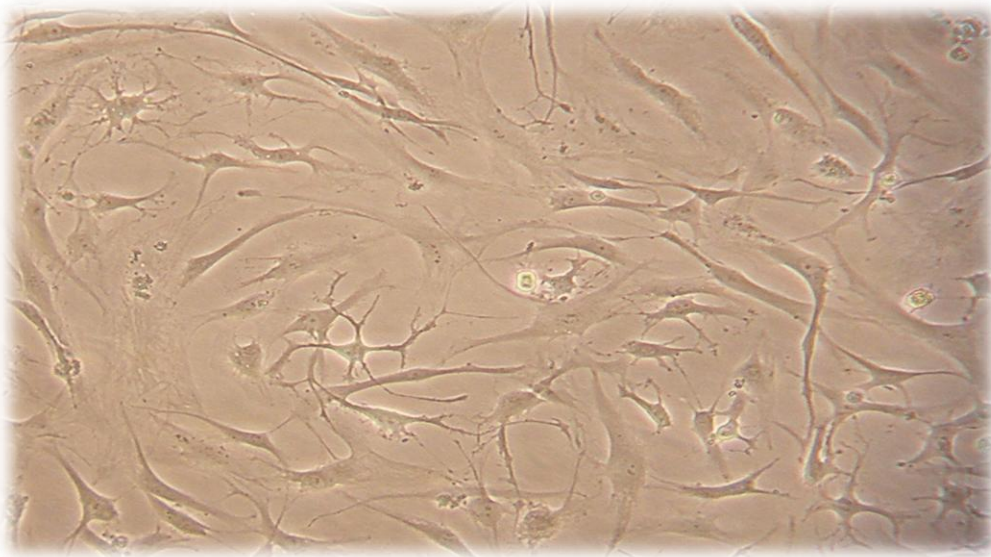


Efecto do silenciamento do factor de transcripción Nrf2 en células sinoviais humanas

Efecto del silenciamiento del factor de transcripción Nrf2 en células sinoviales humanas

Effect of Nrf2 transcription factor silencing in human synoviocytes



Jennifer Adriana Fernández Rodríguez

Trabajo de Fin de Grao

29 de julio de 2015

**Dirigido por | Dr. Antonio Manuel Castro Castro
Dra. María José López Armada**



Facultade de Ciencias
Departamento de Bioloxía Celular e Molecular
Area de Bioloxía Celular

**Efecto do silenciamento do factor de transcripción Nrf2 en células
sinoviais humanas**

**Efecto del silenciamiento del factor de transcripción Nrf2 en
células sinoviales humanas**

Effect of Nrf2 transcription factor silencing in human synoviocytes

Trabaja de Fin de Grado que presenta la alumna del Grado en Biología Jennifer Adriana Fernández Rodríguez bajo la dirección de D. Antonio Manuel Castro Castro y Dña. María José López Armada.

A Coruña, 22 de julio de 2015

Fdo. Antonio Manuel Castro Castro

Fdo. María José López Armada.

ÍNDICE

Resumen

Summary

1. Introducción	1
1.1. Cultivos celulares y sus aplicaciones en la actualidad	1
1.2. Sinoviocitos	1
1.3. Papel de los sinoviocitos en la artritis reumatoide	2
1.4. Factor de transcripción Nrf2	3
1.5. Silenciamiento de genes	6
2. Objetivos	7
3. Material y métodos	7
3.1. Obtención y cultivo primario de sinoviocitos humanos	7
3.2. Transfección nuclear	8
3.3. Cuantificación de proteínas	9
3.4. Western-blot	10
4. Resultados	11
4.1. Obtención y cultivo primario de sinoviocitos humanos	11
4.2. Transfección nuclear	12
4.3. Cuantificación de proteínas	13
4.5. Western-blot	13
5. Discusión	14
6. Conclusiones/ Conclusions	16
7. Agradecimientos	17
8. Bibliografía	17

RESUMEN

Las técnicas de cultivos celulares son herramientas fundamentales en múltiples investigaciones científicas dentro del campo de Ciencias de la Salud, de forma que permiten abrir nuevos frentes y alcanzar innumerables logros. Así, enfermedades como la artritis reumatoide (AR), caracterizadas por un importante componente inflamatorio que culmina en la destrucción tisular, pueden ser estudiadas en mayor profundidad, y ello permite el desarrollo de diagnósticos y terapias eficaces. El factor de transcripción Nrf2 se encuentra implicado en la respuesta anti-inflamatoria que tiene lugar cuando aumenta el estrés oxidativo durante el inicio y evolución de la artritis reumatoide, siendo el factor principal en la activación de genes de respuesta antioxidante. En el presente trabajo se estudiará cual es el efecto del silenciamiento artificial del factor de transcripción Nrf2 mediante interferencia por ARN (transfección). La transfección se llevará a cabo sobre un cultivo primario de células sinoviales humanas de paciente con patología AR utilizando un electroporador Amaxa, y se analizarán los efectos de la inhibición de Nrf2 en los homogenados de las células transfectadas empleando la técnica del Western-blot.

Palabras clave: Factor de transcripción Nrf2, Sinoviocitos, Artritis Reumatoide, Transfección nuclear, Silenciamiento, Western-blot.

SUMMARY

Cell culture techniques are essential tools in multiple scientific research within the field of Health Sciences, in this way, they allows us to open new frontiers and achieve many accomplishments. Thus, diseases such as rheumatoid arthritis, characterized by a significant inflammatory component that's culminates in tissue destruction, can be studied in more depth, and it allows us to carry out an effective diagnosis and therapy. The transcription factor Nrf2 is involved in the anti-inflammatory response that occurs when the oxidative stress increases in the beginning and development of rheumatoid arthritis, being the main factor in the antioxidant response genes activation. In the present project we will study what is the effect of the artificial transcription factor Nrf2 silencing by RNA interference (transfection). Transfection was conducted on a primary culture of human synovial cells from patient with rheumatoid arthritis by using an Amaxa electroporator, and the effects of Nrf2 inhibition will be analyzed in homogenates of the transfected cells using the Western-blot technique.

Keywords: Transcription factor Nrf2, Synoviocytes, Rheumatoid arthritis, Nuclear transfection, Silencing, Western-blot.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Cultivos celulares y sus aplicaciones en la actualidad

Los cultivos de células animales son definidos como aquellas técnicas destinadas al mantenimiento o conservación de células en situación de aislamiento de un organismo pluricelular, con la condición de que las células realicen al menos una parte de las funciones que llevaban a cabo en el organismo completo para que puedan ser consideradas como técnicas válidas. Por lo tanto, ha de asegurarse la preservación de las condiciones fisiológicas, bioquímicas y genéticas de las células (Gil-Loyzaga 2011).

Las técnicas de cultivos celulares (de células animales) se han convertido en herramientas elementales de la investigación básica y aplicada de la Biomedicina, debido fundamentalmente a las diferencias existentes entre las condiciones que sufren las células en la pluricelularidad y las condiciones *in vitro*. Es por esto, que se deben destacar las siguientes características en referencia a los cultivos *in vitro*: i) las células que se encuentran en cultivo no reciben ningún tipo de estímulo regulatorio, especialmente endocrino o nervioso, y tampoco se encuentran bajo la protección del sistema inmunitario, por lo que existe una mayor probabilidad de colonización por microorganismos u otros agentes extraños; ii) se pierde la relación que existía entre células vecinas de forma previa en el tejido, lo que supone un incremento en la proliferación y motilidad celular, antes inhibidas por el contacto; y iii) pueden darse algunos cambios adaptativos en el metabolismo celular, como un mayor uso de la glucólisis, de forma que la fisiología observada no sea representativa de la que poseen en el animal vivo (Gil-Loyzaga 2011).

Las aplicaciones de este tipo de técnicas se han visto acrecentadas en los últimos años, consiguiéndose así innumerables logros tanto en el campo de las Ciencias Básicas como en el de Ciencias de la Salud. Es por ello, que los cultivos celulares no sólo se han convertido en una rutina tanto en laboratorios como en proyectos de investigación básica, abriendo nuevos frentes en esta última; sino que también han alcanzado gran protagonismo en la industria, productora de nuevas moléculas, especialmente en la industria farmacéutica debido a la constante renovación que sufren los fármacos, que son testados en células de forma previa a una fase clínica con individuos (Gil-Loyzaga 2011).

El uso de cultivos celulares ha permitido adquirir un amplio conocimiento acerca de la fisiología de las células y de sus orgánulos, pudiendo aplicar estos conocimientos a una gran variedad de campos, tales como la Biomedicina. La Biomedicina trata de profundizar en la fisiopatología de las diferentes enfermedades, con el fin de dar un diagnóstico de la enfermedad y, a su vez, encontrar terapias eficaces frente a las diversas patologías. Así, en función del tipo de patología que se requiera estudiar será necesario el empleo de un tipo celular u otro (Gil-Loyzaga 2011); muestra de ello son los sinoviocitos, células que participan en el inicio y desarrollo de diferentes enfermedades articulares.

1.2. Sinoviocitos

Los sinoviocitos, en particular los sinoviocitos de tipo B o también llamados de tipo fibroblasto debido a su parecido en morfología y función con este tipo celular (Valcárcel 2014), son células de origen mesenquimal que se encuentran contenidas en la membrana sinovial y que poseen gran cantidad de retículo endoplasmático rugoso. Estos sinoviocitos tienen especial importancia debido al papel fundamental que desempeñan en procesos de embriogénesis, así como en el mantenimiento del correcto funcionamiento de las articulaciones ya maduras (García. 2009).

Desde la capa íntima (lining) de la membrana sinovial, donde se encuentran aproximadamente dos tercios de estas células, actúan proporcionando proteínas plasmáticas, componentes del tejido conectivo para el mantenimiento de la cápsula articular (fibronectina, colágeno tipo IV y tipo VI, laminina, proteoglicanos, fibrilina, y sustancias lubricantes como el ácido hialurónico). En su conjunto, estas sustancias forman parte del denominado líquido sinovial, siendo secretadas en la cavidad articular, lubricándola y recogidas por los condrocitos del cartílago adyacente, nutriéndolos. De esta forma, los sinoviocitos también ejercen un elevado control sobre el volumen del líquido sinovial en la articulación (García 2009; Valcárcel 2014).

1.3. Papel de los sinoviocitos en la artritis reumatoide

La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad sistémica de carácter autoinmune asociada a un incremento en el estrés oxidativo, que centra principalmente su acción en la cavidad sinovial de las articulaciones. Así, esta enfermedad inflamatoria crónica se caracteriza por la aparición de infiltrado de células inflamatorias y de tejido sinovial de carácter invasivo conocido como "*pannus*" (región de la membrana sinovial reumatoide que limita con el cartílago y el hueso subcondral y que está formado por macrófagos, osteoclastos y células de tipos fibroblasto) que promueve la pérdida de la estructura articular (**Figura 1**), afectando a varias articulaciones a ambos lados del cuerpo y provocando la discapacidad del paciente (Ibáñez 2012; Valcárcel 2014) debido a que entre sus manifestaciones clínicas se encuentran el dolor, rigidez, hinchazón y pérdida de movilidad (Diéguez 2009). La AR afecta aproximadamente a un 0,5-1% de la población mundial adulta, siendo especialmente frecuente en mujeres, donde aparece con una probabilidad tres veces mayor que en hombres, lo que sugiere que las hormonas sexuales pueden ejercer un papel importante en el desarrollo de la enfermedad.

Durante el desarrollo de la AR, la membrana sinovial sufre importantes cambios a nivel estructural: aumento en masa con edema, pliegues redundantes y vellosidades. Los sinoviocitos constituyen la principal célula de la que derivan los problemas de inflamación y destrucción articular debido a su elevado potencial productor de enzimas degradativas de tejido conjuntivo, cartílago y hueso, siendo estas enzimas esencialmente catepsinas y metaloproteasas (MMPs). Además, tiene especial relevancia la activación y estimulación de los osteoclastos, principales culpables de la erosión del hueso, mediante la secreción de citoquinas proinflamatorias por parte de los sinoviocitos. Durante las fases iniciales de la enfermedad, se puede observar una incipiente hiperplasia sinovial (proliferación de la membrana sinovial) que se intensificará una vez esté la enfermedad establecida y a ello, se sumará la hipertrofia de los propios sinoviocitos (**Figura 1**). Por lo tanto, los sinoviocitos AR presentan un fenotipo agresivo que favorece activamente a los mecanismos de la enfermedad (Valcárcel 2014).

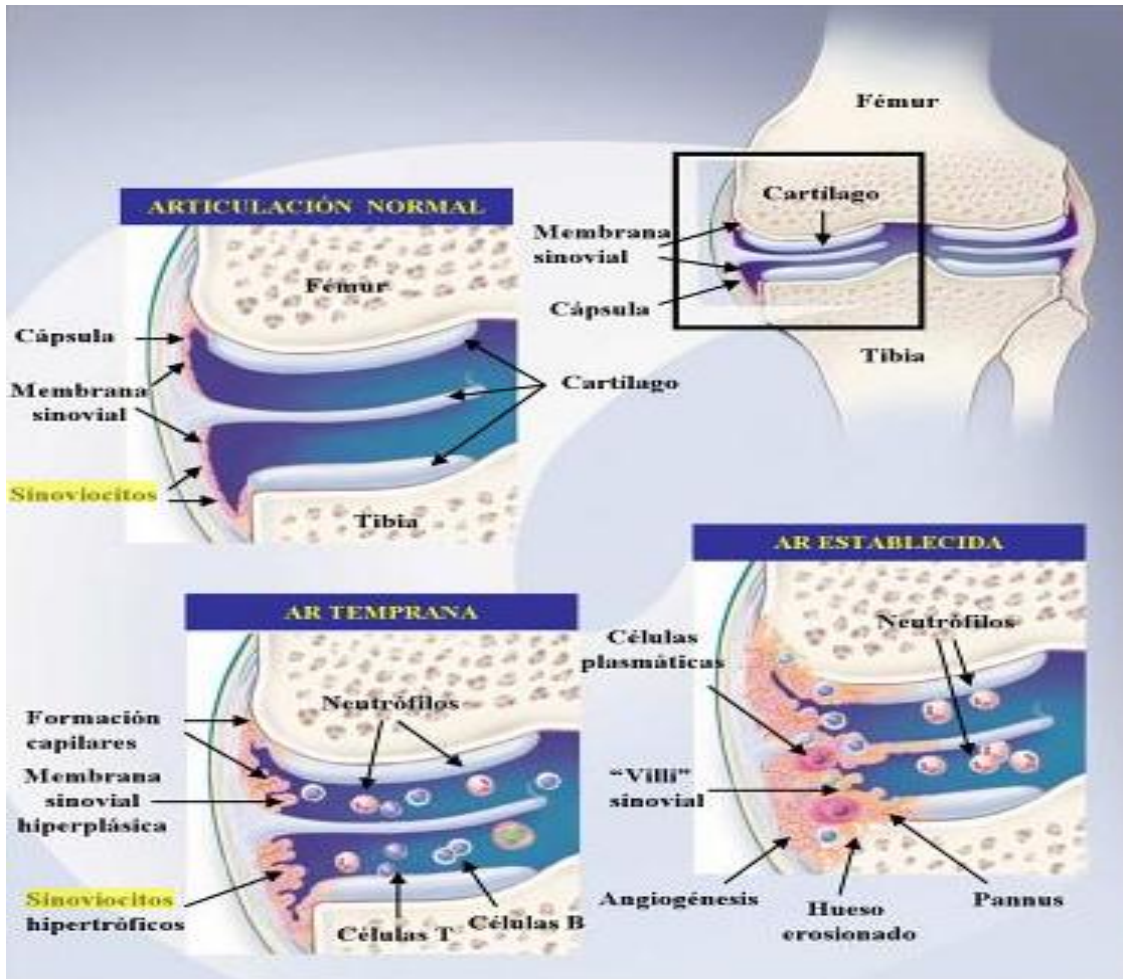


Figura 1. Comparación entre las características que presentan una rodilla sana y una artrítica, representando los cambios conforme evoluciona la enfermedad. Tomada de Diéguez (2009).

1.4. Factor de transcripción Nrf2

La adaptación al estrés generado por el medio ambiente es un requisito indispensable para la supervivencia de las células y de los organismos independientemente de cuál sea su nivel. Así, una de las adaptaciones que han adquirido las células es el desarrollo de ajustes para poder contrarrestar las moléculas oxidantes, y las células lo logran mediante un complejo sistema de defensa antioxidante (Königsberg 2007); es decir, las células han desarrollado programas dinámicos que incluyen moléculas antioxidantes y enzimas detoxificantes que puedan ser útiles a la hora de combatir el estrés causado por los excesos de especies reactivas de oxígeno (ROS) y moléculas electrófilas que contribuyen a dañar el ADN y al desarrollo de múltiples enfermedades (Itoh *et al.* 1998; Königsberg 2007; Valcárcel 2014).

El factor de transcripción que regula la expresión de las enzimas detoxificantes de la fase II, fase en la que se busca conseguir una respuesta eficaz y rápida frente a un estrés oxidativo es Nrf2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2) (Chan *et al.* 2001; Ibáñez 2012; Valcárcel 2014). Nrf2, además de una defensa antioxidativa, también se encuentra implicado en la regulación de procesos carcinogénicos, en la prevención de lesiones pulmonares y funciones anti-inflamatorias de forma que representa una novedad en el tratamiento terapéutico y prevención de enfermedades inflamatorias (Chan *et al.* 2001; Surh *et al.* 2008). Los Nrf2 son factores descubiertos recientemente y que pertenecen a una

familia de proteínas básicas con una particular cremallera de leucinas (bZip) en la región C-terminal (**Figura 2**), siendo la región básica corriente arriba de bZip la responsable de la unión de estos factores con el ADN, mientras que la región ácida es requerida para la activación de la transcripción de los genes. (Königsberg 2007; Ibáñez 2012).

El factor de transcripción Nrf2 contiene 605 aminoácidos y un peso molecular de 68 kDa. Estructuralmente está formado por 6 dominios (Neh1-6) (**Figura 2**), todos ellos localizados en la región N- terminal. Neh-1 contiene la cremallera de leucinas, por lo que es la región responsable de la unión al ADN. Neh-2 es el lugar de interacción para la unión con el represor de Nrf2, conocido como Keap1 (Kelch-like ECH-associated protein 1). Por su parte los dominios Neh3, Neh4 y Neh5 se unen a otras proteínas coactivadoras que se encargan de promover la transcripción de numerosos genes y, por último, Neh6 controla la autorregulación de Nrf2 independientemente del control ejercido por Keap1 (Ibáñez 2012).

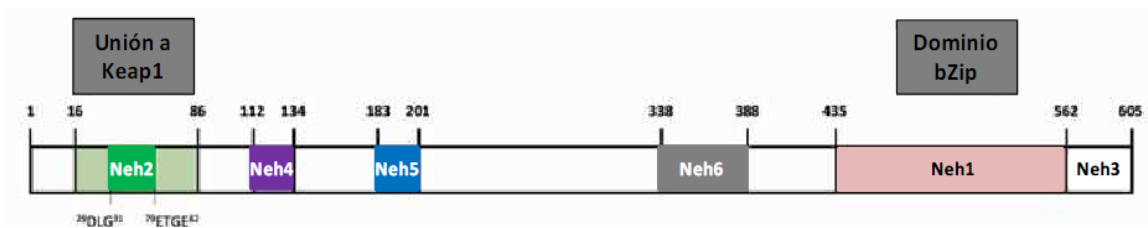


Figura 2. Estructura del factor de transcripción Nrf2. Tomada de Ibáñez (2012).

Así, el factor de transcripción Nrf2 regula la expresión de más de 200 genes implicados en la protección contra el estrés oxidativo, es decir, genes que codifican para enzimas citoprotectoras, antioxidantes y detoxificantes de fase II como pueden ser la NAD(P)H quinona oxidoreductasa 1 (NQO1), glutatión S-transferasa (GST), superóxido dismutasa (SOD) y glutatión peroxidasa (GPx), entre otras (Chan *et al.* 2001; Surh *et al.* 2008; Ibáñez 2012; Valcárcel 2014). Todos estos genes tienen en común unas secuencias específicas de unión conocidas como ARE (Antioxidant Response Element) que se encuentran en la región promotora de los genes y que son reguladas positivamente por el factor Nrf2 (Königsberg 2007; Ibáñez 2012).

En células en reposo, Nrf2 se encuentra retenido en el citoplasma debido a su interacción con el citoesqueleto de actina, y formando un complejo inactivo junto con el represor Keap1 (**Figura 3**). El complejo Nrf2-Keap1 actúa como sensor celular de estrés oxidativo (Ibáñez 2012). En esta situación, Keap 1 se asocia con Culin 3 (Cul3) y Rbx 1 para formar un complejo E3 ubiquitin-ligasa funcional que marca numerosos residuos de lisina localizados en el dominio Neh2 del extremo N-terminal del factor Nrf2 para su ubiquitinización y posterior degradación proteosómica. Así, bajo condiciones fisiológicas normales (**Figura 4**), Keap1 actuaría tanto de sustrato intermediario en la unión del complejo ubiquitin-ligasa como de estabilizador de unos bajos niveles basales de Nrf2, cuya degradación es rápida (Surh *et al.* 2008; Valcárcel 2014).

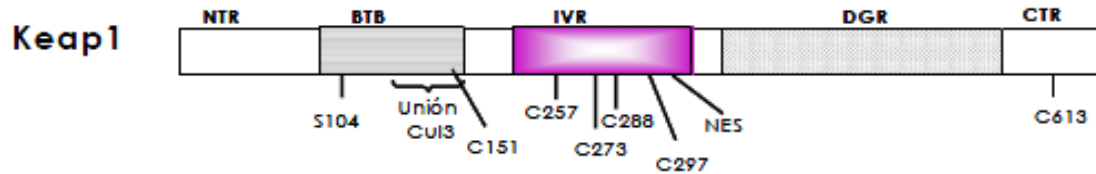


Figura 3. Represor Keap1. El dominio DGR se corresponde con el lugar de unión a Nrf2 y a la actina. IVR contiene los residuos de cisteína (C), con capacidad para oxidarse y registrar las variaciones oxidativas en la célula. Cui3 es la ligasa E3, que actúa como punto de anclaje al proteosoma. Tomada de Königsberg (2007).

Por su parte, cuando se origina una situación de estrés oxidativo o electrofílico, el factor Nrf2 sufre un procesamiento muy distinto (**Figura 4**). Inicialmente, el Nrf2 citoplasmático es estabilizado mediante el bloqueo de su ubiquitinización y consecuente degradación proteosómica. Este bloqueo se consigue mediante la oxidación de los residuos cisteína del represor Keap1 por la cual se origina un puente disulfuro en la proteína que reduce su capacidad degradativa de Nrf2, debido a su separación del mismo (Ibáñez 2012; Valcárcel 2014). A continuación, Nrf2 es translocado hacia el núcleo, donde sufre una combinación con otros factores de transcripción, como la pequeña proteína Maf (Surh *et al.* 2008), y activará la transcripción génica de enzimas antioxidantes tras su unión a las regiones ARE presentes en los promotores de los respectivos genes (Valcárcel 2014). Por lo tanto, cuando se produce un aumento de ROS, la actividad del factor de transcripción Nrf2 se ve incrementada con motivo de su mayor acumulación en el núcleo, la cual está relacionada con su abundancia y con su retención dentro del mismo (Valcárcel 2014).

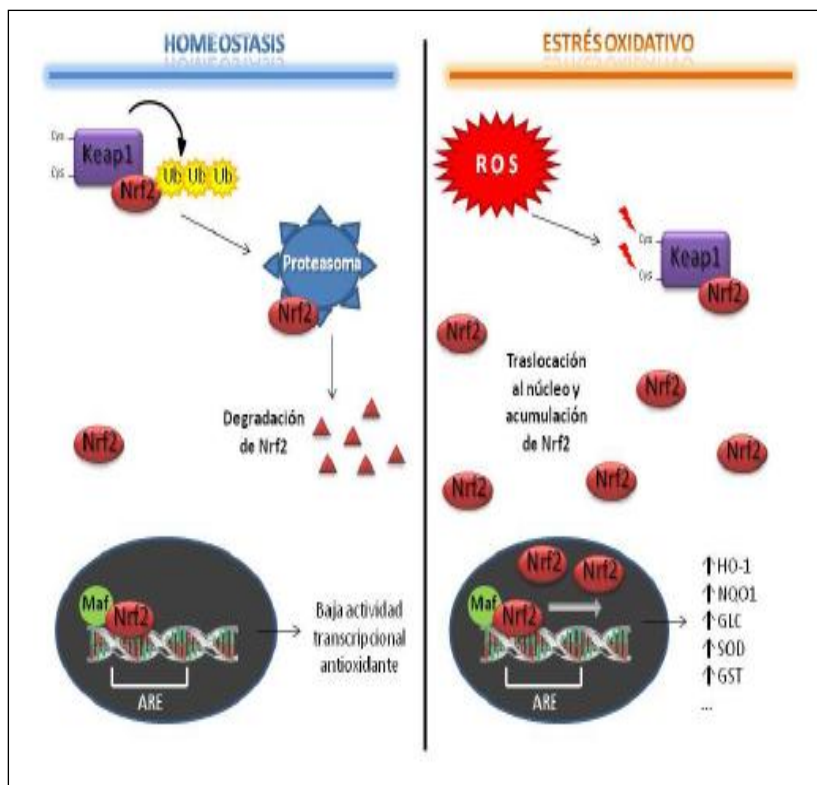


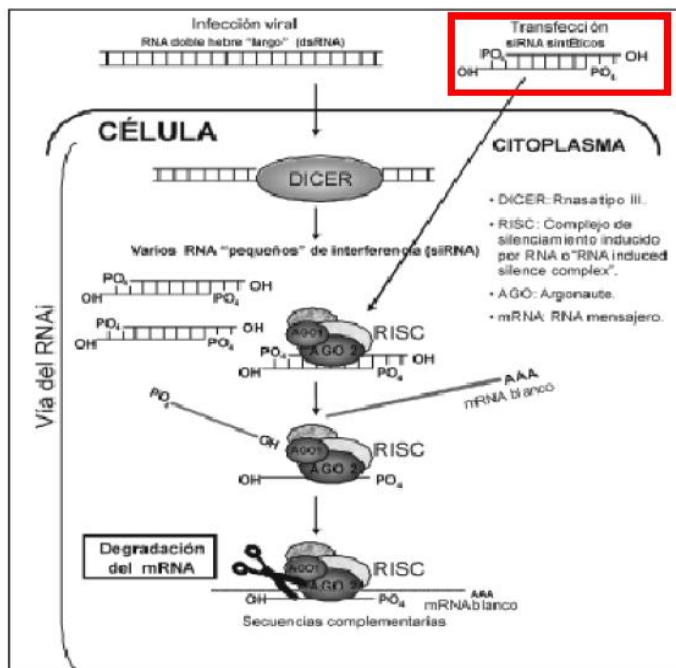
Figura 4. Comparación entre los mecanismos de regulación en condiciones normales y activación del factor de transcripción Nrf2 bajo condiciones de estrés oxidativo. Tomada de Valcárcel (2014).

1.5. Silenciamiento de genes

La regulación de la expresión génica es considerado como un proceso vital para todas las formas de vida, puesto que de ella depende el patrón de genes que son requeridos y que garantizan procesos tales como: diferenciación celular, organogénesis, desarrollo de una respuesta celular al estrés y al entorno, e incluso la apoptosis celular, entre otros. Así, muchos de los mecanismos de regulación operan a nivel genético controlando procesos tales como la transcripción y post-transcripción de genes (Correa de Adjounian *et al.* 2008).

En incontables ocasiones, las enfermedades subyacen a la sobreexpresión o a la expresión alterada de genes; cualquiera de estas situaciones pueden identificarse mediante la comparación de ARN mensajeros (ARNm) producidos por una célula o tejido control contra aquellos sometidos a cierto estímulo o presentes en una condición patológica. Con la ayuda de herramientas genéticas, entre ellas la interferencia por ARN (ARNi) (**Figura 5**), se puede analizar y asignar una función a dichos genes y a las consecuencias de sus patrones de expresión alterados (Sen y Blau 2006; Correa de Adjounian *et al.* 2008). Para ello, se reduce (*knock-down*) o inhibe (*knock-out*) la expresión de un gen, asociándole a dicha secuencia un producto de expresión, que se corresponde con un patrón fenotípico característico.

La interferencia por ARN (ARNi) se presenta desde hace años como una nueva herramienta molecular efectiva en células de mamíferos (*in vitro*) o incluso en animales (*in vivo*), lo cual hace que sea interesante como terapia génica aplicable a humanos. La interferencia se logra mediante la introducción a nivel celular por transposición, por un virus, por la producción a nivel celular de microARNs o bien por procedimientos experimentales, de un ARN de doble cadena pequeño, aproximadamente de 21-27 pb (el tamaño es una condición indispensable en el método de la interferencia por ARN) que se conoce como siARN. El siARN es reconocido a nivel celular por una maquinaria ancestral que actúa como mediadora en la degradación o supresión específica del ARNm de interés (proceso conocido como ARN interferencia) que contiene la secuencia complementaria al siARN introducido o producido (Sen y Blau 2006; Correa de Adjounian *et al.* 2008; Ortiz-Quintero 2009) (**Figura 5**).



5. Mecanismo de ARNi mediante siARNs sintéticos introducidos artificialmente en la célula (transfección). Los siARNs introducidos en la célula son reclutados por el Complejo de Silenciamiento Inducido por ARN (RISC, por sus siglas en inglés), encargado de separar las hebras del siARN. RISC utiliza la hebra antisentido como guía para poder incorporar el ARNm con la secuencia complementaria a dicha hebra. A continuación, se produce la escisión del ARNm por la enzima AGO2 del complejo RISC, con la consecuente inhibición del gen correspondiente. Tomada de Ortiz-Quintero (2009).

2. OBJETIVOS

El propósito de este trabajo es probar los efectos o resultados ya aportados por investigaciones previas, y que derivan del silenciamiento del factor de transcripción Nrf2 en células sinoviales humanas. Así, los principales objetivos planteados son:

1. Obtener un número elevado de sinoviocitos a partir de un cultivo primario de células, a fin de alcanzar la confluencia necesaria para poder llevar a cabo el silenciamiento de nuestro gen de interés.
2. Silenciamiento (específico) del factor de transcripción Nrf2 mediante la técnica de transfección, muy utilizada en los últimos años en investigaciones destinadas a la terapia génica.
3. Examinar el resultado del silenciamiento de Nrf2 mediante Western-blot.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Obtención y cultivo primario de sinoviocitos humanos

El cultivo celular primario de sinoviocitos es la base de este trabajo puesto que de su correcto desarrollo va a depender la posibilidad de llevar a cabo las consiguientes fases experimentales, así como la consecución de sus respectivos resultados. Es por ello, que ha de tenerse en cuenta que al tratarse de un cultivo celular primario humano, los sinoviocitos tendrán un crecimiento lento, y es preciso mantener en todo momento condiciones de asepsia para evitar la potencial contaminación de la muestra.

La muestra de células sinoviales procedentes de un individuo con AR es recogida en la cámara de criogenización, donde se encuentra almacenada en un tanque de nitrógeno líquido bajo unas condiciones de temperatura de -196°C , que permiten la conservación de las células durante periodos de tiempo indefinidos.

Para efectuar el cultivo primario de células sinoviales humanas se debe realizar la descongelación previa de las mismas. Así, se somete a la muestra a un primer descenso de la temperatura, exponiéndola a -20°C en congelador convencional. A continuación, se realiza una dilución 1:10 en solución DMEM (Dulbeccos's Modified Eagle Medium) al 10% o cualquier otra solución que contenga suero en su composición; DMEM ayuda a acelerar el proceso de descongelación celular. Ha de tenerse en cuenta que este proceso tiene que ser rápido con el motivo de evitar que las células resulten dañadas por la liberación de un compuesto, el dimetilsulfóxido (DMSO), un anticongelante proveniente del medio enriquecido al que se exponen las células para poder proceder a su preservación con nitrógeno líquido, y que puede resultar muy tóxico para las células.

Inmediatamente tras la descongelación, se somete la dilución a una centrifugación a 1.800 r.p.m., durante 10 minutos y temperatura ambiente. Se desecha el sobrenadante y se recoge el "pellet" donde se encuentran los sinoviocitos de interés con medio RPMI (Roswell Park Memorial Institute Medium) (Lonza, Basel, Suiza) suplementado con 20% de suero bovino fetal (SBF), 100 U/ml de penicilina/100 $\mu\text{g/ml}$ estreptomycin (Gibco) y enriquecido con 0,12 UI/ ml de insulina (Novo Nordisk, Bagsvaerd, Dinamarca); RPMI es un medio muy utilizado para el procesado de muestras humanas ya que optimiza el crecimiento de las células al obtenerse un ambiente muy parecido al que se encuentran los sinoviocitos en el líquido sinovial (Lorenzo 2009) e impide que resulten dañadas por eventos de inhibición de los propios factores celulares. El extracto celular es diluido en el

medio de cultivo en una Placa de Petri esterilizada y tratada a fin de que pueda darse en ella la adhesión celular. Se deposita la muestra en la estufa a 37°C y se espera un tiempo estipulado de 48 horas para el cambio de medio.

Para permitir la correcta expansión de las células que se encuentran creciendo en monocapa y que deben alcanzar aproximadamente el 80% de confluencia en botella (Flask), se lleva a cabo su levantamiento mediante sucesivas tripsinizaciones con Tripsina2X (T2X). Para ello, se realiza un lavado con salino, empleado para retirar los remanentes de suero que impide la actuación de la T2X. Retirado el salino, se someten las células a la tripsinización, dejando actuar este compuesto durante 2 ó 3 minutos en la estufa a 37°C. La tripsina es inactivada con medio con suero y se centrifuga a 1.500 r.p.m. durante 10 minutos. Se retira la T2X y se utiliza de nuevo el medio RPMI para permitir que las células sigan creciendo. Las células recogidas habían sufrido ya tres pases con T2X y se llegó hasta un sexto pase durante el experimento, presentando el fenotipo típico de los sinoviocitos tipo fibroblasto con morfología fusiforme.

3.2. Transfección nuclear

La transfección nuclear es uno de los métodos que actualmente está siendo más utilizado en el ámbito de la investigación clínica cuando se busca observar los efectos del silenciamiento génico de forma artificial. Se trata de una técnica muy sensible, cuya eficiencia viene determinada por: las condiciones del cultivo celular, la calidad del ADN y también su cantidad, y la temperatura, puesto que la solución donde va a tener lugar la inhibición del gen de interés ha de precalentarse a temperatura ambiente. De esta forma, serán un conjunto de factores los que determinarán que permanezca la viabilidad celular tras efectuar la transfección.

Previamente a la transfección es necesario tener preparado nuestro Flask al 80% de confluencia junto con el material y compuestos que utilizaremos a lo largo del proceso: se requiere tener atemperados la tripsina 2X (T2X), el medio RPMI al 20% de suero bovino fetal (SBF) y sin suero, y salino; además, se preparará un eppendorf por cada una de las condiciones que vayan a ser ensayadas (condición basal, control no específica con siARN, o inhibición específica con siARN), y una placa de seis pocillos, con dos pocillos por condición con 1,5 ml de medio RPMI al 20% que se mantendrá en la estufa a 37°C.

Una vez que están todos los elementos necesarios preparados, se procede a levantar las células con T2X, tal y como se había hecho anteriormente durante el cultivo de las mismas; es decir, se inactivará la tripsina con medio con suero. Centrifugamos a 1.500 r.p.m. durante 10 minutos. Decantamos el contenido y resuspendemos el pellet con medio RPMI sin suero (el medio no se encuentra suplementado con suero para que este compuesto no pueda intervenir en el proceso de transfección). Centrifugamos de nuevo a 1.500 r.p.m. durante 10 minutos. Decantamos el contenido, resuspendemos el pellet con RPMI sin suero y contamos el número de células con ayuda de una cámara de Neubauer. Una vez contadas las células, separamos un millón por cada una de las condiciones que interesan ser estudiadas, y centrifugamos por última vez a 1.500 r.p.m. durante 10 minutos. Resuspendemos en 100µl de Kit de transfección específico para sinoviocitos (Amaxa) por cada condición y a continuación, se reparten 100µl de la suspensión de células en eppendorf previamente identificados con su respectiva condición.

Para realizar la transfección, se utilizará el Nucleofactor Amaxa (Lonza) (**Figura 6**); éste consiste en un electroporador generador de corrientes eléctricas, que provoca la formación de poros en la membrana de las células, a fin de que pueda introducirse el siARN a través de ellos hacia el interior celular.



Figura 6. Nucleofactor Amaxa. Tomada de Lonza (2015).

Se introduce en cada eppendorf el siARN correspondiente y a continuación, se transvasará el volumen de cada eppendorf a una cubeta, introduciéndola en el nucleofactor (se utiliza el programa 23, específico para sinoviocitos). Una vez realizada la transfección, se transfiere el volumen de la cubeta a los eppendorf que previamente habíamos preparado con 1ml de medio al 20% y atemperado a 37°C. Se divide el volumen de cada eppendorf en dos pocillos de la placa de seis, también preparada con anterioridad con 1,5ml de medio al 20% e incubamos durante 24 horas a 37°C y CO₂ al 5%.

3.3. Cuantificación de proteínas

Determinar la concentración de proteínas en una muestra biológica es una de las técnicas más usadas en el ámbito de la biotecnología y otras industrias. Existen muchos métodos para la determinación de proteínas, dependiendo el uso del método adecuado principalmente de: cantidad total de proteína presente en la muestra, concentración de la proteína, la especificidad del método, presencia de otras sustancias que pudieran interferir y la facilidad y reproducibilidad del método (García y Vázquez 1998).

Para realizar la cuantificación proteica preparamos con antelación tampón de lisis junto con PMSF (fluoruro de fenilmetilsulfonilo), que actúa inhibiendo la acción de las proteasas sobre las proteínas, y cóctel de inhibidores. A continuación, lavamos la placa de seis pocillos dos veces con salino y ponemos 40µl de tampón de lisis en cada pocillo, procediendo a raspar la superficie para que se lisen todas las células. Se recoge en eppendorf el material viscoso resultante y se unen los dos pocillos que presentan la misma condición, tal y como se había registrado durante el proceso de la transfección, y se introducen directamente en hielo. Los eppendorf son llevados al Termoblok y expuestos a una temperatura de 100°C durante 5 minutos. Transcurrido el tiempo, se centrifugan a 13.000 r.p.m durante 10 minutos y a una temperatura de 4°C. Finalmente, se determina la concentración de proteínas contenida en las células previamente transfectadas usando el espectrofotómetro NanoDrop 1000 (Thermo Scientific) (**Figura 7**). NanoDrop mide la absorbancia de las proteínas, permitiendo el uso de pequeñas cantidades de material para su análisis, y reduciendo el tiempo dedicado a la medida (Deshardins *et al.* 2009).



Figura 7. Espectrofotómetro NanoDrop 1000.
Tomada de Thermo Scientific (2015).

3.4. Western-blot

Para el análisis de las proteínas se utiliza el método conocido como Western-blot. Este método permite la detección de una sola proteína dentro de una muestra biológica junto con la determinación de su tamaño, y también la comparación de los niveles de proteínas entre muestras.

Para la identificación del factor de transcripción Nrf2 mediante la técnica del Western-blot se emplearon los extractos obtenidos de los sinoviocitos humanos que habían sido procesados previamente en la fase experimental correspondiente a la cuantificación de proteínas.

La separación electroforética de las proteínas y péptidos se llevó a cabo en geles de poliacrilamida en presencia de dodecilsulfato sódico al 10% durante un tiempo aproximado de 2 horas y un voltaje constante de 150 V (Mini-Protean II PAGE system, Bio-Rad, Richmond, CA). En cada uno de los pocillos se aplicaron de 20 a 30 μg de los extractos de proteínas de diversa naturaleza, además de marcadores de peso molecular conocido (marcador NZY Colour Protein Marker II, Nzytech, Portugal, código MB09002, lote 14041; marcador Spectra multicolor Broad range protein ladder, Thermo Sci, Sci #26634, lote #00189403) (**Tablas 1 y 2**). Los marcadores nos permiten poder comparar e identificar con mayor precisión el peso molecular de nuestra proteína de interés dado que, el marcador NZY Colour Protein Marker II (Nzytech) consta de una mezcla de 12 proteínas altamente purificadas, de forma que se pueden reconocer un amplio rango de pesos moleculares (11 kDa-245 kDa), mientras que el marcador Spectra multicolor Broad range protein ladder (Thermo Sci) contiene una mezcla de 10 proteínas, cuyo rango de pesos moleculares oscila entre los 10 kDa a los 260 kDa; tanto homogenados proteicos como marcadores se encuentran inmersos en tampón de carga 4X.

Las proteínas separadas electroforéticamente fueron transferidas utilizando el sistema Translot SD (Bio-Rad) a una membrana de nitrocelulosa con un tamaño de poro de 0,2 μm (Bio-Rad) a 100V durante 1 hora. Los lugares de unión inespecíficos fueron bloqueados durante toda la noche con leche descremada en polvo al 5% en tampón Tris salino 50mM a un pH 7,5, y con Tween-20 al 0,1% (TTS-LT), a una temperatura constante de 4°C. Pasado el tiempo estipulado, se incubó nuevamente la membrana en una disolución 1:200 de anticuerpo anti-Nrf2 (Santa Cruz, USA, sc-722) en TTS-LT, durante 20 horas a 4°C. Finalmente, se trató la membrana con inmunoglobulinas de cabra anti-conejo marcadas con peroxidasa de rábano (Sigma-Aldrich, código A9169, lote 023M4757) en una dilución

1:5000 en TTS-LT, durante hora y media a una temperatura ambiente. Entre cada uno de los pasos citados se hicieron tres lavados en TTS-LT de 5 minutos cada uno. El revelado de la actividad peroxidasa en las membranas se realizó mediante el Kit de quimioluminiscencia BM Chemiluminescence Western Blotting kit (Roche, Suiza, referencia 11520709001, lote 10563700).

Marcador NZY Colour Protein Marker II, Nzytech, Portugal, código MB09002, lote 14041 (6 µl)				
Tipo de muestra	Concentración inicial de proteína (µg/µl)	Cantidad requerida por pocillo (µg/pocillo)	Composición de la muestra a cargar (µl)	Volumen cargado (µl)
Sinoviocitos humanos silenciados con mRNA específico	1.98	20	10 muestra 5 H ₂ O 5 TC 4X	20 µl
Sinoviocitos humanos control	2.78	20	7.2 muestra 7.8 H ₂ O 5 TC 4X	20 µl

Tabla 1. Muestras y cantidades utilizadas para el Western-blot, empleando el marcador NZY Colour Protein Marker II (Nzytech) como referencia.

Marcador Spectra multicolor Broad range protein ladder, Thermo Sci, Sci #26634, lote #00189403 (10 µl)				
Tipo de muestra	Concentración inicial de proteína (µg/µl)	Cantidad requerida por pocillo (µg/pocillo)	Composición de la muestra a cargar (µl)	Volumen cargado (µl)
Sinoviocitos humanos silenciados con mRNA específico	1.98	30	15 muestra - H ₂ O 5 TC 4X	20 µl
Sinoviocitos humanos control	2.78	30	30 muestra 4.2 H ₂ O 5 TC 4X	20 µl

Tabla 2. Muestras y cantidades utilizadas para el Western-blot, empleando el marcador Spectra multicolor Broad range protein ladder (Thermo Sci) como referencia.

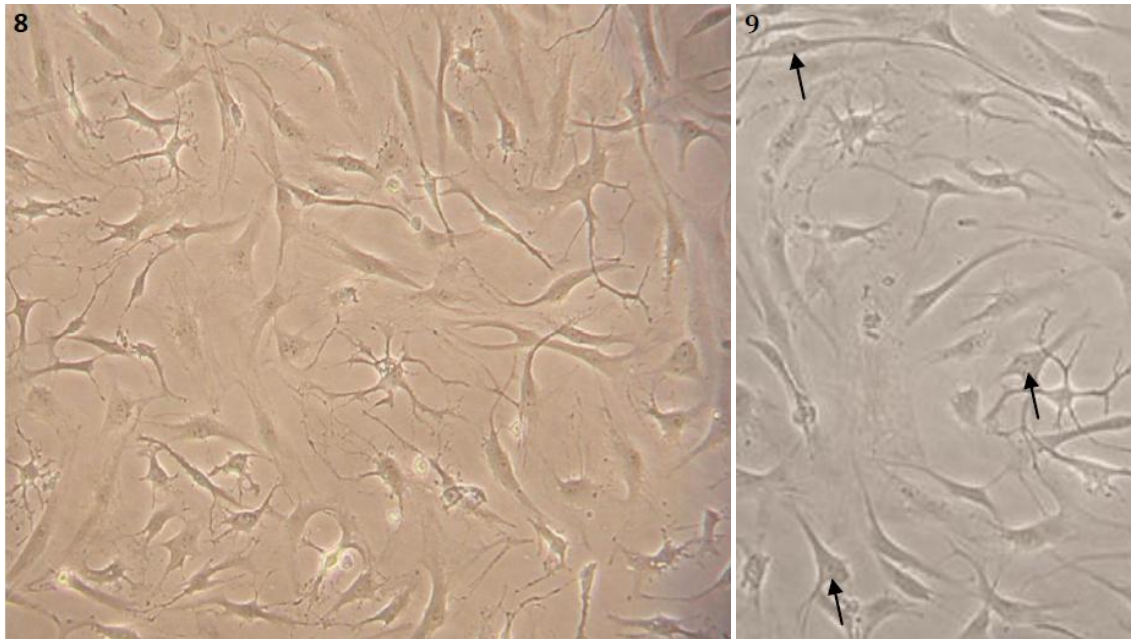
4. RESULTADOS

4.1. Obtención y cultivo primario de sinoviocitos humanos

Se obtuvo un cultivo celular repartido en dos Flasks, y en ambos, con una confluencia aproximada del 80%, lo cual se hacía evidente debido a que los sinoviocitos se mostraban repartidos de forma muy concentrada y con poco espacio entre las células hacia los bordes de los recipientes de cultivo y también en el centro, pero con una menor densidad celular. Esta característica distribución celular es típica de aquellas células que crecen en monocapa y sobre recipientes de plástico o vidrio, puesto que se trata de un mecanismo que permite la máxima proliferación celular.

Así, en el cultivo celular se reconocen únicamente sinoviocitos de tipo fibroblasto con rasgos morfológicos semejantes a los que presentan las células tumorales tal y como apunta en su trabajo Carrión (2013), destacando entre ellos una forma más redondeada a

la par que fusiforme en comparación con los sinoviocitos normales, una superficie citosólica, que está aumentada con respecto a los otros tipos de fibroblastos, y el gran núcleo con tonalidad pálida (**Figuras 8 y 9**).



Figuras 8 y 9. Células sinoviales de paciente con AR una vez han alcanzado una confluencia aproximada del 80%. 8) imagen tomada directamente con cámara tradicional a través del microscopio óptico donde se aprecia la morfología típica fusiforme de los sinoviocitos tipo B. 9) imagen modificada para presentar un mayor contraste que permite apreciar los grandes núcleos de coloración pálida con sus respectivos nucléolos dentro de las células sinoviales, señalados por las flechas.

4.2. Transfección nuclear

El proceso de transfección de los sinoviocitos se realizó siguiendo el protocolo propuesto por la casa comercial Lonza a la que pertenece el nucleofactor Amaxa, pues de esta forma, nos aseguramos de que haya una máxima eficiencia en cuanto al uso de soluciones específicas y que la intensidad de la corriente aplicada a las células en estudio sea la óptima.

La pretensión inicial de esta fase experimental era la obtención de cuatro grupos de muestras celulares diferenciadas, correspondientes a cuatro condiciones impuestas durante la transfección: i) condición basal, donde no se emplea siARN; ii) condición control, donde se emplea siARN no específico o no complementario a la secuencia del ARNm que codifica para el factor de transcripción Nrf2; iii) condición con siARN de secuencia específica o complementaria a la que presenta el ARNm que se pretende inhibir, a una concentración 50 nM, y iv) condición con siARN de secuencia específica, a una concentración 100 nM. Finalmente, se optó por realizar el estudio solo en base a dos de las condiciones planteadas, condición control y con siARN específico 50 nM, puesto que el número de células estimadas mediante el conteo en cámara de Neubauer era de alrededor de 2.400.000, cantidad insuficiente para llevar a cabo las cuatro condiciones, debido a que para la transfección se necesita al menos un millón de células por condición.

Para llevar a cabo la transfección con siARN se escogió el método físico de electroporación de membrana mediante el Nucleofactor Amaxa (Lonza). La electroporación es una técnica altamente sensible, basada en la aplicación de pulsos eléctricos a células en cultivo,

provocando la apertura de poros en las membranas de manera que pueda penetrar el siARN presente en la solución al interior celular (Castro y Portelles 1997). El programa 23 establece una intensidad de voltaje y una duración del pulso eléctrico destinados a no dañar irreversiblemente a las células sinoviales, siendo específico para éstas. Transcurrido un periodo de 24 horas tras la transfección, se examinaron las muestras celulares al microscopio óptico confirmándose que aún conservaban su viabilidad y que por lo tanto, se podría continuar con ellas en posteriores fases experimentales.

4.3. Cuantificación de proteínas

La estimación de la concentración de proteínas en las células transfectadas se llevó a cabo mediante espectrofotometría, utilizando el sistema NanoDrop 1000 (Thermo Scientific) y su software NanoDrop para ordenador (Deshardins *et al.* 2009). Tras medir la absorbancia de 1µl del extracto celular de cada una de las condiciones establecidas durante la transfección con el brazo de muestreo que presenta el espectrofotómetro, a una longitud de onda de 280 nm, el programa informático asociado procesa la información y determina que para:

- El extracto celular correspondiente a la condición control, la concentración de proteínas es de 2,78 µg/µl. Si tenemos en cuenta el volumen total de tampón de lisis utilizado, 80 µl, la concentración total de proteínas es de 222,4 µg/80 µl.
- El extracto celular correspondiente a la condición con siARN de secuencia específica, la concentración de proteínas es de 1,98 µg/µl, o bien 158,4 µg/80 µl de tampón de lisis utilizados.

4.4. Western-blot

La separación electroforética de las mezclas proteicas (contenidas en los distintos extractos empleados) y su transferencia a membrana de nitrocelulosa se realizó exitosamente, recurriéndose al revelado por quimioluminiscencia debido a su gran sensibilidad (**Figuras 10 y 11**). Como resultado final del Western-blot se obtuvieron dos revelados, correspondientes a las dos membranas transferidas, cada una con marcador de peso molecular específico (marcador NZY Colour Protein Marker II, Nzytech; y marcador Spectra multicolor Broad range protein ladder, Thermo Sci) (**Figuras 10 y 11**).

En ambos revelados (membrana con marcadores de Nzytech y membrana con marcadores de Thermo Sci) puede apreciarse una reproducibilidad de resultados, reconociéndose hasta tres bandas de pesos moleculares diferentes (95-100 kDa, 63-75 kDa, y 52-63 kDa) tanto en las muestras de sinoviocitos Nrf2 específico (inhibido específicamente con siARN) como en las muestras control (**Figuras 10 y 11**).

La aparición de tres bandas claramente visibles en el carril cargado con una muestra cuya proteína Nrf2 ha sido previamente silenciada, y que estas bandas aparezcan igualmente en la muestra control, indica que el proceso de obtención de células sinoviales transfectadas no se ha realizado de forma correcta o bien, eran necesarias otras condiciones tras efectuar la técnica. Así, los resultados demuestran que se continuó expresando Nrf2, cuya banda con un peso molecular biológicamente relevante se correspondería con aquella de 95-100 kDa, mientras que las dos bandas restantes han podido ser originadas por la variación de Nrf2 originada por los distintos compuestos o condiciones fisiológicas, tal y como ha demostrado en estudios previos Lau *et al.* (2013).

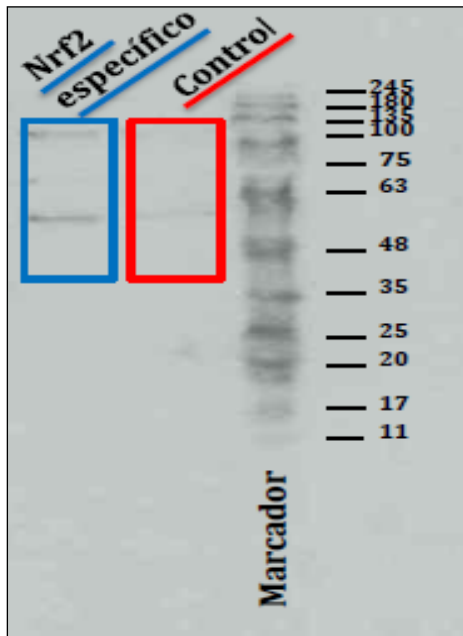


Figura 10. Revelado resultante tras efectuar la técnica de Western-blot. El marcador de peso molecular utilizado para identificar las bandas de proteínas pertenecientes a las muestras cargadas es NZY Colour Protein Marker II (Nzytech, Portugal). Las muestras de interés, Nrf2 inhibido de forma específica y control (señalados en azul y rojo, respectivamente) presentan por su parte tres bandas de 100 kDa, 63-75 kDa, y 55-63 kDa, en el caso de Nrf2, y tres bandas de 100 kDa, 75 kDa, y 48-63 kDa, en el caso de la muestra control.

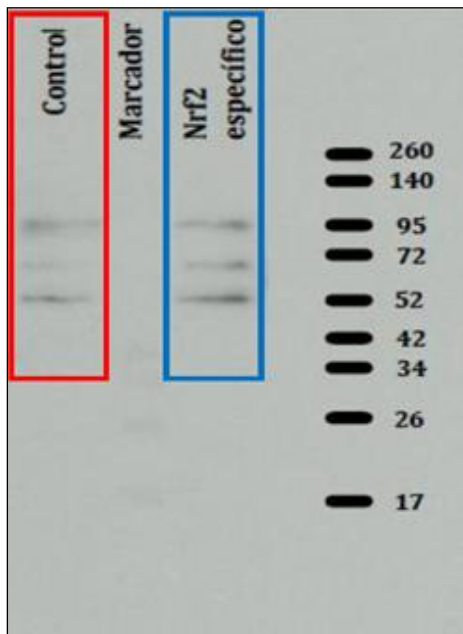


Figura 11. Revelado resultante tras efectuar la técnica de Western-blot. El marcador de peso molecular utilizado para identificar las bandas de proteínas pertenecientes a las muestras cargadas es Spectra multicolor Broad range protein ladder (Thermo Sci). Las muestras de interés, Nrf2 inhibido de forma específica y control (señalados en azul y rojo, respectivamente) presentan por su parte tres bandas de 95 kDa, 52-72 kDa, y 52 kDa, en el caso de Nrf2, y tres bandas de semejante peso molecular, en el caso de la muestra control.

5. DISCUSIÓN

La transfección de células, independientemente de cuál sea la naturaleza anatómica de éstas, permite observar las consecuencias derivadas del silenciamiento artificial de genes, sobre todo en aquellos que despiertan cierto interés tanto a nivel clínico como industrial, lo que resulta en una mayor comprensión del funcionamiento y control de la expresión de estas pequeñas unidades funcionales (Castro y Portelles 1997; Correa de Adjouian *et al.* 2008).

Los resultados obtenidos en el presente trabajo derivan de la transfección de sinoviocitos humanos en cultivo mediante el uso de la técnica de electroporación. Dicha técnica consiste en la aplicación de un campo eléctrico de gran intensidad sobre las células que lleva a la hiperpolarización de sus membranas, con el consiguiente incremento en la conductancia de las mismas. El incremento en la conductancia de las membranas celulares viene determinado por una reorientación de las moléculas lipídicas a causa del pulso eléctrico, creando poros hidrofílicos por los que se introducen diversos sustratos en la célula (Tsong 1991); por lo tanto, se trata de una herramienta particularmente útil y eficaz, pensada para introducir diferentes moléculas como por ejemplo ARN de silenciamiento (siARN), complementario e inhibidor de secuencias génicas de interés, en células en cultivo (Tsong 1991; Castro y Portelles 1997; Ortiz-Quintero 2009).

Los sinoviocitos cultivados se obtuvieron de una muestra de un paciente con patología articular, llevándose a cabo el cultivo en condiciones estándar dirigidas a optimizar el crecimiento de las células y reducir el tiempo necesario para la obtención de la confluencia deseada. Para ello, se empleó el medio de cultivo RPMI (Lonza, Basel, Suiza), caracterizado por una consistencia bastante fluida, pH ligeramente ácido (Lorenzo 2009), y por contener un componente fundamental y determinante en el crecimiento de los sinoviocitos humanos como es la insulina, además de sales, aminoácidos y otros componentes que lo llevan a actuar como una solución nutritiva. El medio era renovado cada dos días, durante un periodo de aproximadamente tres meses (sinoviocitos presentan un crecimiento lento), alternándose con sucesivas tripsinizaciones destinadas a impedir la inhibición del crecimiento por contacto entre las células, además de producir su “levantamiento” puesto que los sinoviocitos son células anclaje-dependientes, encontrándose adheridas al sustrato. Así, se alcanzó la confluencia esperada del 80% con una población de células homogénea y características fenotípicas similares a las que presentan las células tumorales (Carrión 2013; Valcárcel 2014).

Para la identificación del factor de transcripción Nrf2 mediante la técnica de Western-blot se ha empleado un anticuerpo comercial de la casa comercial Santa Cruz Biotechnology. El anticuerpo primario anti-Nrf2 de conejo reconoce el extremo C-terminal de Nrf2 de origen humano (Shish *et al.* 2003), pero dado que existe cierta homología de secuencia entre mamíferos, se considera válida la utilidad de este anticuerpo para el reconocimiento de Nrf2 en distintas especies de vertebrados, entre estas, la rata o el ratón (Innamorato 2011).

El análisis mediante Western-blot de homogenados de las dos condiciones (Nrf2 inhibido con siARN específico y Nrf2 inhibido con siARN inespecífico o control) de células sinoviales de paciente con AR transfectadas permitió reconocer hasta tres bandas diferentes con pesos moleculares de aproximadamente, 95-100, 63-75, y 52-63 kDa. Con la aparición de dichas bandas, concretamente las correspondientes al homogenado cuyo Nrf2 habría sido silenciado con siARN de secuencia complementaria, se evidencia que el proceso de transfección celular no ha resultado conforme lo esperado derivando en la no inactivación del factor de transcripción Nrf2 que habría seguido expresándose en las células en cultivo. En estudios previos se ha confirmado la aparición de tres bandas correspondientes al factor de transcripción Nrf2 localizadas en rangos de peso molecular semejantes a los expuestos en este trabajo (Moi *et al.* 1994; Shish *et al.* 2003; Vargas *et al.* 2005). La banda correspondiente a 95 kDa parece relacionarse con la forma de la proteína Nrf2 de mayor relevancia biológica (Lau *et al.* 2013), puesto que sería la que intervendría en la respuesta adaptativa frente al estrés, actuando como vector en la activación de la expresión de muchos elementos de respuesta antioxidante en mamíferos. De esta forma, la discrepancia observada entre el peso molecular esperado y el observado puede deberse probablemente a la abundancia de residuos ácidos encontrados en Nrf2, y que causarían su migración anómala en el gel de electroforesis de poliacrilamida en presencia de

dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) generando dos nuevas bandas situadas entre los 63-75 y 52-63 kDa (Moi *et al.* 1994; Lau *et al.* 2013).

El factor de transcripción Nrf2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2) está implicado en la respuesta celular ante condiciones de estrés, destacando aquellas cuyo producto final son las especies reactivas de oxígeno (ROS) tales como el radical superóxido, peróxido de hidrógeno o el radical hidroxil, entre las más importantes (Surh *et al.* 2008). Las ROS operan causando daños en la estructura y actividad normal celular, a consecuencia de la presencia de estímulos exógenos de diversa naturaleza (Stewart *et al.* 2003). Así, niveles bajos de ROS pueden ser combatidos fácilmente por el sistema antioxidante, pero si se produce una descompensación entre la generación de ROS y la capacidad defensiva del sistema antioxidante, la célula entrará en un estado de “estrés oxidativo” (Chan *et al.* 2001; Surh *et al.* 2008; Valcárcel 2014). En este sentido, la deficiencia de Nrf2 con la consecuente insuficiencia de enzimas antioxidantes implicadas en la protección celular (NQO1, GST, γ -glutamylcisteína sintetasa, epóxido hidrolasa, etc.) acelera la potencial incidencia de múltiples enfermedades respiratorias, diabetes, desordenes neuronales o enfermedades de tipo reumatoide con alteración de la respuesta inmune o inflamatoria, como la artritis reumatoide.

La artritis reumatoide (AR) ha sido encontrada en modelos murinos y otros vertebrados en cuya etiopatogénesis parece estar implicado el estrés oxidativo; esto permite ampliar el estudio de esta enfermedad en humanos (Maicas *et al.* 2011) debido a que ratón y humano comparten cerca de 400 loci homólogos relacionados con enfermedades genéticas, tal y como manifiestan en su trabajo Benavides y Guénet (2003), siendo una de ellas la artritis reumatoide (AR) que presenta cierta disposición genética. Aunque no representa una causa de mortalidad directa, la vida de las personas con este tipo de patología se ve acortada debido al riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares e infecciones graves asociadas (Consejo Interterritorial del Sistema Nacional de Salud 2013). Dados los efectos anti-inflamatorios de Nrf2, éste puede constituir un sistema de interés terapéutico en el tratamiento de la AR en humanos, cuya incidencia entre la población española se estima en 10 casos cada 10.000 habitantes (Consejo Interterritorial del Sistema Nacional de Salud 2013).

6. CONCLUSIONES

1. El cultivo primario de sinoviocitos humanos procedentes de un paciente con patología AR alcanzó una confluencia del 80% bajo unas condiciones de cultivo celular estándar libres de cualquier riesgo de contaminación. Las células sinoviales mostraron su característico crecimiento lento, a medida que se expandían inmersas en un medio nutritivo que, a su vez, permitía a las células seguir expresando niveles basales del factor de transcripción Nrf2.
2. La viabilidad de los sinoviocitos en cultivo fue conservada tras abrir poros en sus membranas, en un proceso altamente sensible, para permitir la entrada del siARN con secuencia complementaria al ARNm que codifica para Nrf2. Asimismo, se comprobó la utilidad de la electroporación como técnica muy empleada en investigación puesto que agiliza el proceso de transfección sobre células en cultivo.
3. Tras llevar a cabo el revelado de las membranas obtenidas en el Western-blot, se apreció la presencia de bandas correspondientes a la condición de Nrf2 silenciado específicamente. Tal presencia indica que el resultado de la transfección no ha sido el esperado, lo que determina que en las células se haya seguido expresando Nrf2, sin ser afectadas por una inhibición post-transcripcional.

CONCLUSIONS

1. The primary cell culture of human synoviocytes from a patient with rheumatoid arthritis pathology (AR) reached a 80% confluence under standard cell culture conditions which were free of any contamination risk. The synovial cells showed their characteristic slow growth while they were expanding immersed in a nutrient medium which, at the same time, allowed cells to keep on expressing basal levels of the Nrf2 transcription factor.
2. The viability of the synoviocytes in culture was preserved after opening pores in their membranes, in a highly sensitive process, to allow access of the siRNA with mRNA that encodes for Nrf2 complementary sequence. Also, the usefulness of the electroporation as a widely used technique in research was proved, due to its speed of the transfection process over cells in culture.
3. After carried out the development of the membranes obtained in Western-blot, it was observed the presence of bands related to specifically silenced Nrf2 condition. Such presence indicates that the transfection result is not as expected, which determines that the cells have kept on expressing Nrf2, unaffected by a post-transcriptional inhibition.

7. AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mis agradecimientos al grupo de Envejecimiento e Inflamación del Instituto de Investigación Biomédica (INIBIC) del Complejo Hospitalario Universitario de A Coruña, por acogerme y por su dedicación y disposición para el trabajo. También al departamento de Biología Celular y Molecular de la Facultad de Ciencias por permitirme realizar la última fase experimental en su laboratorio, y a mis tutores, que siempre han mostrado disponibilidad y me han permitido realizar con ellos este trabajo

8. BIBLIOGRAFÍA

Benavides FJ, Guénet JL. Manual de genética de roedores de laboratorio: principios básicos y aplicaciones. Alcalá de Henares: Universidad de Alcalá; 2003. Capítulo IV, Los mapas genéticos; p. 155-173.

Carrión Caballo M. Control del sinoviocito fibroblástico a la respuesta inmune articular en artritis reumatoide y artrosis: estudio del efecto modulador de Vip [tesis en Internet]. Madrid: Universidad Complutense de Madrid; 2013 [citado 2015 Jun 16]. Disponible en: <http://eprints.ucm.es/22998>

Castro FO, Portelles Y. Transfección de ADN a células de mamíferos. *Biotechnol Apl.* 1997; 14(3):149-161.

Chan K, Han X, Way Kan Y. An important function of Nrf2 in combating oxidative stress: Detoxification of acetaminophen. *PNAS* [Internet]. 2001[citado 2015 Feb 1]; 98(8):4611-4616. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.081082098> DOI 10.1073/pnas.081082098

Consejo Interterritorial del Sistema Nacional de Salud. Estrategia en enfermedades reumáticas y musculoesqueléticas del Sistema Nacional de Salud [Internet]. Madrid: Misnisterio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad; 2013 [citado 2015 Jul 17]. Dsponible en: http://www.msssi.gob.es/organizacion/sns/planCalidadSNS/Estrategia_ERyMEs.htm

Correa de Adjounian MF, Adjounian H, Adjounian SH. Silenciamiento de genes mediante RNA interferencia. Consideraciones sobre el mecanismo y diseño de los sistemas efectores. AVFT [Internet]. 2008 [citado 2015 Mar 21]; 27(1):22-26. Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=55927106>

Deshardins P, Hansen JB, Allen M. Microvolume protein concentration determination using the NanoDrop 2000c Spectrophotometer. JoVE [Internet]. 2009 [citado 2015 Mar 27]; 33: 1-4. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.3791/1610> DOI 10.3791/1610

Diéguez González R. Factores genéticos implicados en la susceptibilidad a la artritis reumatoide. Polimorfismos en genes candidatos y estudios de confirmación [tesis en Internet]. Santiago de Compostela: Universidad de Santiago de Compostela; 2009. Disponible en: <http://hdl.handle.net/10347/2516>

García Arellano H, Vázquez Duhalt R. Cuantificación de proteínas: una revisión. BioTecnología. 1998; 3, pp. 77-88.

García Pérez S. Papel de la Poly (ADP-ribosa) Polimerasa-1 en la fisiopatogenia de la artritis reumatoide [tesis]. Santiago de Compostela: Universidad de Santiago de Compostela; 2009.

Gil-Loyzaga P. Cultivos de células animales y humanas: aplicaciones en medicina regenerativa. Madrid: Editorial Visión Libros; 2011. Capítulo 1, Cultivo de células animales y humanas: conceptos y aplicaciones. Historia de los cultivos celulares; p. 17-34.

Ibáñez Torres L. Implicación de las vías Nrf2/ HO-1 y NADPH oxidasa en modelos experimentales de artritis y osteoporosis postmenopáusicas [tesis]. Valencia: Universidad de Valencia; 2012.

Innamorato NG. Papel del factor de transcripción Nrf2 en neuroinflamación y neurodegeneración en modelos experimentales de enfermedad de Parkinson [tesis en Internet]. Madrid: Universidad Autónoma de Madrid; 2011. Disponible en: <http://hdl.handle.net/10486/6158>

Itoh K, Wakabayashi N, Katoh Y, Ishii T, Igarashi K, Engel JD, Yamamoto M. Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by through binding to the amino-terminal Neh2 domain. Genes Dev [Internet]. 1998 [citado 2015 Ene 25]; 13:76-86. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1101/gad.13.1.76> DOI 10.1101/gad.13.1.76

Königsberg Fainstein M. Nrf2: la historia de un nuevo factor de transcripción que responde a estrés oxidativo. REB. 2007 [citado 2015 Ene 23]; 26(1):18-25.

Lau A, Tian W, Whitman SA, Zhang DD. The predicted molecular weight of Nrf2: it is what it is not. Antioxid Redox Signal [Internet]. 2013 [citado 2015 Jul 10]; 18(1):91-94. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1089/ars.2012.4754> DOI 10.1089/ars.2012.4754

Lonza [Internet]. Nucleofector 2b Device [citado 2015 May 5]. Disponible en: <http://www.lonza.com/products-services/bio-research/transfection/nucleofector-devices/nucleofector-2b-device.aspx>

Lorenzo Rojas A. El cultivo de sinoviocitos tipo A y B con fines terapeuticos en pacientes jóvenes con gonartrosis causada por sobrepeso [tesis]. México: Universidad Veracruzana; 2009.

Moi P, Chan K, Asunis I, Cao A, Wai Kan Y. Isolation of NF-E2-related factor 2 (Nrf2), a NF-E2-like basic leucine zipper transcriptional activator that binds to the tandem NF-E2/AP1 repeat of the β -globin locus control region. *Genetics* [Internet]. 1994 [citado 2015 Ene 24]; 91:9926-9930. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.91.21.9926> DOI 10.1073/pnas.91.21.9926

Ortiz-Quintero B. RNA de interferencia: Origen y aplicación en el silenciamiento de genes. *Rev Invest Clin* [Internet]. 2009 [citado 2015 Mar 20]; 61(5):412-427. Disponible en: <http://www.medigraphic.com/pdfs/revinvcli/nn-2009/nn095j.pdf>

Sen GL, Blau HM. A brief history of RNAi: the silence of the genes. *FASEB J* [Internet]. 2006 [citado 2015 Mar 25]; 20:1293-1299. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1096/fj.06-6014rev> DOI 10.1096/fj.06-6014rev

Shish AY, Johnson DA, Wong G, Kraft AD, Jiang L, Erb H, Johnson JA, Murphy TH. Coordinate regulation of glutathione biosynthesis and release by Nrf2- expressing glia potently protects neurons from oxidative stress. *J Neurosci*. 2003 [citado 2015 Jul 16]; 23(8):3394-3406.

Stewart D, Killeen E, Naquin R, Alam S, Alam J. Degradation of transcription factor Nrf2 via the ubiquitin-proteasome pathway and stabilization by cadmium. *J Biol Chem*. 2003; 278(4):2396-2402. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.m209195200> DOI 10.1074/jbc.m209195200

Surh Y, Kumar Kundu J, Na H. Nrf2 as a master redox switch in turning on the cellular signaling involved in the induction of cytoprotective genes by some chemopreventive phytochemicals. *Planta Med* [Internet]. 2008 [citado 2015 Mar 12]; 74:1526-1539. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1055/s-0028-1088302> DOI 10.1055/s-0028-1088302

Thermo Scientific. NanoDrop 1000 Spectrophotometer: V3.7 User's Manual [citado 2015 May 2015]. Disponible en: <http://www.nanodrop.com/library/nd-1000-v3.7-users-manual-8.5x11.pdf>

Tsong, TY. Electroporation of cell membranes. *Biophys J*. 1991 [citado 2015 Jul 17]; 60(2):297-306. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4899-2528-2_9 DOI 10.1007/978-1-4899-2528-2_9

Valcárcel Ares MN. Implicaciones patológicas del desequilibrio redox: Estudio del papel de la mitocondria en el proceso inflamatorio del sinoviocito y estudio de la participación de Nrf2 en la capacidad angiogénica endotelial [tesis]. A Coruña: Universidad de A Coruña; 2014.

Vargas MR, Pehar M, Cassina P, Martinez-Palma L, Thompson JA, Beckman JS, Barbeito L. Fibroblast Growth Factor-1 induces heme oxygenase-1 via Nuclear Erythroid 2- Related Factor 2 (Nrf2) in spinal cord astrocytes. *J Biol Chem* [Internet]. 2005 [citado 2015 Jul 17]; 280(27):25771-25579. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.m501920200> DOI 10.1074/jbc.M501920200