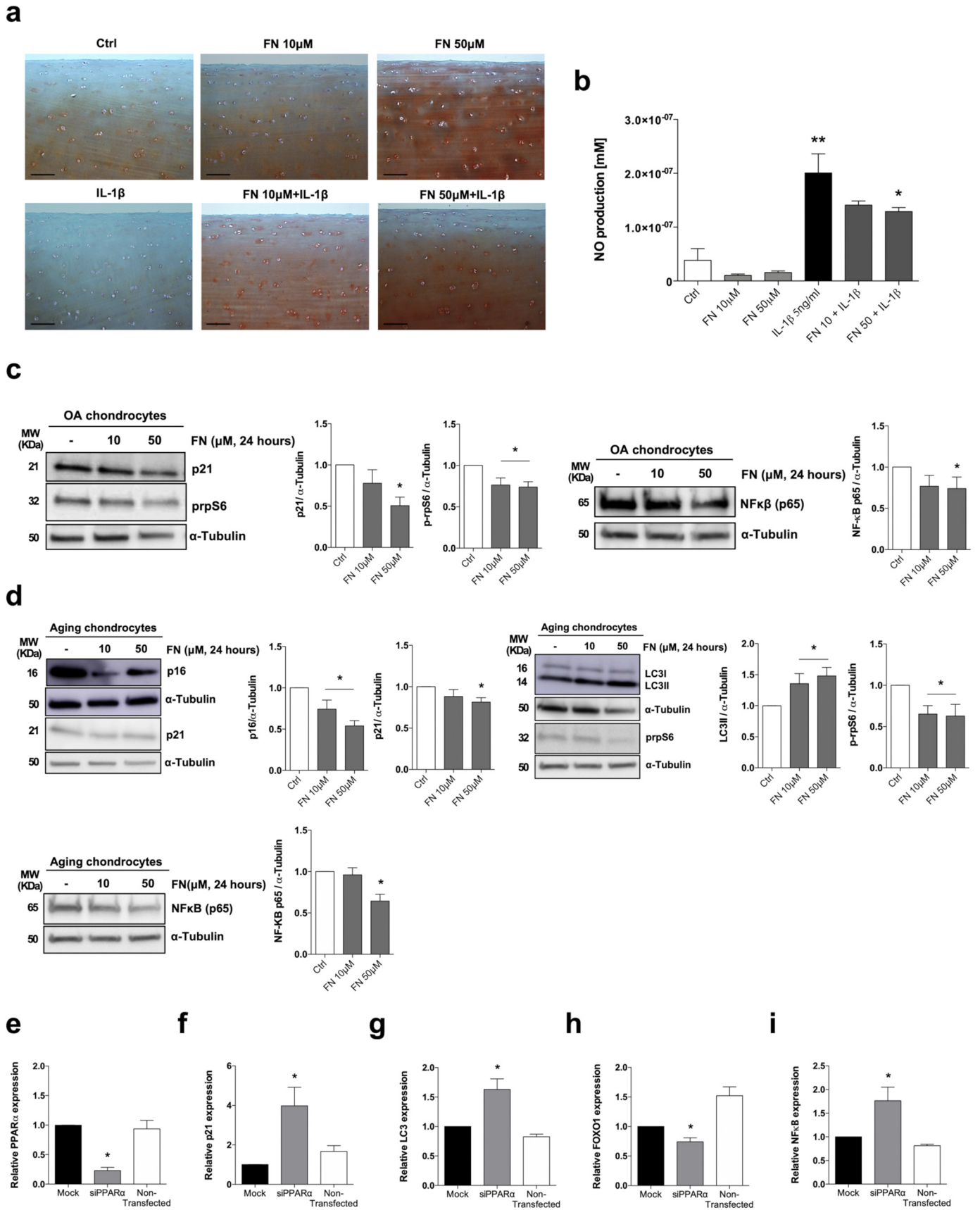
The expression pattern of PPAR $\alpha$  in cartilage with ageing and OA was investigated in natural ageing and in a surgically-induced OA model in mice. The number of PPAR $\alpha$ -positive chondrocytes in knee cartilage significantly decreased with ageing, with only a minimal percentage of the cells positive for PPAR $\alpha$  at 30 months (Fig. 9a). In the surgical OA model, 10 weeks after transection of the medial meniscotibial ligament and the medial collateral ligament (MMTL+MCL), PPAR $\alpha$ -positive cells were also significantly reduced (Fig. 9b).

### 3.7. PPAR $\alpha$ is reduced in OA patients and its pharmacological activation improved their clinical conditions

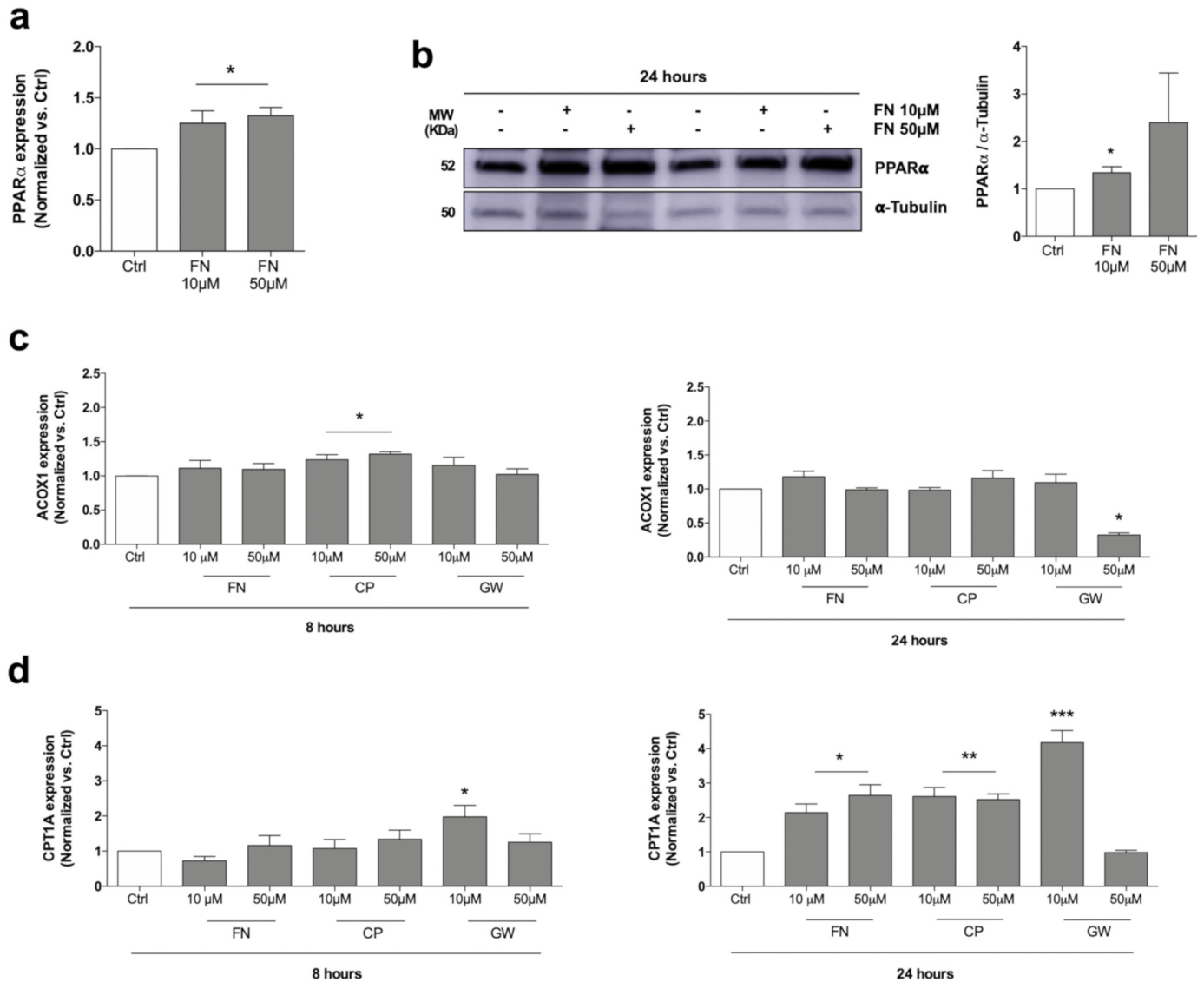
The relevance and potential translation of this mechanism was explored by analyzing human cohorts of OA patients. To investigate the role of PPAR $\alpha$  as a potential biomarker of OA, blood from the PROspective Osteoarthritis Cohort of A Coruña (PROCOAC) and human cartilage from non-OA and knee OA patients were employed. Levels of PPAR $\alpha$  were lower in OA patients compared to non-OA controls (Fig. 10a). In addition, immunohistochemical analysis of cartilage showed that PPAR $\alpha$  was mainly expressed in the superficial zone in non-OA cartilage with decreased expression in OA grade III-VI patients. Moreover, in OA cartilage, PPAR $\alpha$  positive cells were present only in the chondrocyte clusters (Fig. 10b, c).

The potential efficacy of PPAR $\alpha$  agonists was also evaluated using the Osteoarthritis Initiative (OAI) Cohort. In this cohort, there were 35 fibrates users and 3322 participants not taking fibrates in the selected sample (Supplementary Fig. 7). Using a genetic matching, 35 fibrates users were matched to 35 participants in the control group. After matching, all standardized differences of means decreased to <0.05, indicating that the matched groups had <5% of standard deviation difference in the corresponding variables. Therefore, it was considered that covariates were well balanced between groups (Supplementary Table 1). From the total of 35 fibrates users, twenty-four users (68.6%)

**Fig. 6. PPAR $\alpha$  agonists modulate key homeostasis markers in human chondrocytes.** **a.** mCherry-EGFP/LC3 T/C28a2 human chondrocytes were treated with IL-6 (20 ng/ml) alone or in combination with PPAR $\alpha$  agonists FN, CP and GW (10, 50  $\mu\text{M}$ ) for 18 h in a 96 well plate. Rapa (10  $\mu\text{M}$ ) and CQ (30  $\mu\text{M}$ ) were employed as activator and inhibitor of autophagic flux, respectively. Values are mean  $\pm$  SEM of 6 independent observations, \* $p$  < 0.05, \*\* $p$  < 0.05, \*\*\* $p$  < 0.0001 and \*\*\*\* $p$  < 0.0001 vs. IL-6, two-tailed unpaired Student's t-test. **b.** Relative expression of LC3 in T/C28a2 human chondrocytes untreated or treated with FN, CP and GW (10, 50  $\mu\text{M}$ ) for 8 and 24 h. Values are mean  $\pm$  SEM of 3 independent observations (8 h: \* $p$  < 0.01, \*\* $p$  < 0.0001, \*\*\* $p$  < 0.0001 vs. IL-6; 24 h: \* $p$  < 0.05, \*\* $p$  < 0.0001 vs. IL-6, two-tailed unpaired Student's t-test). **c.** Relative expression of *FoxO1* in T/C28a2 human chondrocytes untreated or treated with FN, CP and GW (10, 50  $\mu\text{M}$ ) for 8 and 24 h. Values are mean  $\pm$  SEM of 3 independent observations (8 h: \* $p$  < 0.0001, \*\* $p$  < 0.0001 vs. IL-6, 24 h: \* $p$  < 0.05, \*\* $p$  < 0.05, \*\*\* $p$  < 0.01 vs. IL-6), two-tailed unpaired Student's t-test. **d.** Relative senescence cells: values are mean  $\pm$  SEM of 16 well/condition, \*\*\* $p$  < 0.0001 vs. IL-6. Relative cell number: values are mean  $\pm$  SEM of 16 well/condition, \* $p$  < 0.05 and \*\*\* $p$  < 0.01 vs. IL-6, two-tailed unpaired Student's t-test. **e.** Determination of autophagic flux. Values are mean  $\pm$  SEM of 16 well/condition, \* $p$  < 0.0001, \*\* $p$  < 0.0001 vs. IL-6, two-tailed unpaired Student's t-test.





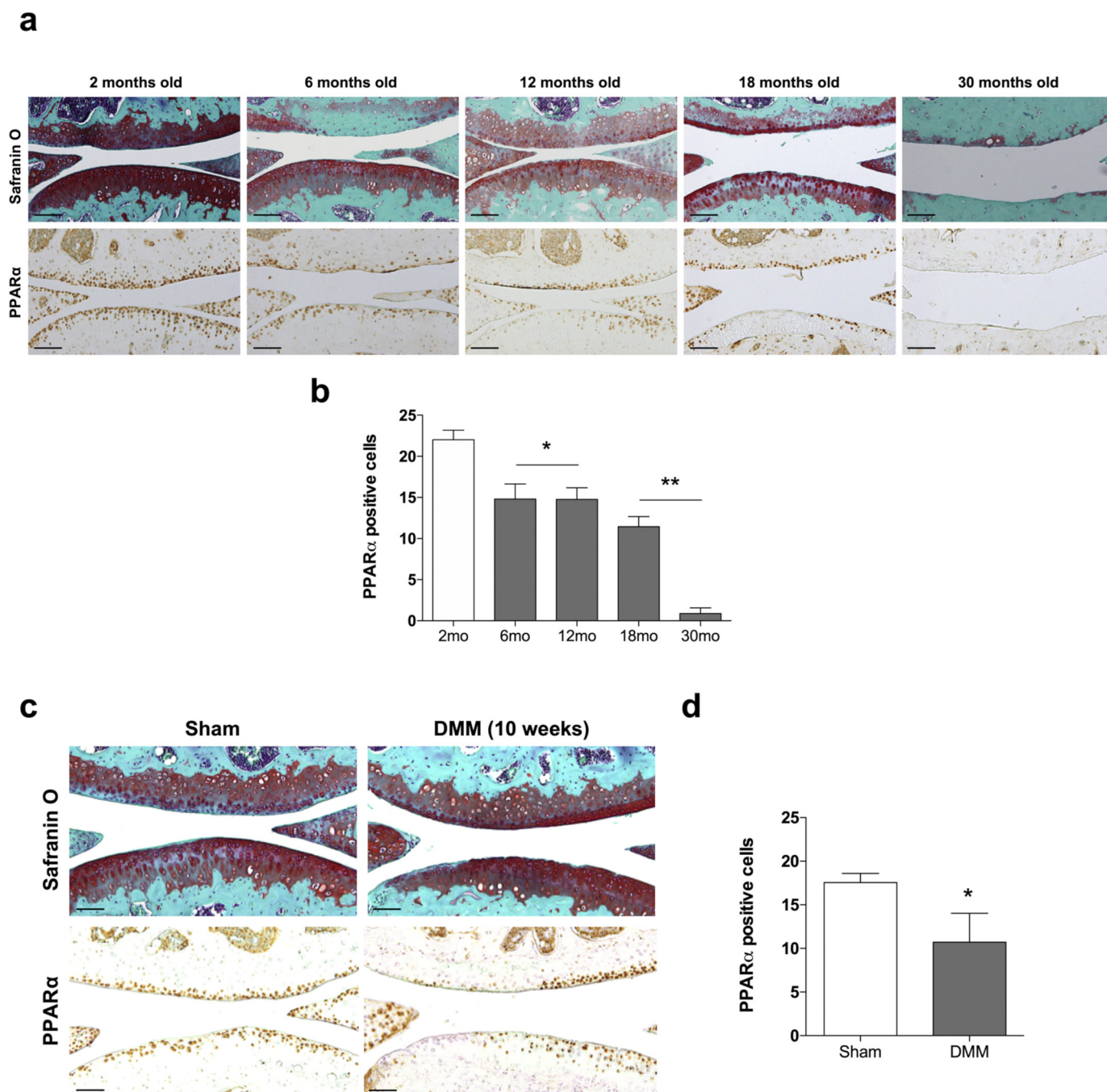


**Fig. 8.** FN increases PPAR $\alpha$  expression and regulates  $\beta$ -oxidation in human chondrocytes. a. Relative expression of PPAR $\alpha$  in T/C28a2 human chondrocytes untreated or treated with FN (10, 50  $\mu$ M) for 24 h. Values are mean  $\pm$  SEM of 3 independent observations, \* $p$  < .05 vs. Ctrl, two-tailed unpaired Student's t-test. b. Western blot and densitometric analysis of PPAR $\alpha$  expression in human OA primary chondrocytes treated with FN (10, 50  $\mu$ M) for 24 h. Values are mean  $\pm$  SEM of 3 human donors, \* $p$  < .05 vs. Ctrl, two-tailed unpaired Student's t-test.  $\alpha$ -tubulin was employed as a loading control. c. Relative expression of ACOX1 in T/C28a2 human chondrocytes untreated or treated with PPAR $\alpha$  agonists FN, CP and GW (10, 50  $\mu$ M) for 8 and 24 h. Values are mean  $\pm$  SEM of 3 independent observations (8 h: \* $p$  < .05 vs. Ctrl, two-tailed unpaired Student's t-test; 24 h: \* $p$  < .001 vs. Ctrl, two-tailed unpaired Student's t-test). d. Relative expression of CPT1A in T/C28a2 human chondrocytes untreated or treated with PPAR $\alpha$  agonists FN, CP and GW (10, 50  $\mu$ M) for 8 and 24 h. Values are mean  $\pm$  SEM of 3 independent observations (8 h: \* $p$  < .05 vs. Ctrl, two-tailed unpaired Student's t-test; 24 h: \* $p$  < .01, \*\* $p$  < .01, \*\*\* $p$  < .001 vs. Ctrl, two-tailed unpaired Student's t-test).

were taking fenofibrate (FN), ten users (28.6%) were taking gemfibrozil, and one user was initially taking gemfibrozil and then switched to FN. Furthermore, during the follow-up there were 3 (4.3% of the knees) total knee replacements in the fibrate user group and 7 (11.4% of the knees) in the matched control group, respectively. Interestingly, the results indicate that fibrate use by time interaction was associated with a

statistically significant improvement of WOMAC function and WOMAC total scores. There was also a trend towards a decrease in WOMAC pain score. The results suggest that the fibrate use, when compared with non-use, was associated with an average yearly decrease in WOMAC function grade by 1.15 and WOMAC total score by 1.6, as reflected by  $\beta$ -coefficients of 1.15 and 1.6, respectively (Fig. 10d).

**Fig. 7.** FN regulates senescence, autophagy and cartilage degradation in human chondrocytes and cartilage. a. Safranin O-stained sections representative of  $n$  = 3 human ageing cartilage donors treated with FN (10, 50  $\mu$ M), IL-1 $\beta$  (5 ng/ml) or in combination for 72 h. Scale bar, 10  $\mu$ m. b. Nitric oxide (NO) production into supernatants from human ageing chondrocytes treated with FN (10, 50  $\mu$ M), IL-1 $\beta$  (5 ng/ml) or in combination for 24 h. Values are mean  $\pm$  SEM of  $n$  = 5 human donors. \* $p$  < .05 vs. IL-1 $\beta$ , \*\* $p$  < .05 vs. Ctrl, two-tailed unpaired Student's t-test. c. Western blot and densitometric analysis of p21, prbS6 and NF $\kappa$ B expression in human OA primary chondrocytes treated with FN (10, 50  $\mu$ M) for 24 h.  $\alpha$ -tubulin was employed as a loading control. Values are mean  $\pm$  SEM of  $n$  = 3 human donors for p21 and  $n$  = 4 human donors for prbS6 and NF $\kappa$ B, \* $p$  < .05 vs. Ctrl, two-tailed unpaired Student's t-test. d. Western blot and densitometric analysis of p16, p21, LC3II, prbS6 and NF $\kappa$ B expression in human ageing primary chondrocytes treated with FN (10, 50  $\mu$ M) for 24 h.  $\alpha$ -tubulin was employed as a loading control. Values are mean  $\pm$  SEM of  $n$  = 6 human donors for p16 and p21;  $n$  = 5 for LC3 and prbS6, \* $p$  < .05 vs. Ctrl;  $n$  = 4 for NF $\kappa$ B, \* $p$  < .01 vs. Ctrl, two-tailed unpaired Student's t-test. e-i, Relative expression of PPAR $\alpha$ , p21, LC3, FOXO1 and NF $\kappa$ B, in T/C28a2 human chondrocytes subjected to genetic deletion of PPAR $\alpha$ . Values are mean  $\pm$  SEM. PPAR $\alpha$ : \* $p$  < .05,  $n$  = 3 independent observations, p21: \* $p$  < .05,  $n$  = 4 independent observations, LC3: \* $p$  < .05,  $n$  = 3 independent observations, FOXO1: \* $p$  < .01,  $n$  = 6, NF $\kappa$ B: \* $p$  < .05,  $n$  = 4 independent observations vs. Mock, two-tailed unpaired Student's t-test.

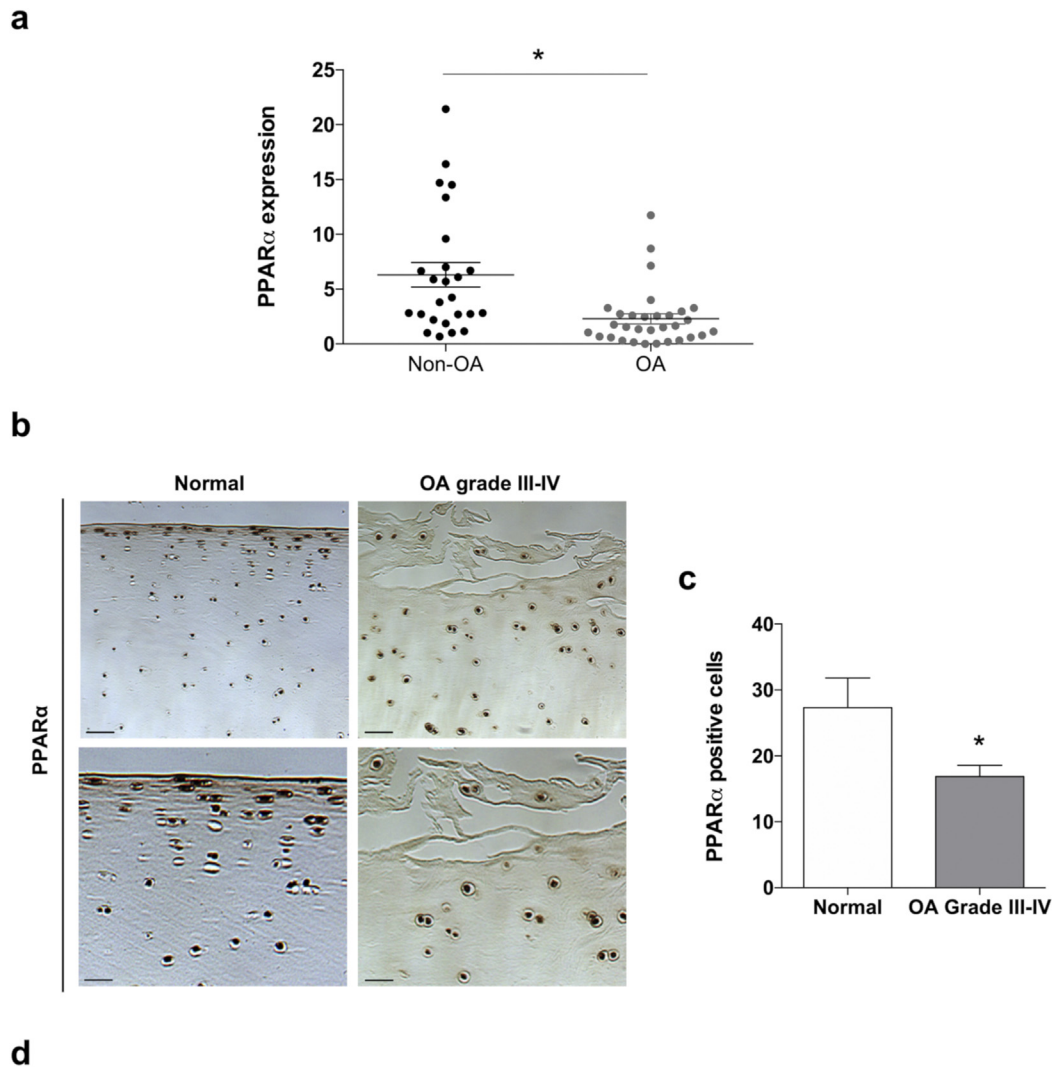


**Fig. 9.** PPAR $\alpha$  is downregulated with ageing and OA in mice. **a.** Knee joint sections from C57Bl6/J were analysed by immunohistochemistry for PPAR $\alpha$ . Representative images of knee joints from 2, 6, 12, 18 and 30-month-old mice stained with Safranin O-Fast Green and PPAR $\alpha$ . Scale bar, 10  $\mu$ m. **b.** Quantitative analysis of PPAR $\alpha$ -positive cells. Values are the mean  $\pm$  SEM of 3 mice per group. \* $p < .05$ ; \*\* $p < .0001$  vs. 2-month-old mice, two-tailed unpaired Student's t-test. **c.** Reduction in PPAR $\alpha$  expression in knee joints from mice with surgically induced osteoarthritis (OA). Knee joints from 6-month-old C57Bl/6 J mice that underwent sham surgery and from mice 10 weeks after surgical OA induced by transection of the medial meniscotibial ligament and the medial collateral ligament (DMM), analysed using Safranin O staining for expression of PPAR $\alpha$ . Scale bar, 10  $\mu$ m. **d.** Quantification of PPAR $\alpha$ -positive cells. Values are the mean  $\pm$  SEM of 4 mice per group. \* $p < .05$  vs. Sham, two-tailed unpaired Student's t-test. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

#### 4. Discussion

Disease-modifying therapeutic agents to prevent or stop progression of OA are an urgent clinical need. Recent data support that selective targeting of senescent chondrocytes with small molecules is an effective therapy in preclinical models of OA [14]. Activation of autophagy prevents against chondrocyte death, cartilage ageing and OA [21,22]. We hypothesized that simultaneously targeting senescence and autophagy in chondrocytes might be a useful strategy to identify therapeutic agents for joint ageing and OA. Here, we have identified PPAR $\alpha$

activation as a dual senolytic / autophagy enhancing strategy by using a human chondrocyte cell-based phenotypic screening assay. Senescence was induced by treatment with SASP factor IL-6 [53], increasing SA- $\beta$ -Gal activity and p21 expression, while decreasing autophagic flux and inducing the mTOR signalling pathway. Paracrine exposure of chondrocytes to IL-6 likely resembles some of the early ageing and cartilage degeneration signalling events which were considered key in OA development. These results also suggest an interesting homeostatic imbalance, whereby IL-6-induced inflammation and senescence is accompanied by decreased autophagy in chondrocytes. This observation



**Table 2. Longitudinal analysis (with treatment\* interaction) of WOMAC subcategories and fibrates use**

WOMAC index	$\beta$ -coefficient	95% CI	Pvalue
WOMAC Pain	-0.3	-0.63 to -0.035	0.08
WOMAC Function	-1.15	-2.1 to -0.2	0.018
WOMAC Stiffness	-0.07	-0.23 to 0.1	0.43
WOMAC Total	-1.6	-2.93 to -0.21	0.024

WOMAC, Western Ontario and McMaster Universities OA index; CI, 95% confidence interval

**Fig. 10.** PPAR $\alpha$  is downregulated in blood and cartilage from OA patients. a. Relative expression of PPAR $\alpha$  in blood from non-OA and OA patients from OA cohort, PROCOAC. Values are mean  $\pm$  SEM of  $n = 25$  non-OA patients and  $n = 30$  Knee OA patients, \* $p < .001$  vs. non-OA, two-tailed unpaired Student's t-test. b. Human Normal and OA cartilage was analysed by immunohistochemistry for PPAR $\alpha$ . Representative images of normal and OA cartilage stained with PPAR $\alpha$ . Scale bar, 10  $\mu$ m. c. Quantitative analysis of PPAR $\alpha$ -positive cells. Values are the mean  $\pm$  SEM of  $n = 5$  human donors per group. \* $p < .05$  vs. normal, two-tailed unpaired Student's t-test. d. Longitudinal analysis (with treatment\* time interaction) of WOMAC subcategories and fibrates use.

reflects a complex interplay between elevated senescence and decreased autophagy that can promote cartilage disease.

Our cell-based screening assay yielded a number of drugs with different mechanism of actions potentially interacting with OA pathogenesis pathways. A number of ion channels and pumps disruptors were identified. Since hormones, growth factors, cytokines, and eicosanoids are critical signals for maintenance of chondrocyte homeostasis, the PPAR $\alpha$  nuclear receptor was of prime interest because is an established modulator of lipid metabolism and its role in the inflammatory mechanism can explain the positive impact in cartilage homeostasis [54,55].

Indeed, it has been demonstrated that PPAR $\gamma$  has a protective role in articular cartilage. Cartilage-specific PPAR $\gamma$  deficient mice showed increased apoptosis as well as production of inflammatory and catabolic factors, and a decreased expression of anabolic factors, overall resulting in accelerated OA [56,57]. Here, we have demonstrated that the PPAR $\alpha$  agonist fenofibrate (FN) significantly reduced chondrocyte senescence and induced autophagic flux significantly, indicating a partial reversion of the chondrocyte age-related phenotype.

Our results demonstrate that PPAR $\alpha$  ligands selectively eliminate senescent chondrocytes *via* cell death through apoptosis [4]. In addition,

PPAR $\alpha$  agonists induced autophagic flux, mediated by a related increase in cell homeostasis markers, such as LC3 and FoxO1. Moreover, treating OA and ageing chondrocytes with fenofibrate results in abrogation of the active, phosphorylated form of the mTOR effector S6 Ribosomal Protein. Senescent cells are prone to anti-apoptotic signals and show irreversible proliferative arrest [58]. Downregulation of this proliferation pathway may contribute to the senolytic activity of PPAR $\alpha$  ligands, however, further work using PPAR $\alpha$  ligands is required to establish how nuclear receptor signalling remodels cartilage metabolism and the full range of signalling it regulates.

To investigate the relevance of PPAR $\alpha$  as a therapeutic target, we explore whether its genetic deletion could affect critical chondrocyte survival mechanisms. We found that PPAR $\alpha$  deficient human chondrocytes were susceptible to senescence, increased expression of inflammation mediators and to changes in homeostasis by a reduction of FoxO1 expression and an increase in LC3, which might act as a regulator of lipid signals influencing homeostasis. These results highlight the importance of PPAR $\alpha$  in maintenance of chondrocyte homeostasis.

Since PPAR $\alpha$  regulates peroxisomal and mitochondrial fatty acid  $\beta$ -oxidation [59], the effect of PPAR $\alpha$  agonists in human chondrocytes also was evaluated. The results showed an increase in expression of CPT1A expression, a target gene of PPAR $\alpha$  [60], suggesting that these ligands regulate mitochondrial fatty acid  $\beta$ -oxidation in human chondrocytes. These results are consistent with a positive remodelling of cartilage metabolism that protects against ageing and disease signals.

PPAR $\alpha$  was found to be downregulated in spontaneous ageing-related and surgically induced OA mouse models, as well as in blood and cartilage from patients with knee OA, indicating an intrinsic OA-related PPAR $\alpha$  defect. Importantly, pharmacological activation of PPAR $\alpha$  by fibrate treatment in human OA patients was associated with a significant decrease in progressive disability and a trend towards a decrease in knee pain. There were fewer joint replacement surgeries in patients taking fibrates. These findings are in line with an open label study performed on patients with erosive hand OA where FN use for 12 weeks was associated with significant improvements in the Cochin hand functional disability scale [61]. In another exploratory study carried out through the OAI database, neither reduced radiographic progression nor reduction in worsening of pain in participants taking fibrates were detected. The authors did not assess the effects of fibrates on disability and used a prevalent user design (*i.e.* included participants who used fibrates at baseline) [62] that may be associated with bias [63] and may account for the non-detection of fibrate effect on pain. It is difficult to interpret the dissociation of fibrate effects on disability and pain found in this analysis as pain and functional limitation in knee OA are closely related [64]. As anxiety has been shown to be one of the determinants of functioning in knee OA [65], one of the explanations of the reduction in disability found in the present study may be the observed emerging anxiolytic effects of PPAR $\alpha$  agonism [66]. On the other hand, the lack of association between fibrate use and pain reduction may be due to absence of analgesic properties of PPAR $\alpha$  agonists or may be due to reduced statistical power caused by small sample size.

These clinical findings support the hypothesis that fibrates may improve joint function in human OA patients and encourage further prospective and conclusive studies to demonstrate the value of fibrates as disease modifying OA therapy.

In conclusion, regulation of lipid metabolism by PPAR $\alpha$  can be considered as a potential therapeutic target for OA.

## Acknowledgements

We thank the staff of the Orthopedic Department of the Complejo Hospitalario Universitario A Coruña for providing the cartilage samples. Furthermore, we thank Tamara Hermida and Merissa Olmer for technical assistance and Richard Roberts for editing the revised manuscript in British English.

The OAI is a public-private partnership comprising five contracts (N01-AR-2-2258; N01-AR-2-2259; N01-AR-2-2260; N01-AR-2-2261; N01-AR-2-2262) funded by the National Institutes of Health, a branch of the Department of Health and Human Services, and conducted by the OAI Study Investigators. Private funding partners include Merck Research Laboratories, Novartis Pharmaceuticals Corporation, GlaxoSmithKline and Pfizer, Inc. Private sector funding for the OAI is managed by the Foundation for the National Institutes of Health. This manuscript was prepared using an OAI public use data set and does not necessarily reflect the opinions or views of the OAI investigators, the NIH or the private funding partners.

## Funding sources

This study was supported by Instituto de Salud Carlos III- Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades, Spain, Plan Estatal 2013-2016 and Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER), “Una manera de hacer Europa”, PI14/01324 and PI17/02059, by Innopharma Pharmacogenomics platform applied to the validation of targets and discovery of drugs candidates to preclinical phases, Ministerio de Economía y Competitividad, by grants of the National Institutes of Health to PDR (P01 AG043376 and U19 AG056278). We thank the FOREUM Foundation for Research in Rheumatology for their support. UNR was supported by Programa Operativo FSE Galicia 2014–2020, Xunta de Galicia, Spain, BC was supported by Miguel Servet Type II Program-CPII16/00045-A, Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades, Spain. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

## Conflicts of interest

The authors have declared no potential conflicts of interest.

## Author's contributions

All authors approved the final version to be published.

Concept and design: Domínguez, Caramés.

Performed the experiments: Nogueira-Recalde, Lorenzo-Gómez, Grassi, Domínguez, Caramés.

Data analysis and interpretation: Nogueira-Recalde, Domínguez, Caramés.

Writing and review of Manuscript: Nogueira-Recalde, Blanco, Loza, Shirinsky, Lotz, Robbins, Domínguez and Caramés.

## Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2019.06.049>.

## References

- [1] Lopez-Otin C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G. The hallmarks of aging. *Cell* 2013;153(6):1194–217.
- [2] Lotz MK, Carames B. Autophagy and cartilage homeostasis mechanisms in joint health, aging and OA. *Nat Rev Rheumatol* 2011;7(10):579–87.
- [3] Wang R, Yu Z, Sunchu B, et al. Rapamycin inhibits the secretory phenotype of senescent cells by a Nrf2-independent mechanism. *Aging Cell* 2017;16(3):564–74.
- [4] van Deursen JM. The role of senescent cells in ageing. *Nature* 2014;509(7501):439–46.
- [5] Baker DJ, Childs BG, Durik M, et al. Naturally occurring p16(Ink4a)-positive cells shorten healthy lifespan. *Nature* 2016;530(7589):184–9.
- [6] Xu M, Pirtskhalava T, Farr JN, et al. Senolytics improve physical function and increase lifespan in old age. *Nat Med* 2018;24(8):1246–56.
- [7] Campisi J. Aging and cancer: the double-edged sword of replicative senescence. *J Am Geriatr Soc* 1997;45(4):482–8.
- [8] Abramson SB, Attur M, Amin AR, Clancy R. Nitric oxide and inflammatory mediators in the perpetuation of osteoarthritis. *Curr Rheumatol Rep* 2001;3(6):535–41.

- [9] Zhou HW, Lou SQ, Zhang K. Recovery of function in osteoarthritic chondrocytes induced by p16INK4a-specific siRNA in vitro. *Rheumatology (Oxford)* 2004;43(5):555–68.
- [10] Price JS, Waters JG, Darrah C, et al. The role of chondrocyte senescence in osteoarthritis. *Aging Cell* 2002;1(1):57–65.
- [11] Benderdour M, Martel-Pelletier J, Pelletier JP, Kapoor M, Zunzunegui MV, Fahmi H. Cellular aging, senescence and autophagy processes in osteoarthritis. *Curr Aging Sci* 2015;8(2):147–57.
- [12] Diekmann BO, Sessions GA, Collins JA, et al. Expression of p16(INK)(4a) is a biomarker of chondrocyte aging but does not cause osteoarthritis. *Aging Cell* Aug 2018;17(4):e12771.
- [13] Xu M, Bradley EW, Weivoda MM, et al. Transplanted senescent cells induce an osteoarthritis-like condition in mice. *J Gerontol Series A* 2017;72(6):780–5.
- [14] Jeon OH, Kim C, Laberge RM, et al. Local clearance of senescent cells attenuates the development of post-traumatic osteoarthritis and creates a pro-regenerative environment. *Nat Med* 2017;23(6):775–81.
- [15] Musumeci G, Castrogiovanni P, Trovato FM, et al. Physical activity ameliorates cartilage degeneration in a rat model of aging: a study on lubricin expression. *Scand J Med Sci Sports* 2015;25(2):e222–30.
- [16] Justice JN, Nambiar AM, Tchkonja T, et al. Senolytics in idiopathic pulmonary fibrosis: results from a first-in-human, open-label, pilot study. *EBioMedicine* 2019;40:554–63.
- [17] Ogrodnik M, Salmonowicz H, Gladyshev VN. Integrating cellular senescence with the concept of damage accumulation in aging: relevance for clearance of senescent cells. *Aging Cell* 2019;18(1):e12841.
- [18] Mobasher A, Matta C, Zakany R, Musumeci G. Chondrosenescence: definition, hallmarks and potential role in the pathogenesis of osteoarthritis. *Maturitas* 2015;80(3):237–44.
- [19] Musumeci G, Szychlińska MA, Mobasher A. Age-related degeneration of articular cartilage in the pathogenesis of osteoarthritis: molecular markers of senescent chondrocytes. *Histol Histopathol* 2015;30(1):1–12.
- [20] Vinatier C, Dominguez E, Guicheux J, Carames B. Role of the inflammation-autophagy-senescence integrative network in osteoarthritis. *Front Physiol* 2018;9:706.
- [21] Carames B, Taniguchi N, Otsuki S, Blanco FJ, Lotz M. Autophagy is a protective mechanism in normal cartilage, and its aging-related loss is linked with cell death and osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 2010;62(3):791–801.
- [22] Carames B, Olmer M, Kiosses WB, Lotz MK. The relationship of autophagy defects to cartilage damage during joint aging in a mouse model. *Arthritis Rheumatol (Hoboken, NJ)* 2015;67(6):1568–76.
- [23] Kroemer G. Autophagy: a druggable process that is deregulated in aging and human disease. *J Clin Invest* 2015;125(1):1–4.
- [24] Leidal AM, Levine B, Debnath J. Autophagy and the cell biology of age-related disease. *Nat Cell Biol* 2018;20(12):1338–48.
- [25] Maiuri MC, Kroemer G. Therapeutic modulation of autophagy: which disease comes first? *Cell Death Differ* 2019;26(4):680–9.
- [26] Matsuzaki T, Alvarez-Garcia O, Mokuda S, et al. FoxO transcription factors modulate autophagy and proteoglycan 4 in cartilage homeostasis and osteoarthritis. *Sci Transl Med* 2018;10(428).
- [27] Zhang Z, Yao Z, Zhao S, et al. Interaction between autophagy and senescence is required for dihydroartemisinin to alleviate liver fibrosis. *Cell Death Dis* 2017;8(6):e2886.
- [28] Fuhrmann-Stroissnigg H, Ling YY, Zhao J, et al. Identification of HSP90 inhibitors as a novel class of senolytics. *Nat Commun* 2017;8(1):422.
- [29] Coleman DT, Gray AL, Stephens CA, Scott ML, Cardelli JA. Repurposed drug screen identifies cardiac glycosides as inhibitors of TGF-beta-induced cancer-associated fibroblast differentiation. *Oncotarget* 2016;7(22):32200–9.
- [30] Druzhyna N, Szczesny B, Olah G, et al. Screening of a composite library of clinically used drugs and well-characterized pharmacological compounds for cystathionine beta-synthase inhibition identifies beraprost as a drug potentially suitable for repurposing for the experimental therapy of colon cancer. *Pharmacol Res* 2016;113:18–37 Pt A.
- [31] Varbanov HP, Kuttler F, Banfi D, Turcatti G, Dyson PJ. Repositioning approved drugs for the treatment of problematic cancers using a screening approach. *PLoS One* 2017;12(2):e0171052.
- [32] Hulsmans M, Geeraert B, Arnould T, Tsatsanis C, Holvoet P. PPAR agonist-induced reduction of Mcp1 in atherosclerotic plaques of obese, insulin-resistant mice depends on adiponectin-induced Irak3 expression. *PLoS One* 2013;8(4):e62253.
- [33] Goldring MB, Birkhead JR, Suen LF, et al. Interleukin-1 beta-modulated gene expression in immortalized human chondrocytes. *J Clin Invest* 1994;94(6):2307–16.
- [34] Fernandez-Moreno M, Soto-Hermida A, Vazquez-Mosquera ME, et al. A replication study and meta-analysis of mitochondrial DNA variants in the radiographic progression of knee osteoarthritis. *Rheumatology (Oxford)* 2017;56(2):263–70.
- [35] Zhang JH, Chung TD, Oldenburg KR. A simple statistical parameter for use in evaluation and validation of high throughput screening assays. *J Biomol Screen* 1999;4(2):67–73.
- [36] Gump JM, Thorburn A. Sorting cells for basal and induced autophagic flux by quantitative ratiometric flow cytometry. *Autophagy* 2014;10(7):1327–34.
- [37] Ribeiro M, Lopez de Figueroa P, Blanco FJ, Mendes AF, Carames B. Insulin decreases autophagy and leads to cartilage degradation. *Osteoarthr Cartil* 2016;24(4):731–9.
- [38] Glasson SS, Chambers MG, Van Den Berg WB, Little CB. The OARSI histopathology initiative - recommendations for histological assessments of osteoarthritis in the mouse. *Osteoarthr Cartil* 2010;18(Suppl. 3):S17–23.
- [39] Taniguchi N, Carames B, Ronfani L, et al. Aging-related loss of the chromatin protein HMGB2 in articular cartilage is linked to reduced cellularity and osteoarthritis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106(4):1181–6.
- [40] Washburn RA, Smith KW, Jette AM, Janney CA. The physical activity scale for the elderly (PASE): development and evaluation. *J Clin Epidemiol* 1993;46(2):153–62.
- [41] Bellamy N, Buchanan WW, Goldsmith CH, Campbell J, Stitt LW. Validation study of WOMAC: a health status instrument for measuring clinically important patient relevant outcomes to antirheumatic drug therapy in patients with osteoarthritis of the hip or knee. *J Rheumatol* 1988;15(12):1833–40.
- [42] Pahor M, Chrischilles EA, Guralnik JM, Brown SL, Wallace RB, Carbonin P. Drug data coding and analysis in epidemiologic studies. *Eur J Epidemiol* 1994;10(4):405–11.
- [43] Diamond A, Sekhon JS. Genetic matching for estimating causal effects: a general multivariate matching method for achieving balance in observational studies. *Rev Econ Stat* 2013;95(3):932–45.
- [44] Stuart EA. Matching methods for causal inference: a review and a look forward. *Stat Sci* 2010;25(1):1–21.
- [45] Austin PC. Balance diagnostics for comparing the distribution of baseline covariates between treatment groups in propensity-score matched samples. *Stat Med* 2009;28(25):3083–107.
- [46] Twisk J, de Vente W. Attrition in longitudinal studies. How to deal with missing data. *J Clin Epidemiol* 2002;55(4):329–37.
- [47] Ho DE, Imai K, King G, Stuart EA. MatchIt: nonparametric preprocessing for parametric causal inference. *J Stat Softw* 2011;42(8).
- [48] Carey Vincent J. Gee: Generalized estimation equation solver. <https://CRAN.R-project.org/package=gee>; 2015.
- [49] Milanovic M, Fan DNY, Belenki D, et al. Senescence-associated reprogramming promotes cancer stemness. *Nature* 2018;553(7686):96–100.
- [50] Xie X, Hu H, Tong X, et al. The mTOR-S6K pathway links growth signaling to DNA damage response by targeting RNF168. *Nat Cell Biol* 2018;20(3):320–31.
- [51] Yousefzadeh MJ, Zhu Y, McGowan SJ, et al. Fisetin is a senotherapeutic that extends health and lifespan. *EBioMedicine* Oct 2018;36:18–28.
- [52] Tyagi S, Gupta P, Saini AS, Kaushal C, Sharma S. The peroxisome proliferator-activated receptor: a family of nuclear receptors role in various diseases. *J Adv Pharm Technol Res* 2011;2(4):236–40.
- [53] Kojima H, Inoue T, Kunimoto H, Nakajima K. IL-6-STAT3 signaling and premature senescence. *Jak-stat* 2013;2(4):e25763.
- [54] Narala VR, Adapala RK, Suresh MV, Brock TG, Peters-Golden M, Reddy RC. Leukotriene B4 is a physiologically relevant endogenous peroxisome proliferator-activated receptor-alpha agonist. *J Biol Chem* 2010;285(29):22067–74.
- [55] Clockaerts S, Bastiaansen-Jenniskens YM, Feijt C, et al. Peroxisome proliferator activated receptor alpha activation decreases inflammatory and destructive responses in osteoarthritic cartilage. *Osteoarthr Cartil* 2011;19(7):895–902.
- [56] Vasheghani F, Monemdjou R, Fahmi H, et al. Adult cartilage-specific peroxisome proliferator-activated receptor gamma knockout mice exhibit the spontaneous osteoarthritis phenotype. *Am J Pathol* 2013;182(4):1099–106.
- [57] Vasheghani F, Zhang Y, Li YH, et al. PPARgamma deficiency results in severe, accelerated osteoarthritis associated with aberrant mTOR signalling in the articular cartilage. *Ann Rheum Dis* 2015;74(3):569–78.
- [58] Kirkland JL, Tchkonja T. Cellular senescence: a translational perspective. *EBioMedicine* 2017;21:21–8.
- [59] Mascaro C, Acosta E, Ortiz JA, Marrero PF, Hegardt FG, Haro D. Control of human muscle-type carnitine palmitoyltransferase I gene transcription by peroxisome proliferator-activated receptor. *J Biol Chem* 1998;273(15):8560–3.
- [60] Xiao Y, Wang J, Yan W, Zhou K, Cao Y, Cai W. p38alpha MAPK antagonizing JNK to control the hepatic fat accumulation in pediatric patients onset intestinal failure. *Cell Death Dis* 2017;8(10):e3110.
- [61] Shirinsky IV, Shirinsky VS. Treatment of erosive osteoarthritis with peroxisome proliferator-activated receptor alpha agonist fenofibrate: a pilot study. *Rheumatol Int* 2014;34(5):613–6.
- [62] Driban JB, Lo GH, Eaton CB, et al. Exploratory analysis of osteoarthritis progression among medication users: data from the osteoarthritis initiative. *Ther Adv Musculoskelet Dis* 2016;8(6):207–19.
- [63] Ray WA. Evaluating medication effects outside of clinical trials: new-user designs. *Am J Epidemiol* 2003;158(9):915–20.
- [64] McAlindon TE, Cooper C, Kirwan JR, Dieppe PA. Determinants of disability in osteoarthritis of the knee. *Ann Rheum Dis* 1993;52(4):258–62.
- [65] Creamer P, Lethbridge-Cejku M, Hochberg MC. Factors associated with functional impairment in symptomatic knee osteoarthritis. *Rheumatology (Oxford)* 2000;39(5):490–6.
- [66] Nisbett KE, Pinna G. Emerging therapeutic role of PPAR-alpha in cognition and emotions. *Front Pharmacol* 2018;9:998.

## Supplementary Material

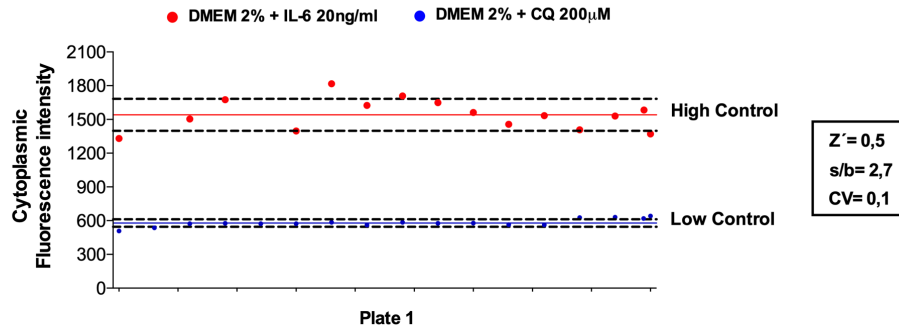
### Materials and Methods

**IMR90 lung fibroblasts.** Human IMR90 lung fibroblasts were obtained from American Type Culture Collection (ATCC®, Cat# CCL-186, RRID:CVCL 0347) and cultured in EMEM medium with 10% FBS, 1% P/S antibiotics and 1% Glutamax. To induce senescence, cells were treated for 48h with Etoposide (20  $\mu$ M). Two days after Etoposide removal, about 70% of IMR90 cells were SA- $\beta$ -Gal positive. Cells were treated for 48h with PPAR $\alpha$  agonists (Fenofibrate, CP775146, GW7647) at concentrations indicated and with navitoclax (2.5 $\mu$ M) and Rapamycin (200nM). The medium was removed and bafilomycin (100 nM) was added. Cells were incubated for 1h at 37°C. Then, C<sub>12</sub>FDG were added and incubated for 90 min at 37°C. Next, Bafilomycin and C<sub>12</sub>FDG were removed and Hoechst (2.5 $\mu$ l/ml) was added for 20min at 37°C. Finally, cells were washed with HBSS and resuspended in EMEM to read the fluorescence in IN Cell Analyzer. The percentage of SA- $\beta$ -Gal-positive cells was determined using C<sub>12</sub>FDG-based senescence assay.

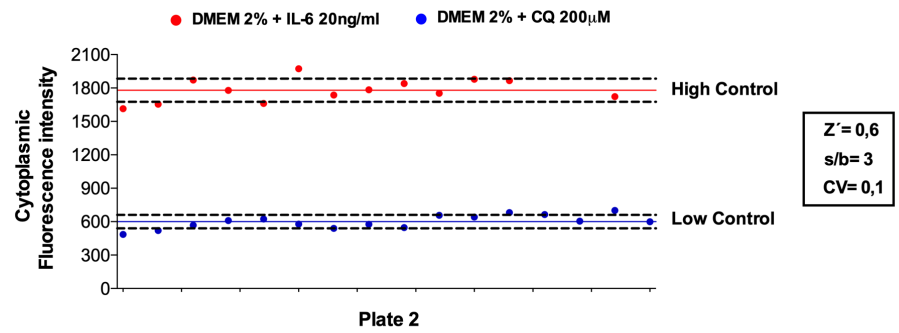
**Ercc1 deficient mice fibroblasts.** Ercc1 deficient mice (*Ercc1*<sup>-/-</sup>) fibroblasts (MEFs) are embryonic mouse fibroblasts with low repair capacity of DNA due to lack of DNA repair endonuclease Ercc1-XPF<sup>55</sup>. *Ercc1*<sup>-/-</sup> MEFs were provided by Paul D. Robbins (Institute on the Biology of Aging and Metabolism and Department of Biochemistry, Molecular Biology and Biophysics, University of Minnesota, Minneapolis, MN, USA). *Ercc1*<sup>-/-</sup> MEFs were cultured in a 1:1 mixture of Dulbecco's modified Eagle's medium and Ham's F10 with 10% fetal bovine serum, 1X nonessential amino acids, penicillin, and streptomycin and incubated at 3% O<sub>2</sub> initially, followed by a shift to 20 % for 5 passages to induce senescence<sup>56</sup>. Then, cells were treated for 48h with PPAR $\alpha$  agonists (CP775146, GW7647) at concentrations indicated and with Navitoclax (2.5 $\mu$ M) and Rapamycin (200nM) and incubated at 20% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub> and 37°C and the staining was carried out with the fluorescent substrate C<sub>12</sub>FDG. The medium was removed and Bafilomycin (100 nM) was added. Cells were incubated for 1h at 37°C. Then, C<sub>12</sub>FDG at 20 $\mu$ M were added and incubated for 30min at 37°C. Next, Bafilomycin and C<sub>12</sub>FDG were removed and Hoechst (2.5 $\mu$ l/ml) was added for 90min at 37°C. Finally, cell fluorescence was analyzed in IN Cell Analyzer.

# Figures

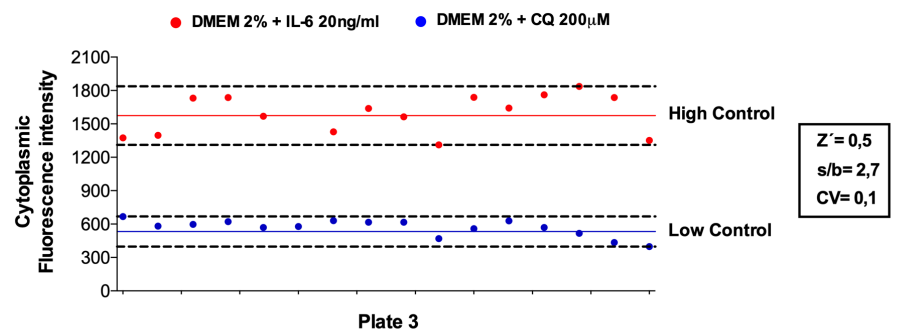
a



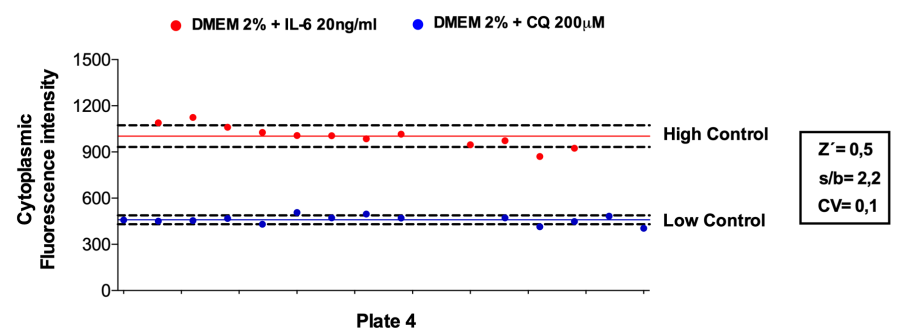
b



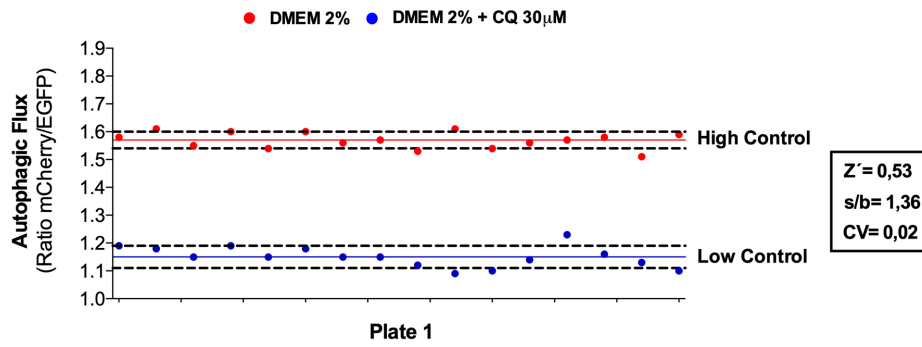
c



d

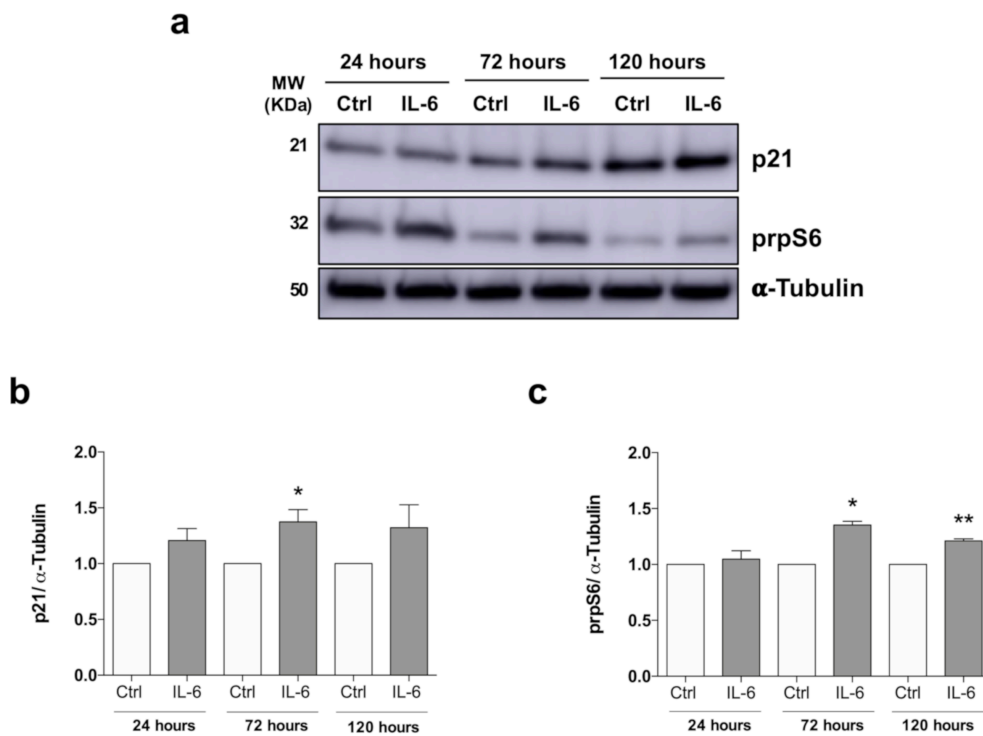


**Supplementary Fig. 1 Analysis of cell-based chondrocyte senescence assay quality.** Negative and positive controls are used to determine  $Z'$  factor. Signal to background (s/b) ratio and coefficient of variation (CV) for each plate.

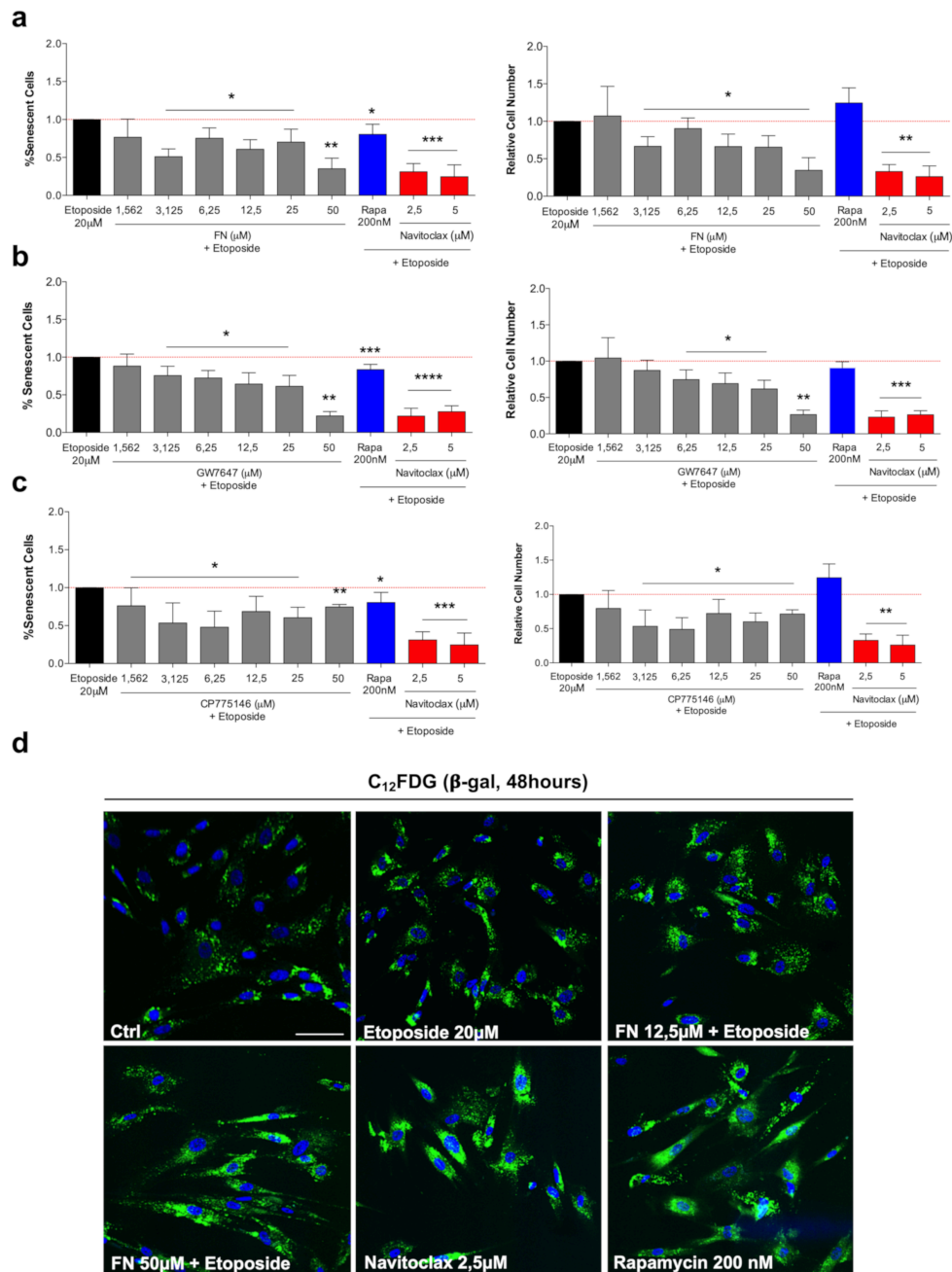


**Supplementary Fig. 2 Analysis of cell-based autophagic flux assay quality.** Negative and positive controls are used to determine  $Z'$  factor. Signal to background (s/b) ratio and coefficient of variation (CV) for each plate.

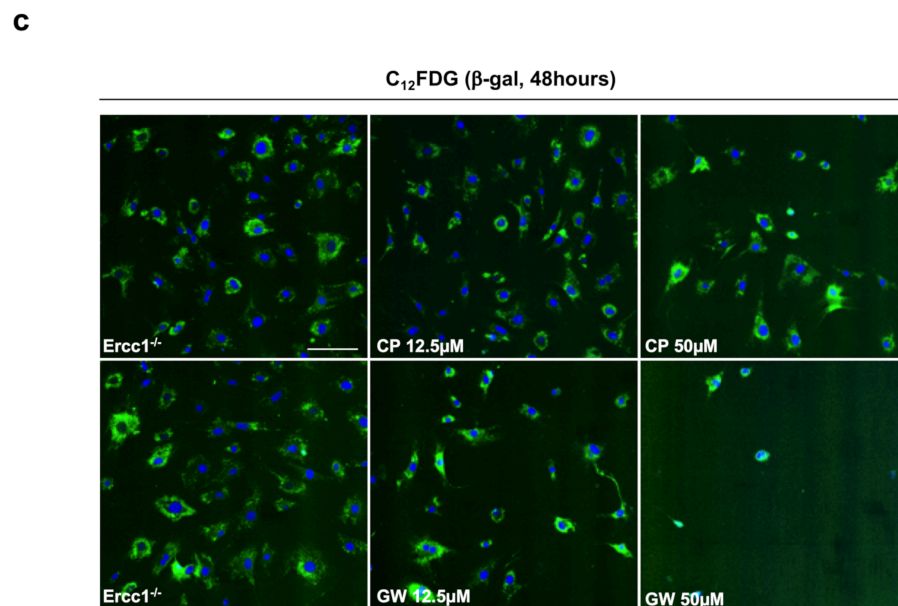
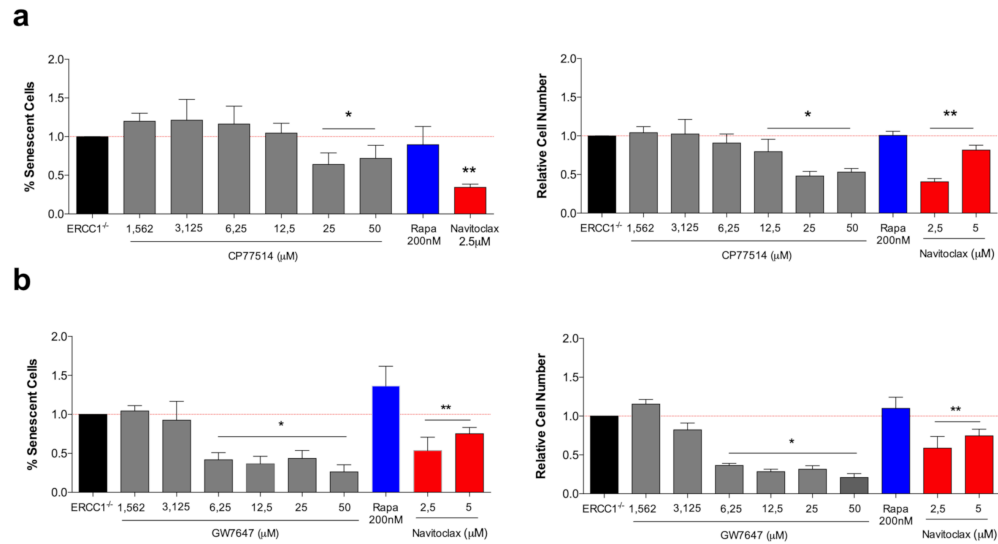




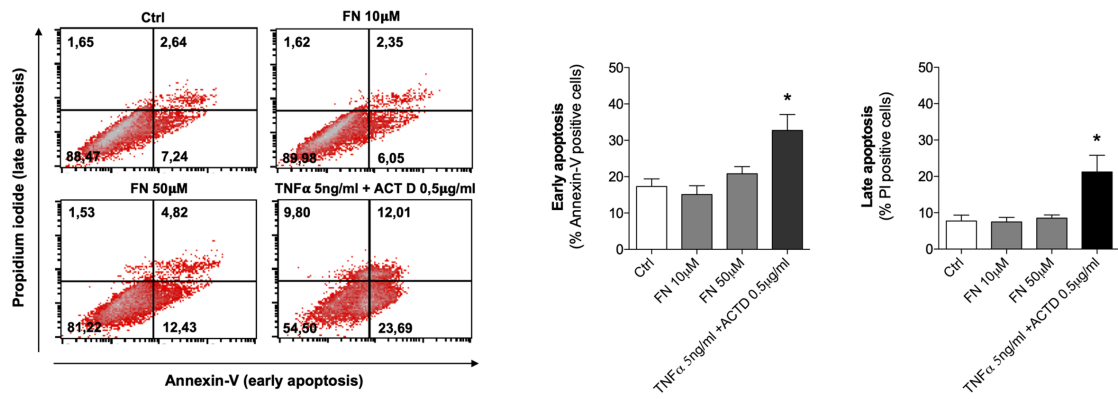
**Supplementary Fig. 3 IL-6 induces senescence and mTOR markers in human chondrocytes. a.** Western blot of p21 and prpS6 in T/C28a2 human chondrocytes treated with IL-6 (20ng/ml) for 24, 72 and 120h.  $\alpha$ -tubulin was employed as a loading control **b.** Densitometric analysis of p21. Values are mean  $\pm$  SEM of  $n=3$  independent experiments,  $*p < .001$  vs. *Ctrl 72h*, two-tailed unpaired Student's t-test. **c.** Densitometric analysis of prbS6. Values are mean  $\pm$  SEM of  $n=3$  independent experiments,  $*p < .001$  vs. *Ctrl 72h* and  $**p < .001$  vs. *Ctrl 120h*, two-tailed unpaired Student's t-test.



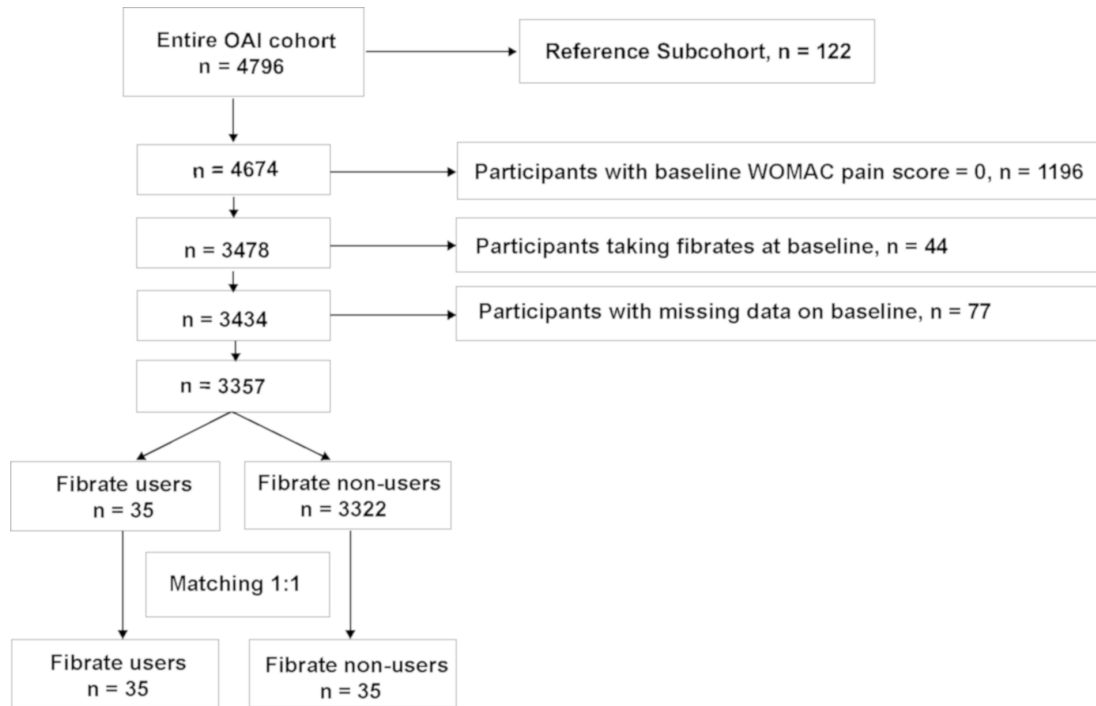
**Supplementary Fig. 4 PPAR $\alpha$  agonists are senolytics in IMR90 normal lung human cells.** **a.** IMR90 human cells were treated with Etoposide (20μM) and in combination with fenofibrate, FN (1,582-50μM), Rapa (200nM), or Navitoclax (2.5μM) for 48h. Relative senescence cells: values are mean  $\pm$  SEM of 4 well/condition, \* $p$  < .05, \*\* $p$  < .001, \*\*\* $p$  < .0001 vs. Etoposide. Relative cell number: values are mean  $\pm$  SEM of 4 well/condition, \* $p$  < .01, \*\* $p$  < .0001 vs. Etoposide, two-tailed unpaired Student's t-test. **b.** IMR90 human cells were treated with Etoposide (20μM) and in combination with GW7647, GW (1,582 - 50μM), Rapa (200nM), or Navitoclax (2.5 and 5μM) for 48h. Relative senescence cells: values are mean  $\pm$  SEM of 4 well/condition, \* $p$  < .01, \*\* $p$  < .0001, \*\*\* $p$  < .05 and \*\*\*\* $p$  < .0001 vs. Etoposide. Relative cell number: values are mean  $\pm$  SEM of 4 well/condition, \* $p$  < .01, \*\* $p$  < .001 and \*\*\* $p$  < .0001 vs. Etoposide, two-tailed unpaired Student's t-test. **c.** IMR90 human cells were treated with Etoposide (20μM) and in combination with CP775146, CP (1,582-50μM), Rapa (200nM), or Navitoclax (2.5 and 5μM) for 48h. Relative senescence cells: values are mean  $\pm$  SEM of 4 well/condition, \* $p$  < .01, \*\* $p$  < .001, \*\*\* $p$  < .0001 vs. Etoposide. Relative cell number: values are mean  $\pm$  SEM of 4 well/condition \* $p$  < .01, \*\* $p$  < .0001 vs. Etoposide, two-tailed unpaired Student's t-test. **d.** Representative images of SA-β-Gal activity from T/C28a2 human chondrocytes treated with FN in response to Etoposide treatment. Scale bar, 200μm.



**Supplementary Fig. 5 PPAR $\alpha$  agonists are senolytics in *Ercc1* deficient fibroblast.** **a.** *Ercc1*<sup>-/-</sup> MEFs were treated with CP775146, CP (1,582 - 50 μM), Rapa (200nM), or Navitoclax (2.5 μM) for 48h. Relative senescence cells: values are mean  $\pm$  SEM of 4 well/condition, \**p* < .01, \*\**p* < .0001 vs. *Ercc1*<sup>-/-</sup>. Relative cell number: values are mean  $\pm$  SEM of 4 well/condition, \**p* < .001, \*\**p* < .05 vs. *Ercc1*<sup>-/-</sup>, two-tailed unpaired Student's t-test. **b.** *Ercc1*<sup>-/-</sup> MEFs were treated with GW7647, GW (1,582 - 50 μM), Rapa (200 nM), or Navitoclax (2.5 μM) for 48h. Relative senescence cells: values are mean  $\pm$  SEM of 4 well/condition, \**p* < .001, \*\**p* < .05 vs. *Ercc1*<sup>-/-</sup>. Relative cell number: values are mean  $\pm$  SEM of 4 well/condition, \**p* < .0001, \*\**p* < .05 vs. *Ercc1*<sup>-/-</sup>, two-tailed unpaired Student's t-test. **c.** Representative images of SA-β-Gal activity from *Ercc1*<sup>-/-</sup> MEFs treated with CP and GW. Scale bar, 200 μm.



**Supplementary Fig. 6 Fenofibrate does not affect to chondrocyte viability.** Quantitative analysis of chondrocyte death by Annexin-V and PI staining in human aging chondrocytes treated with FN (10, 50 µM) and TNFα (5ng/ml) + Actinomycin D (0.5µg/ml) as positive control for apoptosis, for 18h in a 12 well plate human chondrocytes. Values are mean ± SEM of  $n=3$  human aging chondrocytes. \* $p < .05$  vs. *Ctrl*, two-tailed unpaired Student's t-test.



**Supplementary Fig. 7 Stratification of fibrate users from Osteoarthritis initiative (OAI) cohort.**

**Supplementary Table 1. Patient demographics and characteristics before and after group matching**

	Before matching			After matching		
	Fibrate users (n = 35)	Control (n=3322)	SMD	Fibrate users (n = 35)	Control (n=3322)	SMD
Age (years)	62,1429	61, 0135	0,1294	2,1429	62, 3429	-0,0229
BMI, Kg/m <sup>2</sup>	30,3657	29, 0563	0,3354	30,3657	30, 4114	-0,0117
Female	0,6286	0,3977	0,471	0,6286	0,6286	0
Male	0,3714	0,6023	-0,471	0,3714	0,3714	0
History of knee surgery	0,3714	0,2474	0,2529	0,3714	0,3714	0
WOMAC pain	5,7429	4,7562	0,2284	5,7429	5,6857	0,0132
WOMAC function	16,6311	14,3494	0,189	16,6311	16, 9363	-0,0253
WOMAC stiffness	3,2	2,5093	0,3919	3,2	3,2286	-0,0162
PASE	155,2575	159,8893	-0,0715	155,2575	156,2857	-0,0159

Data are presented as the mean (continuous variables), proportion (dichotomous variables); **SMD**, standardized mean difference; **BMI**, Body Mass Index; **PASE**, Physical Activity Scale for the Elderly; **WOMAC**, Western Ontario and McMaster Universities OA index; Possible ranges for WOMAC pain score are 0-20, possible ranges for WOMAC function score are 0-68, possible ranges for WOMAC stiffness are 0-8, possible ranges for PASE are 0-400.

