



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

FACULTADE DE CIENCIAS DA SAÚDE

**MESTRADO EN ASISTENCIA E INVESTIGACIÓN SANITARIA**

**ESPECIALIDADE: FUNDAMENTOS DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA**

Curso académico 2017-18

TRABALLO DE FIN DE MESTRADO

**Efecto de diferentes fucoïdanos sobre as  
respostas catabólicas inducidas en células  
articulares na artrose**

**María José Lamas Vázquez**

21 de xuño de 2018

O **Dr. Carlos Vaamonde García**, Investigador do Instituto de Investigación Biomédica de A Coruña (INIBIC) do grupo de Terapia Celular e Medicina Rexenerativa e Profesor Contratado Posdoutoral da Xunta na Universidade de A Coruña (UDC).

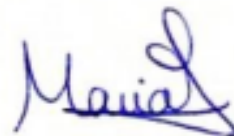
CERTIFICA QUE

A presente memoria do Trabajo de Fin de Mestrado titulada “**Efecto de diferentes fucoïdanos sobre as respostas catabólicas inducidas en células articulares na artrose**” presentada por María José Lamas Vázquez, foi realizada baixo a súa dirección no INIBIC, foi revisada e atópase en disposición de ser presentada.

Para que así conste, asinan o presente certificado en A Coruña, a 13 de xuño de 2018.



Asdo. Dr. Carlos Vaamonde García  
*Director e titor do Traballo de Mestrado*



Asdo. María José Lamas Vázquez

## **ÍNDICE**

RESUMO.....	I
RESUMEN.....	II
ABSTRACT.....	III
1. INTRODUCCIÓN .....	1
1.1. ANATOMÍA DA ARTICULACIÓN DIARTRODIAL .....	1
1.1.1. A cartilaxe articular.....	1
1.1.2. A membrana sinovial.....	4
1.2. A ARTROSE .....	4
1.2.1. A fisiopatoloxía da artrose.....	5
1.3. OS FUCOIDANOS.....	8
1.3.1. Propiedades biolóxicas .....	9
2. OBXECTIVOS.....	10
3. METODOLOXÍA .....	11
3.1. OBTENCIÓN DAS MOSTRAS .....	11
3.2. CULTIVO PRIMARIO DE CONDROCITOS.....	11
3.3. CULTIVO PRIMARIO DE SINOVIOCITOS.....	12
3.3. PREPARACIÓN DOS FUCOIDANOS.....	12
3.4. ESTIMULACIÓN CELULAR .....	13
3.5. ANÁLISE DA VIABILIDADE CELULAR E PROLIFERACIÓN .	13
3.6. ANÁLISE DA ACTIVIDADE ANTIOXIDANTE .....	14
3.7. ANÁLISE DA EXPRESIÓN XÉNICA .....	16
3.7.1. Extracción de ARN e tratamento con ADNasa.....	16
3.7.2. Retrotranscrición do ARNm.....	16
3.7.3. qPCR a tempo real.....	17
3.8.1. Western Blot.....	18
3.9. ENSAIO DE ELISA .....	20
3.10. ANÁLISE DO FENOTIPO CELULAR .....	20

3.10.1. Inmunocitoquímica .....	20
3.11. ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	21
4. RESULTADOS .....	22
4.1. ANÁLISE DA VIABILIDADE CELULAR .....	22
4.2. ACTIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS FUCOIDANOS .....	23
4.2.1. Determinación de NO.....	23
4.2.2. Efecto na expresión proteica de iNOS .....	25
4.2.3. Papel sobre o potencial de membrana mitocondrial.....	27
4.2.4. Papel dos fucoidanos na diminución da produción de ROS. 28	
4.3. EFECTO DOS FUCOIDANOS SOBRE A INFLAMACIÓN .....	29
4.3.1. Efecto na expresión proteica de mediadores inflamatorios ..	29
4.4. EFECTO DOS FUCOIDANOS NA FIBROSE SINOVIAL.....	33
4.4.1. O impacto dos fucoidanos na proliferación de sinoviocitos. .	34
4.4.2. Efecto na expresión xénica de marcadores fibróticos. ....	35
4.4.3. Efecto na expresión celular de $\alpha$ -SMA. ....	37
5. DISCUSIÓN .....	38
6. CONCLUSIÓNS .....	44
7. AGRADECEMENTOS.....	44
8. BIBLIOGRAFIA .....	45
9. ANEXOS .....	51
ANEXO I: EXEMPLO DE CONSENTIMENTO INFORMADO.....	51
ANEXO II: IMAXES REPRESENTATIVAS DA EXPRESIÓN DE $\alpha$ -SMA .....	55

## **ÍNDICE DE FIGURAS**

Figura 1: Capas da cartilaxe articular. ....	3
Figura 2: Articulación do xeonllo san e con artrose .....	5
Figura 3: Fisiopatoloxía da OA.....	7
Figura 4: Histogramas da viabilidade celular nas células articulares .....	22
Figura 5: Representación gráfica da produción de NO. ....	23
Figura 6: Produción de NO en sinoviocitos. ....	24
Figura 7: Expresión proteica de iNOS en condrocitos. ....	25
Figura 8: Representación da expresión proteica de iNOS en sinoviocito	26
Figura 9: Representación do efecto dos fucoidanos na polarización mitocondrial.....	27
Figura 10: Histograma da determinación de ROS en condrocitos. ....	29
Figura 11: Expresión proteica de COX-2 en condrocitos. ....	30
Figura 12: Gráfico da produción de PGE <sub>2</sub> en condrocitos.....	30
Figura 13: Expresión proteica de HO-1 en condrocitos. ....	31
Figura 14: Análise da expresión proteica de COX-2. ....	32
Figura 15: Análise da expresión de HO-1 en sinoviocitos.....	33
Figura 16: Gráfico da viabilidade dos sinoviocitos con TGF- $\beta$ .....	34
Figura 17: Histograma da proliferación celular nos sinoviocitos. ....	35
Figura 18: Representación gráfica da expresión xénica de COL1A e FN1 .....	36
Figura 20: Gráfica da expresión de $\alpha$ -SMA en sinoviocitos. ....	37

## **ÍNDICE DE TÁBOAS**

Táboa I: Cebadores directos e reversos utilizados coas súas secuencias. .....	17
Táboa II: Tampóns usados no Western Blot e a súa composición. ....	19
Táboa III: Anticorpos coas súas respectivas dilucións usados para a análise de expresión proteica. ....	20

## ÍNDICE DE ABREVIATURAS

**$\alpha$ -SMA:** alfa actina do músculo liso (alfa smooth muscle actin).

**AA:** Anticimicina A.

**ADN:** Ácido desoxirribonucleico.

**ADNasa:** Desoxirribonucleasa.

**ADNc:** Ácido desoxirribonucleico complementario.

**ANOVA:** Análisis de varianza (analysis of variance).

**ARN:** Ácido ribonucleico.

**BSA:** Albúmina de soro bovino (bovine serum albumin).

**CHUAC:** Complexo Hospitalario Universitario de A Coruña.

**COX-2:** Ciclooxigenasa 2.

**DAB:** 3,3-diaminobencidina.

**DCF:** 2',7'-diclorofluoresceína.

**DCFH-DA:** Diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína.

**DMEM:** Dulbecco's modified Eagle's medium.

**EDTA:** Ácido etilendiaminotetracético.

**EEM:** Erro estándar da media.

**ELISA:** Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay).

**h:** Horas.

**HO-1:** Hemosixenasa 1.

**IL-1 $\beta$ :** Interleucina 1 beta.

**INIBIC:** Instituto de Investigación Biomédica de A Coruña.

**iNOS:** Óxido nítrico sintasa inducible (inducible nitric oxide synthase).

**MEC:** Matriz extracelular.

**mg:** Miligramos.

**min:** Minutos.

**ml:** Mililitros.

**MMPs:** Metaloproteasas de matriz.

**MTT:** Bromuro 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difenil tetrazol.

**ng:** Nanogramos.

**nm:** Nanómetro

**nM:** Nanomolar.

**NO:** Óxido nítrico.

**OA:** Artrose (osteoarthritis).

**PBS:** Tampón fosfato salino (phosphate buffered saline).

**PG:** Prostaglandinas.

**PGE2:** Prostaglandina E 2.

**PMSF:** Fluoruro de fenilmetilsulfonilo.

**P/S:** Penicilina e estreptomicina.

**PVDF:** Fluoruro de polivinilideno.

**qPCR:** Reacción en cadena de polimerasa cuantitativa (quantitative polymerase chain reaction).

**ROS:** Especies reactivas de oxígeno (reactive oxygen species).

**rpm:** revoluciones por minuto.

**RPMI:** Roswell Park Memorial Institute medium.

**RT:** Retrotranscripción.

**s:** Segundos.

**SBF:** Soro bovino fetal.

**SDS:** Dodecil sulfato sódico (sodium dodecyl sulfate).

**SDS-PAGE:** Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis.

**TGF-β:** Factor transformador de crecimiento beta (transforming growth factor beta).

**TMRM:** Tetrametilrodamina metil éster.

**TNF-α:** Factor de necrosis tumoral alfa (tumor necrosis factor alfa).

**vs.:** versus.

**μg:** Microgramos.

**μl:** Microlitros.

**μm:** micrómetro.

**μM:** Micromolar.

## RESUMO

**Introdución e obxectivo:** A artrose supón un importante problema de saúde que, a día de hoxe, non ten cura. Un posible tratamento para os signos e síntomas desta patoloxía poden ser os fucoidanos, uns polisacáridos sulfatados naturais con diversas actividades biolóxicas. O obxectivo deste traballo foi avaliar os efectos antiinflamatorios, antioxidantes e antifibróticos de 3 fucoidanos procedentes de *Fucus vesiculosus*, *Macrocystis pyrifera* e *Undaria pinnatifida* no catabolismo dos condrocitos e sinoviocitos e comparar os diferentes fucoidanos entre si.

**Metodoloxía:** As células articulares incubáronse con diferentes mediadores catabólicos na presenza dos fucoidanos. A súa capacidade para modular a inflamación inducida por IL-1 $\beta$  valorouse a través da expresión proteica de COX-2 e HO-1 e da produción de PGE<sub>2</sub>. A resposta antioxidante dos fucoidanos foi avaliada mediante a expresión de iNOS e a produción de NO, ademais do seu efecto protector sobre a síntese de ROS e a despolarización mitocondrial inducida polo inhibidor mitocondrial Antimicina A. Por último, o seu papel fronte a activación da fibrose sinovial inducida por TGF- $\beta$  foi estudada a través de ensaios de proliferación e da expresión de marcadores fibróticos nos sinoviocitos.

**Resultados:** O *Fucus vesiculosus* presentou de maneira significativa o maior efecto antioxidante nas células articulares, tanto a nivel de produción de NO como de protección fronte a disfunción mitocondrial. Ademais, foi tamén capaz de modular a resposta inflamatoria inducida por IL-1 $\beta$  nos condrocitos e nos sinoviocitos. De igual modo, o de *Macrocystis pyrifera* xunto ó de *Undaria pinnatifida* amosaron o mellor efecto protector sobre a fibrose sinovial.

**Conclusións:** Este traballo suxire que os fucoidanos poden ser unha alternativa terapéutica natural para a artrose, diminuindo o estrés oxidativo, a expresión de mediadores inflamatorios e freando a fibrose sinovial. Porén, serán necesarias máis investigacións para poder dar conclusións definitivas.



## RESUMEN

**Introducción y objetivo:** La artrosis supone un importante problema de salud que, a día de hoy, no tiene cura. Un posible tratamiento para los signos y síntomas de esta patología pueden ser los fucoidanos, unos polisacáridos sulfatados naturales con diversas actividades biológicas. El objetivo de este trabajo fue evaluar los efectos antiinflamatorios, antioxidantes y antifibróticos de 3 fucoidanos procedentes de *Fucus vesiculosus*, *Macrocystis Pyrifera* y *Undaria pinnatifida* en el catabolismo de los condrocitos y sinoviocitos y comparar diferentes fucoidanos entre sí.

**Metodología:** Las células articulares se incubaron con diferentes mediadores catabólicos con la presencia de los fucoidanos. Su capacidad para modular la inflamación inducida por IL-1 $\beta$  se valoró a través de la expresión proteica de COX-2 e HO-1 y de la producción de PGE<sub>2</sub>. La respuesta antioxidante de los fucoidanos fue evaluada mediante la expresión de iNOS y la producción de NO, además de su efecto protector sobre la síntesis de ROS y la despolarización mitocondrial inducida por el inhibidor mitocondrial Antimicina A. Por último, su papel frente a la fibrosis sinovial inducida por TGF- $\beta$  fue estudiada a través de ensayos de proliferación y de expresión de marcadores fibróticos en los sinoviocitos.

**Resultados:** El *Fucus vesiculosus* presentó significativamente el mayor efecto antioxidante sobre las células articulares, tanto a nivel de la producción de NO como de protección frente a la disfunción mitocondrial. Además, fue capaz de modular la respuesta inflamatoria inducida por IL-1 $\beta$  en condrocitos y en sinoviocitos. Del mismo modo, el de *Macrocystis Pyrifera* junto con el de *Undaria pinnatifida* mostraron el mejor efecto protector sobre la fibrosis sinovial.

**Conclusiones:** Este trabajo sugiere que los fucoidanos pueden ser una alternativa terapéutica natural para la artrosis disminuyendo el estrés oxidativo, la expresión de mediadores inflamatorios y frenando la fibrosis sinovial. Sin embargo, se necesitan más investigaciones para poder dar conclusiones definitivas.

## ABSTRACT

**Introduction and objective:** Osteoarthritis (OA) is an articular disease managed rather than cured, with a focus on alleviating its pain. Recent studies suggest that fucoidans, polysaccharids with different biological activities, could be promising candidates to address the symptoms of OA. The objective of this study was to evaluate the antiinflammatory, antioxidant and antifibrotic effects of 3 fucoidans from *Fucus vesiculosus*, *Macrocystis Pyrifera* and *Undaria pinnatifida* in the catabolism of chondrocytes and synoviocytes and to compare their biological actions.

**Methodology:** Articular cells were incubated with different catabolic stimuli along with fucoidans. To activate inflammatory pathways, cells were stimulated with IL-1 $\beta$ , subsequently iNOS and COX-2 expression were assayed by western blot and NO and PGE2 production measured by griess test and ELISA respectively. Mitochondrial dysfunction was induced in chondrocytes by mitochondrial inhibitor Antimycin A after which mitochondrial depolarization and ROS generation were monitored by fluorescent probes. Finally, fibrotic pathways were activated in synoviocytes by TGF- $\beta$ , then cellular proliferation were assayed by MTT and expression of fibrotic markers by RT-qPCR and immunocytochemistry.

**Results:** *Fucus vesiculosus* showed significant antioxidant effect on articular cells, decreasing NO production and protecting chondrocytes against mitochondrial dysfunction. Besides, it was also able to modulate the inflammatory response induced by IL-1 $\beta$  in chondrocytes and synoviocytes. Similarly, *Macrocystis Pyrifera* and *Undaria pinnatifida* showed a more effective effect against synovial fibrosis.

**Conclusions:** This work suggests that fucoidans can be a natural therapeutic alternative for OA treatment by decreasing the oxidative stress and the expression of inflammatory mediators, as well as by attenuating the sinovial fibrosis. However, additional studies are warranted before a firm conclusion can be made.

# **1. INTRODUCCIÓN**

## **1.1. ANATOMÍA DA ARTICULACIÓN DIARTRODIAL**

As articulacións son estruturas complexas que unen ósos adxacentes formando unidades funcionais que se adaptan para transferir as cargas durante o soporte do peso e permitir os movementos articulares <sup>1,2,3</sup>. Entre outros tipos de articulacións como as anfiartrodiais e sinatroidiais, as articulacións diartrodiais son aquelas que permiten un amplo grao de movemento e constan de diferentes elementos como a cartilaxe articular, a membrana sinovial, os tendóns, as bursas e os ligamentos. Un exemplo deste tipo de articulacións son o xeonllo e a cadeira <sup>1,2</sup>.

### **1.1.1. A cartilaxe articular**

No corpo humano, a cartilaxe clasifícase en elástica, fibrocartilaxe, fibroelástica e hialina. As superficies de desprazamento da articulación sinovial ou diartrodial están cubertas por un tipo de cartilaxe hialina altamente especializada, chamada cartilaxe articular <sup>3</sup>.

A cartilaxe articular é un tecido conectivo aneural, avascular e alinfático que presenta un comportamento mecánico único e capacidades rexenerativas pobres <sup>4,5,6</sup>. As súas principais funcións son a absorción, o soporte e a disipación das cargas mecánicas a través das articulacións <sup>3,7</sup>. Dada a falta de vascularización no tecido, a súa alimentación depende da difusión de nutrientes e metabolitos que son facilitados polo líquido sinovial e o óso subcondral <sup>5,7</sup>.

A cartilaxe está composta por un único tipo celular, os condrocitos, que están incrustados dentro dunha matriz extracelular (MEC). Todas as estruturas e os compoñentes da cartilaxe articular atópanse altamente organizados para conferirlle unhas propiedades biofísicas que lle dan forma, rixidez á tracción e resistencia á compresión do tecido <sup>6,8</sup>. Ademais, a cartilaxe coordínase coa membrana sinovial formando unha superficie lisa cun coeficiente de fricción mínimo que permite o desprazamento eficiente dos ósos e a protección da articulación <sup>4,9,10</sup>.

### 1.1.1.1. Composición e estrutura da cartilaxe articular

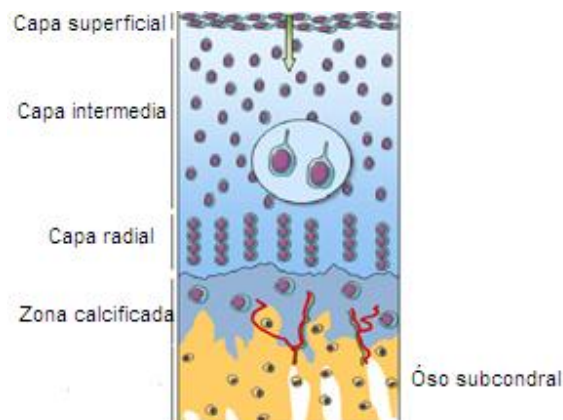
A cartilaxe articular está composta polos condrocitos e a MEC. Os condrocitos ocupan o 1%- 5% do tecido total da cartilaxe. Son células que sintetizan e transfiren os compoñentes da MEC como o coláxeno, as glicoproteínas e os proteoglicanos <sup>6,7</sup>. Os condrocitos sosteñen e manteñen a integridade da matriz cartilaxinosa mediante un perfecto equilibrio entre os procesos anabólicos e catabólicos, e dicir; entre os mecanismos de síntese e de degradación das diversas moléculas estruturais que forman a MEC. Sumado a isto, na cartilaxe adulta a cal é relativamente hipocelular <sup>4</sup>, son células non proliferativas que presentan unha actividade metabólica baixa dado a que teñen un número baixo de mitocondrias e viven en condicións de hipoxia <sup>1,5,7,11</sup>.

Os condrocitos están illados en pequenas cavidades coñecidas como lagoas formando, xunto coa MEC, a unidade funcional da cartilaxe, o condrón <sup>5,12</sup>. Estes comunícanse uns con outros a través da difusión de sustancias na matriz ou de unións «gap» formadas por proteínas integrais de membrana, o que é esencial para responder aos estímulos, ao dano celular e para manter a homeostase do tecido fronte ós traumatismos <sup>12</sup>.

A MEC consiste principalmente en auga e macromoléculas como o coláxeno e os proteoglicanos. Estes compoñentes están perfectamente ordenados desde a superficie da cartilaxe ata as capas máis profundas <sup>1,13</sup>. A auga e os sales minerais representan a maior parte deste tecido (60% – 80% do peso total) sendo importantes para o mantemento da elasticidade e o sistema de nutrición e lubricación. O contido de auga está distribuído de maneira desigual e a súa concentración diminúe gradualmente ao aumentar a profundidade <sup>1,5,13</sup>. O coláxeno, os proteoglicanos e as glicoproteínas representan só o 20% do peso total do tecido. O coláxeno supón o 50-60% do peso seco e proporciona a forma e a resistencia á tracción. O coláxeno tipo II é o máis específico e abundante. Por outra parte, os proteoglicanos constitúen o 5-10% do peso húmido e teñen a propiedade de reter a auga o que lle confire á cartilaxe

articular as súas principais propiedades biomecánicas, como a compresibilidade e a elasticidade <sup>1,4,5,11</sup>.

En canto á estrutura da cartilaxe articular (Figura 1), esta presenta unha estrutura complexa, estratificada e organizada que se divide en catro zonas: superficial, media ou de transición, profunda ou radial e a zona da cartilaxe calcificada. A composición, a distribución e o número de condrocitos varía dunha capa a outra <sup>7</sup>.



**Figura 1: Capas da cartilaxe articular.** Imaxe que representa as catro zonas da cartilaxe <sup>8</sup>. A capa superficial é a máis delgada onde os condrocitos son pequenos, alargados e se dispoñen paralelos á superficie. Na capa intermedia, os condrocitos son esféricos e encóntranse dispersos na MEC. Na capa radial os condrocitos dispóñense perpendiculars á superficie. Por último, a zona calcificada é unha zona inactiva cunha menor concentración de todos os compoñentes que se atopan espallados <sup>3</sup>. Imaxe obtida e modificada de Houard X e colaboradores <sup>8</sup>.

A composición da MEC e a organización dos condrocitos así como a súa resposta a factores externos confírenlle á cartilaxe as súas propiedades específicas. Porén, en presenza de desordes como o envellecemento e as enfermidades articulares, estas propiedades vense afectadas ocasionando danos na cartilaxe, unha perda das condicións homeostáticas e modificacións nas vías catabólicas <sup>6,7</sup>.

### **1.1.2. A membrana sinovial**

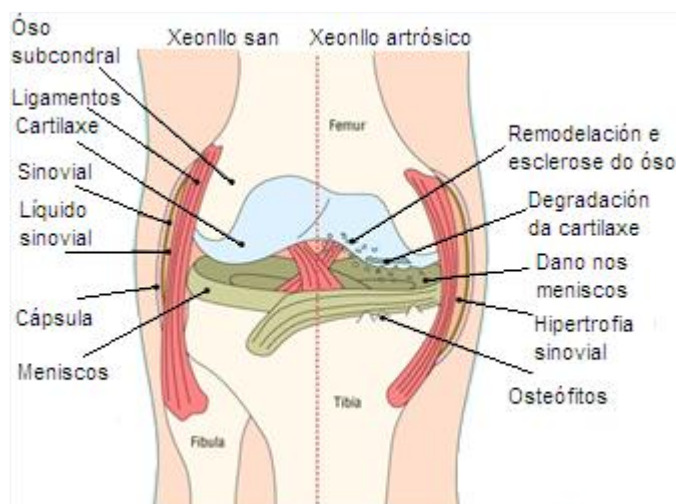
A membrana sinovial é unha estrutura fina especializada, vascularizada, innervada e acompañada dun sistema linfático, que tapiza a cara interna das articulacións diartrodiais. Está constituída por dúas capas; a capa íntima que é semipermeable e o compoñente funcional da membrana, e a subíntima, formada por tecido conxuntivo laxo. Os sinoviocitos son o compoñente celular desta membrana e clasifícanse en 2 tipos; os fibroblásticos (tipo B) e os macrofáxicos (tipo A). Os sinoviocitos fibroblásticos son os principais constituíntes do tecido sinovial con funcións como a lubricación e a nutrición da cartilaxe, mentres que os macrofáxicos predominan na inflamación e fagocitan e eliminan os desperdicios e as partículas intraarticulares contribuíndo a resposta inmunitaria <sup>2,14,15</sup>.

### **1.2. A ARTROSE**

A osteoartrite ou artrose (OA) é un trastorno crónico común, progresivo e heteroxéneo que afecta ás articulacións. Trátase dunha das principais causas de dor articular, de perda da funcionalidade e de discapacidade diminuindo así a calidade de vida da poboación e aumentando o impacto socioeconómico <sup>11,16</sup>.

Esta enfermidade é unha alteración que cursa cun trastorno molecular, seguido de trastornos anatómicos e fisiolóxicos que se caracterizan pola dexeneración e a destrución da cartilaxe articular, cambios do óso subcondral, a formación de osteófitos e con alteracións inflamatorias intraarticulares que involucran á articulación completa (Figura 2) <sup>17-20</sup>.

A OA afecta aproximadamente ao 10%-15% da poboación, sendo a incidencia máis alta en mulleres e a partir dos 60 anos <sup>20,21</sup>. Este predominio aumenta coa esperanza de vida e cos factores de risco tales como o xénero, a obesidade, o estilo de vida, a xenética e os factores biomecánicos entre outros <sup>11,19,22</sup>.



**Figura 2: Articulación do xeonllo san e con artrose.** Representación dunha articulación san cos seus compoñentes (dereita) e dunha articulación artrósica acompañada das alteracións que provoca (esquerda). Imaxe obtida e modificada de: Osteoarthritis Research Society International [sede Web]. Nova Jersey: oarsi.org; 2013 [acceso 16 de Abril de 2018]. Disponible en: <https://www.oarsi.org/patients>.

### 1.2.1. A fisiopatoloxía da artrose

O envellecemento, o dano mecánico e a inflamación entre outros factores de risco mencionados anteriormente, provocan cambios na cartilaxe articular tanto a nivel celular como estrutural que levan á aparición e á progresión da OA<sup>5,18</sup>. A principal hipótese é que estes cambios se dan por un desequilibrio homeostático entre a síntese e a degradación dos principais compoñentes da MEC xunto coa escasa capacidade de rexeneración da cartilaxe articular<sup>23</sup>.

No tecido artrósico, obsérvase a destrución da cartilaxe e unha diminución celular que leva, por tanto, a perda das súas propiedades. Sumado a isto, na cartilaxe a concentración de proteoglicanos e coláxeno tipo II diminúe, mentres que incrementan outro tipo de coláxenos xunto coa calcificación e a síntese de metaloproteasas (MMPs) que degradan a MEC<sup>5,18</sup>.

Todas estas alteracións xogan un papel esencial na patoxénese da OA. Sen embargo, aínda que tradicionalmente a inflamación desencadeada

non se consideraba como un proceso da OA, esta é fundamental no desenvolvemento destas alteracións <sup>24</sup> (Figura 3).

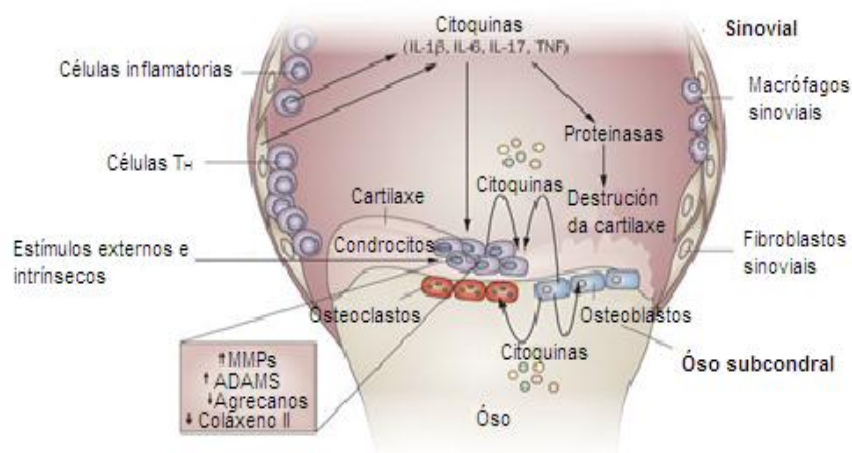
Entre os mediadores inflamatorios producidos polos condrocitos e os sinoviocitos destacan as citocinas proinflamatorias, os eicosanoides, as proteasas, os factores de crecemento, os radicais libres como o óxido nítrico (NO) e as adipocinas <sup>5,11,18,24</sup>.

As citocinas proinflamatorias máis estudadas son a interleucina-1 beta (IL-1 $\beta$ ) e o factor de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ). A IL-1 $\beta$  é máis abundante que o TNF- $\alpha$  e ambos actúan sinérxicamente, estimulando a expresión das MMPs e agrecanasas, incrementando a produción de NO e aumentando os niveis de prostaglandinas (PG) coma a PGE<sub>2</sub> <sup>5,11,24</sup>.

As MMPs son o grupo de encimas degradadoras da MEC máis activo, causando a hipertrofia dos condrocitos e a inflamación. Por outro lado, as PGE<sub>2</sub> responden ao dano tisular. Estas sustancias derivan do ácido araquidónico e son sintetizadas por medio da ciclooxixenasa (COX), especificamente por COX-2 na inflamación <sup>5</sup>.

Sumado a isto, o aumento na produción de NO é característica da OA, debido a un incremento na expresión de óxido nítrico sintasa inducible (iNOS; inducible nitric oxide synthase) estimulada polas citocinas inflamatorias e outros factores <sup>25</sup>. Este radical libre gasoso diminúe a síntese dos compoñentes da MEC e aumenta a de MMPs <sup>5</sup>. Ademais, estudos informan de que o NO pode causar a apoptose dos condrocitos que ocorre durante a progresión da OA <sup>26</sup>. A morte dos condrocitos está, a súa vez, correlacionada co dano da MEC <sup>26</sup>. Non obstante, a acumulación de especies reactivas de osíxeno (ROS; reactive oxygen species) derivadas do NO entre outros radicais libres, pódese deber tamén a unha disfunción da cadea respiratoria mitocondrial. Actualmente, xa está descrito que existe unha disfunción mitocondrial en condrocitos artrósicos a cal participa no estrés oxidativo, na apoptose celular e na inflamación que acontecen na OA <sup>27</sup>.





**Figura 3: Fisiopatología da OA.** O dano nos tecidos fai que se liberen mediadores inflamatorios á MEC e, os condrocitos en resposta inducen á liberación de encimas catabólicas que contribúen á progresión da OA. Xunto cos condrocitos, actúa a membrana sinovial acentuando máis a inflamación e a liberación de produtos proinflamatorios formando un bucle de retroalimentación positivo <sup>24,28</sup>. Imaxe obtida e modificada de Kapoor e colaboradores <sup>28</sup>.

Por outra parte, as células do sistema inmunitario como os macrófagos, poden activar e aumentar os niveis de factores de crecemento como o factor transformador do crecemento B (TGF-β) característico de moitas enfermidades fibróticas <sup>29</sup>. O TGF-β mellora a produción da MEC, a síntese de coláxeno e a proliferación celular <sup>23</sup>. Pola contra, a doses altas, estímúlase a formación de osteófitos, a fibrose sinovial, a esclerose do óso subcondral e a hipertrofia celular acentuando o dano articular <sup>29</sup>.

A inflamación da membrana sinovial non carece de importancia na fisiopatología da OA. Esta caracterízase pola afluencia de macrófagos e células T e niveis aumentados de factores de crecemento que promoven a neovascularización, a secreción de citoquinas proinflamatorias e a fibrose sinovial <sup>11,23</sup>.

A fibrose sinovial é un proceso caracterizado pola deposición excesiva de MEC debida á inflamación e ao dano dos tecidos volvendo ao tecido sinovial máis grosso e duro favorecendo a dor e a rixidez na OA <sup>15</sup>. O principal factor causante da fibrose é o mencionado TGF-β que ocasiona

un aumento da expresión de certas moléculas na MEC como o coláxeno I e a fibronectina. Si ben existen outros factores como as MMPs e as PGE<sub>2</sub><sup>15,29</sup>.

A pesar do mencionado anteriormente, os mecanismos fisiopatolóxicos subxacentes da OA non se coñecen completamente e, aínda que, existen diversos tratamentos que contribúen a mellorar os síntomas e a función articular, non existen terapias que poidan previr, atrasar ou deter completamente a progresión da enfermidade<sup>16,18</sup>.

### 1.3. OS FUCOIDANOS

Os fucoidanos son polisacáridos sulfatados con estrutura regular. Estes pódense extraer de invertebrados mariños como o orizo e o cogombro de mar ou de algas mariñas, maioritariamente de algas pardas, sendo aquí, máis complexos e heteroxéneos. Están compostos principalmente por L-fucosa e sulfato pero tamén conteñen proteínas, ácido urónico e outros monosacáridos como a glucosa ou a xilosa<sup>30-32</sup>. Actualmente, os fucoidanos son comúns en Asia onde se usan como produtos de cosmética, alimentos e incluso para o gando e a acuicultura<sup>33</sup>.

As algas pardas son o segundo tipo máis abundante de algas mariñas, onde os fucoidanos forman parte da estrutura das súas paredes celulares constituíndo o 5%-10% do seu peso seco. Existen diferentes tipos de especies de algas pardas como son o *Fucus vesiculosus*, *Macrocystis pyrifera* e *Undaria pinnatifida*<sup>34</sup>. O fucoidano procedente de *Fucus vesiculosus* é o máis simple en canto á súa composición química. Está composto por un alto contido en fucosa e sulfato. Mentres que, *Undaria pinnatifida* e *Macrocystis pyrifera* presentan fucoidanos máis complexos dado a que presentan ademais, galactosa en altas porcentaxes (sobre todo *Undaria pinnatifida*), e outros monosacáridos. No referente ao seu peso molecular, tamén amosan diferenzas; o *Fucus vesiculosus* ten un peso molecular baixo de 20,7 kDA mentres que *Undaria pinnatifida* e *Macrocystis pyrifera* teñen pesos moleculares maiores de 51,7 e 176,4 kDA respectivamente<sup>33, 34</sup>.

### 1.3.1. Propiedades biolóxicas

Os fucoidanos extraídos destas especies nomeadas son amplamente estudados xa que presentan diversas actividades biolóxicas como son as anticoagulantes, antitumorais, inmunomoduladoras, antibacterianas e antiinflamatorias polo que son importantes como fonte terapéutica para distintas patoloxías <sup>30,32</sup>. A pesar disto, estas actividades poden variar en función da especie, o peso molecular, a composición, a estrutura molecular e dos procedementos de illamento <sup>30</sup>.

Hoxe en día, as propiedades máis estudadas e coñecidas destes polisacáridos son a actividade antitumoral, a inmunomoduladora e a anticoagulante. Observouse, por exemplo, que os fucoidanos poden inhibir a proliferación das células tumorais <sup>35-37</sup>, e inducir á produción de citoquinas proinflamatorias como a interleucina e TNF- $\alpha$  <sup>38</sup>.

Sumado a isto, o potencial antiinflamatorio deles é o menos investigado. Non obstante, hai estudos “in vitro” que amosan o papel dos fucoidanos na inflamación e, por tanto, dos seus efectos terapéuticos nalgunhas enfermidades inflamatorias. Entre os mecanismos antiinflamatorios dos fucoidanos atópanse os antioxidantes e a súa capacidade para modular as MMPs e as encimas proinflamatorias entre outros factores <sup>32</sup>.

Con todo, a pesar das publicacións realizadas ata o momento, a literatura existente é escasa e son necesarios un maior número de estudos que avalen o potencial destes para, nun futuro, podelos aplicar na práctica clínica. Xunto con isto, a maioría dos estudos sobre a actividade dos fucoidanos son noutras patoloxías distintas a OA, o que fai necesario estudar a súa implicación na patoxénese desta enfermidade. Así mesmo, a capacidade dos fucoidanos para modular as actividades biolóxicas pode variar en función da especie. Por este motivo, é importante investigar o potencial dos fucoidanos na procura de alternativas terapéuticas para esta patoloxía e realizar comparacións entre fucoidanos de distintas especies para avaliar cal é o que presenta un mellor efecto na OA.

## 2. OBXECTIVOS

O obxectivo xeral deste estudo foi o seguinte:

- Avaliar “in vitro” os efectos antiinflamatorios, antioxidantes e antifibróticos de 3 fucoidanos (*Fucus vesiculosus*, *Macrocystis pyrifera* e *Undaria pinnatifida*) no metabolismo de condrocitos e sinoviocitos humanos estimulados con diferentes mediadores catabólicos, e comparar os diferentes fucoidanos entre si.

Os obxectivos específicos foron:

- Valorar a viabilidade dos condrocitos e sinoviocitos incubados con concentracións crecentes dos fucoidanos e diferentes estímulos.
- Estudar a actividade antioxidante dos fucoidanos e as súas doses para reducir a produción de NO inducido por IL-1 $\beta$  nas células articulares.
- Avaliar a efecto protector dos fucoidanos en condrocitos humanos fronte a disfunción mitocondrial inducida con antimicina A (AA).
- Determinar o efecto dos fucoidanos e das súas concentracións na resposta inflamatoria estimulada por IL-1 $\beta$  nas células articulares.
  - Estudar a súa modulación na expresión de mediadores inflamatorios como COX-2 e PGE<sub>2</sub> e sobre a expresión de hemoxigenasa 1(HO-1).
- Analizar o impacto dos diferentes fucoidanos sobre a fibrose sinovial inducida por TGF- $\beta$  en sinoviocitos humanos.
  - Avaliar a súa activade sobre a proliferación de sinoviocitos.
  - Examinar o seu efecto na expresión xénica e fenotípica de marcadores fibróticos.

### **3. METODOLOXÍA**

Este estudo experimental “in vitro” realizouse no Instituto de Investigación Biomédica de A Coruña (INIBIC), dende xaneiro a xuño do 2018.

#### **3.1. OBTENCIÓN DAS MOSTRAS**

As mostras que se empregaron para este estudo obtivéronse de cartilaxe articular e de membrana sinovial humanas procedentes de pacientes diagnosticados de OA que se someteron a cirurxía, amputacións ou a substitucións de cadeira ou de xeonllo no Complexo Hospitalario Universitario de A Coruña (CHUAC). A media da idade dos doantes de cartilaxe foi de  $72 \pm 6$  anos (3 homes e 3 mulleres) e a dos doantes de membrana sinovial de  $79 \pm 1$  anos (3 homes).

O procedemento de obtención das mostras foi aprobado polo Comité Ético de Investigación de Galicia e cumpre os requisitos éticos da Lei 14/2007 de Investigación Biomédica e da Declaración de Helsinki. Para todas as mostras incluídas no estudo obtívose o consentimento informado de cada donante (ANEXO I) e todas foron tratadas de forma anónima.

#### **3.2. CULTIVO PRIMARIO DE CONDROCITOS**

Unha vez que chegaron as mostras da cartilaxe articular, os condrocitos illáronse como se describiu previamente<sup>39</sup>. En primeiro lugar, a cartilaxe separouse do óso, lavouse con soro salino (Fresenius Kabi, Barcelona, España) e picouse en pequenas pezas coa axuda dun bisturí. Logo, realizouse unha dixestión encimática con 0.5 miligramos/mililitro (mg/mL) de tripsina (Sigma-Aldrich, San Luis, Estados Unidos) durante 10 minutos (min) a 37 °C en axitación. Posteriormente, retirouse o medio para dixerir a mostra con 2 mg/mL de colaxenasa tipo IV (Sigma-Aldrich) en medio *Dulbecco's modified Eagle's medium* (DMEM) (Lonza, Verviers, Bélxica) suplementado con 5% de soro bovino fetal (SBF) (Gibco, Life technologies, Pasley, Inglaterra) e 1% dunha mestura de antibióticos (Gibco) de penicilina e estreptomicina (P/S) (100 unidades/mL de penicilina e 100 microgramos/mililitro ( $\mu\text{g/mL}$ ) de estreptomicina) durante

12-16 horas (h) en axitación. Tras este tempo, centrifugouse a mostra a 1800 rpm durante 10 min e o pellet obtido resuspendeuse en DMEM con 10% de SBF e 1% de P/S para cultivo, finalmente, en frascos de cultivo de 162 cm<sup>2</sup> (Costar, Nova York, Estados Unidos) que se incubaron en estufas “*inCu-Safe*” a 37° C humedecidas con 5 % de CO<sub>2</sub>. Cando as células alcanzaron unha confluencia do 80-90%, levantáronse con tripsina-ácido etilendiaminotetracético (*EDTA*) (Sigma-Aldrich) ao 2% e realizáronse subcultivos en DMEM 10 %. Todos os experimentos realizáronse no 2º subcultivo de condrocitos.

### **3.3. CULTIVO PRIMARIO DE SINOVIOCITOS**

A membrana sinovial lavouse con soro salino, separouse dos tecidos circundantes raspando e cortouse en anacos pequenos cun bisturí. Logo procedeuse como se describiu en estudos previos <sup>40</sup>. Brevemente procedeuse cunha dixestión encimática con tripsina 1.25 mg/mL (Sigma-Aldrich) en axitación durante 1 h a 37 °C. A continuación, realizouse unha centrifugación durante 10 min a 1800 rpm, retirouse o medio e as células foron resuspendidas en medio *Roswell Park Memorial Institute medium* (RPMI) (Lonza) enriquecido con 20 % SBF, 1 % P/S e 0.12 UI/ml de insulina humana (Novo Nordisk, Bagsværd, Dinamarca). Para rematar, cultiváronse en frascos de cultivo de 162 cm<sup>2</sup> que se incubaron en estufas a 37° C humedecidas con 5 % de CO<sub>2</sub>. Cando alcanzaron a confluencia, os subcultivos de sinoviocitos fixéronse da mesma maneira que os de condrocitos cambiando o medio RPMI a DMEM 10%. Todos os experimentos de sinoviocitos foron entre os pases 3 e 6.

### **3.3. PREPARACIÓN DOS FUCOIDANOS**

As mostras dos fucoidanos das algas *Fucus vesiculosus* (en cru), *Macrocystis pyrifera* (pureza > 85) e *Undaria pinnatifida* (pureza > 95) de Sigma-Aldrich, disolvéronse en auga, previamente esterilizada cun filtro de poro estéril de 0.22 micrómetros (µm) (Millipore, Cork, Irlanda). Logo, a solución esterilizouse de novo usando un filtro igual ó anterior e foron usados en fresco.

### 3.4. ESTIMULACIÓN CELULAR

Antes de realizar os experimentos, os sinoviocitos deplecionáronse con DMEM 0.5 % durante 24 h e, a continuación, os experimentos fixéronse con medio DMEM 0.5 %. Por outro lado, os condrocitos, deplecionáronse con DMEM 0.5 %, durante 48 h e os experimentos realizáronse con DMEM 0 % (non enriquecido con SBF). A baixa porcentaxe de SBF no medio fai que as células se manteñan nun estado quiescente. Todos os ensaios foron realizados tras 48 h da estimulación, agás a expresión proteica e xénica nos sinoviocitos que foi pasadas 24 h. As condicións empregadas nos experimentos foron as seguintes:

- **Basal ou control** nas que as células non estaban tratadas.
- **Fucoidanos**; as células estaban tratadas cos fucoidanos a diferentes concentracións (5 µg/mL, 30 µg/mL e 100 µg/mL).
- **IL-1β** (Sigma-Aldrich) a unha concentración de 5 nanogramos/mililitro (ng/ml) para inducir a resposta inflamatoria.
- **TGF-β** (Abcam, Cambridge, Inglaterra) a 10 ng/ml para inducir a fibrose sinovial.
- **Antimicina A (AA)** (Sigma-Aldrich), un inhibidor do complexo III da cadea respiratoria mitocondrial a unha concentración de 0.5 µg/ml.

### 3.5. ANÁLISE DA VIABILIDADE CELULAR E DA PROLIFERACIÓN

A viabilidade celular valorouse mediante un ensaio colorimétrico de MTT (Cell Proliferation Kit I, Roche, Mannheim, Alemania). Esta proba consiste na redución de bromuro 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difenil tetrazol (MTT) de cor amarela, a cristais de formazán de cor violeta por células metabolicamente activas. Desta forma a cantidade de células vivas é proporcional á cantidade de formazán producido.

Para levar a cabo este procedemento, empregáronse placas de 96 pocillos (Falcon, Nova York Estados Unidos) con  $5 \times 10^4$  condrocitos/pocillo e  $2,5 \times 10^4$  sinoviocitos/pocillo. Despois da estimulación, engadiuse a cada pocillo 10 microlitros (µl) do reactivo de MTT (0.5

mg/mL), a un volume de 100 µl/pocillo, incluíndo un pocillo sen células como control negativo, e incubouse na estufa a 37 °C durante 4 h. Tras este tempo, engadíronse 100 µl/pocillo da solución solubilizadora do kit para solubilizar os cristais de formazán. Logo, incubouse toda a noite a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> e cuantificouse a reacción producida nun lector de placas “NanoQuant Infinite M200” (Tecan, Männedorf, Suiza) a unha absorbancia de 570 nanómetros (nm) e outra de referencia a 630 nm. Cada condición fíxose por duplicado e os resultados obtidos expresáronse como a porcentaxe de formazán sintetizada tomando de referencia o basal cun 100 %.

O ensaio de proliferación realizouse de igual forma co MTT, a excepción de que os sinoviocitos foron estimulados con DMEM ao 2 % de SBF.

### **3.6. ANÁLISE DA ACTIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS FUCOIDANOS**

#### **3.6.1. Determinación de NO**

A determinación de óxido nítrico realizouse co reactivo de Griess (Enzo, Life Science, Madrid, España) nunha placa de 96 pocillos. Para isto, recolléronse 50 µl/pocillo dos sobrenadantes por duplicado e depositáronse nunha placa plana de 96 pocillos (Costar). Antes de engadir o reactivo, realizouse unha curva estándar con nitrito sódico 10 mM a diferentes concentracións decrecentes. A continuación, engadíronse 50 µl do reactivo de Griess nos pocillos, axitouse a placa durante 10 min e mediuse a cantidade de óxido nítrico no lector de placas “NanoQuant Infinite M200” a unha absorbancia de 570 nm.

#### **3.6.2. Análise do potencial de membrana mitocondrial por citometría de fluxo**

Para levar a cabo este experimento, usáronse placas de 24 pocillos (Costar) a razón de  $1,5 \times 10^5$  condrocitos/pocillo. Neste caso, a estimulación das células coas diferentes condicións foi de 2 h. Pasada 1 h e 30 min da estimulación, engadiuse un fluoróforo, tetrametilrodamina metil éster (TMRM; Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, Estados



Unidos) a unha concentración de 250 nanomolar (nM) e en condicións de obscuridade que se mantiveron ata finalizar o experimento. O TMRM trátase dunha sonda fluorescente e permeable nas células que se acumula nas mitocondrias activas con potenciais de membrana intactos e emite unha fluorescencia de cor vermella. Desta maneira, o sinal do fluoróforo emitida será maior nas mitocondrias polarizadas que nas mitocondrias despolarizadas.

A continuación, os condrocitos estimulados laváronse con soro salino e levantáronse con tripsina para recollelos en tubos de citometría (Falcon). Logo, centrifugáronse e resuspendéronse en tampón fosfato salino (PBS; phosphate buffered saline) (Gibco). Para rematar, analizáronse no citómetro FACsCalibur (BD Biosciencias, Nova Jersey, Estados Unidos) un total de 10000 eventos usando a canle FL-2. Os resultados analizáronse no software BD CellQuest Pro (BD Biosciencias) e expresáronse como a mediana da fluorescencia emitida.

### **3.6.3. Detección de ROS mediante citometría de fluxo**

Para avaliar a cantidade de ROS producida polos condrocitos estimulados con AA empregáronse 2 fluoróforos: o diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína (DCFH-DA) (Sigma-Aldrich) a unha concentración de 10 micromolar ( $\mu\text{M}$ ) e MitoSOX Red (Molecular Probes, Pasley, Inglaterra) a 5  $\mu\text{M}$  que se incubaron durante media hora antes de analizalos. O DCFH-DA é unha sonda celular non fluorescente que se desesterifica intracelularmente e convertese en 2',7'-diclorofluoresceína (DFC), un fluoróforo verde tras ser oxidado por ROS no citoplasma. Por outro lado, o MitoSOX é un colorante fluoroxénico que detecta de forma selectiva a produción de superóxido mitocondrial. Este reactivo é oxidado facilmente polo superóxido emitindo unha fluorescencia vermella. Esta proba realizouse nas mesmas condicións que o TMRM, coa diferenza de que o DCF analizouse no citómetro usando a canle FL-1 e a estimulación dos condrocitos incubados con MitoSOX foi de 1 h.

### **3.7. ANÁLISE DA EXPRESIÓN XÉNICA**

#### **3.7.1. Extracción de ARN e tratamento con ADNasa**

O ARN total illouse de sinoviocitos cultivados en placas de 6 pocillos (Costar) a razón de  $2,5 \times 10^5$  células/pocillo. Para extraer o ARN celular, empregouse o reactivo “Trizol Reagent” (Invitrogen) seguindo as instrucións do fabricante. O Trizol provoca a lise celular e engádese cloroformo para despois dunha centrifugación separar o ARN nunha fase acuosa que se recolle para un tubo de PCR (Eppendorf, Hamburgo, Alemaña). Máis tarde, o isopropanol ocasiona a precipitación do ARN e este é lavado con etanol ao 75 %. Finalmente, o ARN illado dissolveuse en 15  $\mu$ l de auga e cuantificouse no espectómetro “NanoDROP ND-1000” (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Estados Unidos) a 260 nm. A pureza e a calidade do ARN determinouse cos ratios 260/280nm e 260/230nm. Unha vez que o ARN foi resuspendido, as mostras conserváronse en frío.

A continuación, 1 $\mu$ g de ARN das mostras tratouse con desoxirribonucleasa (ADNasa) do kit “DNase I, RNase-free” (Thermo Fisher Scientific) co fin de eliminar os restos de ADN segundo o protocolo do fabricante e incubouse no termociclador “GeneAmp PCR System 9700” (Applied Biosystems, California, Estados Unidos).

#### **3.7.2. Retrotranscrición do ARNm**

A síntese do ADN complementario (ADNc) realizouse co kit “NZY First-Strand cADN Synthesis Kit” (Nzytech, Lisboa, Portugal) seguindo as recomendacións da casa comercial. O ARN resultante incubouse con 10  $\mu$ l dun tampón cos oligos e nucleótidos “NZRYT 2X Master Mix” e 2  $\mu$ l de retrotranscriptasa “NZRYT Enzyme Mix” no termociclador en 3 ciclos (25°C durante 10 min, 50°C durante 30 min e 85°C durante 5 min). Por último, engadiuse 1  $\mu$ l de ribonucleasa “NZY Rnase H” e incubouse a 37°C durante 20 min. O ADNc amplificado almacenouse a -20 °C ata a súa utilización para a reacción en cadea da polimerasa cuantitativa (qPCR; quantitative polymerase chain reaction).

### 3.7.3. qPCR a tempo real

A amplificación do ADNc para cada xene realizouse por duplicado en placas de PCR de 96 pocillos (LightCycler 4800, Roche Diagnostics, Basilea, Suiza) no termociclador “LightCycler 4800 Instrument Roche Applied Science”. Cada pocillo levaba unha mestura con 5  $\mu$ l de SyberGreen (LightCycler 4800 SYBR Green I Master kit, Roche Diagnostics), 0.15  $\mu$ l de cada un dos cebadores (directo e reverso) para unha concentración de 0.3  $\mu$ M, 2  $\mu$ l do ADNc obtido na retrotranscrición e agua ata completar un volume final de 10  $\mu$ l.

Os cebadores para a análise da expresión xénica da fibronectina (FN1) e o coláxeno 1 (COL1A1) implicados na fibrose sinovial amósanse na Táboa I. A cuantificación relativa da expresión destes xenes normalizouse cun xene de referencia, o hipoxantina fosforibosil transferasa 1 (HPRT1), estable a todas as condicións estudadas. A estabilidade deste xene determinouse en estudos previos mediante o algoritmo estatístico geNORM.

XENE	CEBADOR DIRECTO (5´-3´)	CEBADOR REVERSO (5´-3´)
COL1A1	CTGGCCCCATTGGTAATGT	ACCAGGGAAACCAGTAGCAC
FN1	CTGGCCGAAAATACATTGTAAG	CCACAGTCGGGTCAGGAG
HPRT1	CAAGCGGATGAACACCAAC	TGTGGGGCAGCATACCTC

**Táboa I: Cebadores directos e reversos utilizados coas súas secuencias.**

As reaccións da qPCR consistiron en 3 fases: 1ª Incubación a 95 °C durante 10 min, 2ª Amplificación formada por 52 ciclos. Cada ciclo conta cunha fase de desnaturalización (95 °C 10 segundos (s)), hibridación (60°C, 10s) e extensión (72°C 10 s), 3ª Temperatura de melting ou de fusión: a 95°C 5 s, 60°C durante 1 min e logo aumentouse a temperatura lentamente ata 97°C e 4ª Arrefriamente durante 20 s a 40°C. Os datos visualizáronse no programa “Light Cyler 480 Software” (Roche) e analizáronse co método  $\Delta\Delta C_t$  normalizando as condicións respecto ó basal co valor de 1.

## **3.8. ANÁLISE DA EXPRESIÓN PROTEICA**

### **3.8.1. Western Blot**

Antes de comezar, fíxose a extracción das proteínas de células cultivadas en placas de 6 pocillos con  $5 \times 10^5$  condrocitos/pocillo e  $2,5 \times 10^5$  sinoviocitos/pocillo. En primeiro lugar, laváronse os pocillos con soro salino e recolléronse cun tampón de lise (Táboa II) ao que se lle engadiu un 1% de fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF 0.1 M) e un 1% de un cóctel inhibidor de proteasas (Sigma-Aldrich). Logo, as mostras fervéronse a 100°C durante 10 min nun bloque térmico, centrifugáronse e recolleuse o sobrenadante coas proteínas a un novo tubo (Eppendorf). Finalmente, as proteínas foron cuantificadas no “Nanodrop ND-1000” (Thermo Fisher Scientific) a unha absorbancia de 280 nm. Todo o procedemento realizouse en frío para evitar a degradación das proteínas.

#### **3.8.1.1. Electroforese e transferencia**

Posteriormente, procedeuse a unha electroforese desnaturalizante en xeles de acrilamida (SDS-PAGE: *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) de 1,5 mm de grosor. Usáronse xeles cun 10% de acrilamida/bisacrilamida ao 30% (Sigma-Aldrich) na parte separadora do xel e cun 4 % na concentradora. En cada pocillo do xel, cargáronse un total 20 µg de proteínas tratadas cun tampón de carga 1X (Táboa II) que se ferveu previamente a 100 °C durante 5 min. A electroforese fíxose a unha voltaxe de 80 V durante 2 h nunha cubeta de electroforese (Bio Rad, California, Estados Unidos) á cal se lle engadiu un tampón de electroforese ao 1% (Táboa II). Así, as proteínas separáronse en función do seu peso molecular migrando dende o polo negativo ao polo positivo.

As proteínas xa separadas transferíronse a unha membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF) 6 x 8 cm<sup>2</sup> (Milipore, Massachusetts, Estados Unidos) previamente activada con metanol e deixouse nunha cubeta con tampón de transferencia 1 % (Táboa II) co 10 % de metanol. O xel tamén se tratou con este tampón durante 15 min a 4°C. A continuación,

procedeuse a unha transferencia semi-húmida das proteínas no aparello “Transblot semi-dry Transfer Cell” (Bio Rad) a 20 V durante 45 min. Unha vez feita, a membrana mergullouse nunha solución de Ponceau (Sigma-Aldrich) para verificar que a transferencia se realizou correctamente.

TAMPÓNS USADOS	COMPOSICIÓN
Tampón de lise	0.2 M de Tris-HCl pH 6.8, 2 % de SDS (dodecil sulfato sódico) e 20 % de glicerol
Tampón de carga 1X	10 % SDS, 200mM Tris-HCl pH 6.8, 50 % glicerol, 0.1 % azul de bromofenol e 10 % de $\beta$ -mercaptetanol
Tampón de electroforese 10 %	30.3 g de tricina base, 14g de glicina e 10 g de SDS.
Tampón de transferencia 10 %	59 tricina base, 29 g de glicina e 3.7 g de SDS.
Tampón de lavado 10 %	2mM de tricina base e 150 mM de cloruro de sodio cun pH final de 7.5.

**Táboa II: Tampóns usados no Western Blot e a súa composición.**

### 3.8.1.2. Inmunodetección

Finalizada a transferencia, a membrana bloqueouse cun tampón de bloqueo composto por leite ao 5% e tampón de lavado ao 1% (Táboa II) cun 0.05% de Tween 20 (Sigma-Aldrich) durante 40 min en axitación para evitar unións inespecíficas. Posteriormente, incubouse cos anticorpos primarios fronte ás proteínas de interese (Táboa III) diluídos no tampón de bloqueo. Esta incubación realizouse a 4°C, durante toda a noite en rotación. Tras a 1ª incubación, lavouse a membrana con tampón de lavado (3 lavados de 5 min) e incubouse cos anticorpos secundarios conxugados con peroxidasa durante 1 h en rotación a temperatura ambiente. Despois, a membrana lavouse de novo (5 lavados de 5 min) e revelouse por quimioluminiscencia con “Luminata Classico Western HRP substrate” (Milipore, Billerica, Estados Unidos), no equipo “Amersham imager 600” (GE Healthcare, Amersham, Reino Unido). A cuantificación da intensidade das bandas obtidas realizouse por densitometría co programa informático “Image Quant 5.2” (GE Healthcare, Waukesha, Estados Unidos), normalizando as proteínas analizadas coa expresión de tubulina que se usou como control.

ANTICORPOS 1 <sup>ARIO</sup>	DILUCIÓN	ANTICORPOS 2 <sup>ARIO</sup>	DILUCIÓN
<b>HO-1</b> (Enzo)	1:1000	<b>Anti-coello</b> (GE Healthcare)	1:1000
<b>iNOS</b> (RD Systems, Mineápolis, Estados Unidos)	1:100	<b>Anti-rato</b> (GE Healthcare)	1:500
<b>COX-2</b> (RD Systems)	1:250		
<b>Tubulina</b> (Sigma-Aldrich)	1:1000		

**Táboa III: Anticorpos coas súas respectivas dilucións usados para a análise de expresión proteica.**

### 3.9. ENSAIO DE ELISA

A cuantificación de PGE<sub>2</sub> liberadas polas células ao medio fíxose mediante ensaios de inmunoabsorción ligado a encimas (ELISA: Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay). Os sobrenadantes de cada condición por duplicado recolléronse de placas de 96 pocillos e gardáronse a -20°C ata o momento da realización do ensaio. Logo procedeuse a realizar un ensaio de ELISA competitivo seguindo o protocolo da casa comercial (Cayman Chemical, Ann Arbor, Estados Unidos). A medición fíxose a unha absorbancia de 405 nm no lector de placas “NanoQuant Infinite M200”.

### 3.10. ANÁLISE DO FENOTIPO CELULAR

#### 3.10.1. Inmunocitoquímica

Os sinoviocitos destinados para determinar a expresión de  $\alpha$ -actina do músculo liso ( $\alpha$ -SMA; alfa smooth muscle actin) cultiváronse en portaobxectos con soporte para 8 pocillos “chambers slides” (Milipore) de 8 pocillos con  $1,5 \times 10^4$  células/pocillo. Despois da estimulación, os sinoviocitos laváronse con soro salino e fixéronse con 100  $\mu$ l/pocillo de acetona durante 10 min a 4°C. Logo, as células fixadas foron lavadas de novo con PBS 3 veces e deixáronse secar a temperatura ambiente para gardalas a -20°C ata a súa utilización.

Para o ensaio inmunocitoquímico, laváronse os portaobxectos con PBS e bloqueouse a actividade da peroxidasa endóxena cunha solución

inhibidora deste encima (Dako Real, Madrid, España) durante 10 min. Tras unha incubación cun tampón de bloqueo (PBS e 1% de albúmina de soro bovino (BSA; bovine serum albumin)) durante media hora, engadíronse 100  $\mu$ l/pocillo do anticorpo primario de  $\alpha$ -SMA nunha dilución 1:500 (Sigma-Aldrich) en tódolos pocillos, agás no control negativo, durante 1 h a temperatura ambiente. A continuación, tras outro lavado con PBS coma os anteriores, incubáronse todas as condicións co anticorpo secundario (100 $\mu$ l) conxugado con peroxidasa “Labeled polymer-HRP” (Dako Real) durante 30 min a temperatura ambiente. Posteriormente, lavouse outras 3 veces con PBS e preparouse o cromóxeno con 3,3-diaminobencidina (DAB) (Dako Real) que se engadiu durante uns 2-3 min. A reacción do DAB freouse con auga destilada. De seguido, as células contratinguíronse con hematoxilina de Gill III a cal se deixou actuar 2 min e aclaráronse con auga corrente e destilada. Finalmente, as mostras deshidratáronse con alcois de graduación crecente (75 $^{\circ}$ , 96 $^{\circ}$ , 100 $^{\circ}$ ) e xilol para montalas nun cubreobxectos con resina “DePeX” (BDH chemicals, Darmstadt, Alemaña). Os sinoviocitos observáronse no microscopio “Olympus BX61” (Olympus Biosystems, Tokio, Xapón) e a positividade cuantificouse mediante o programa “Image J versión 1.50” (National Institutes of Health, Bethesda, Estados Unidos).

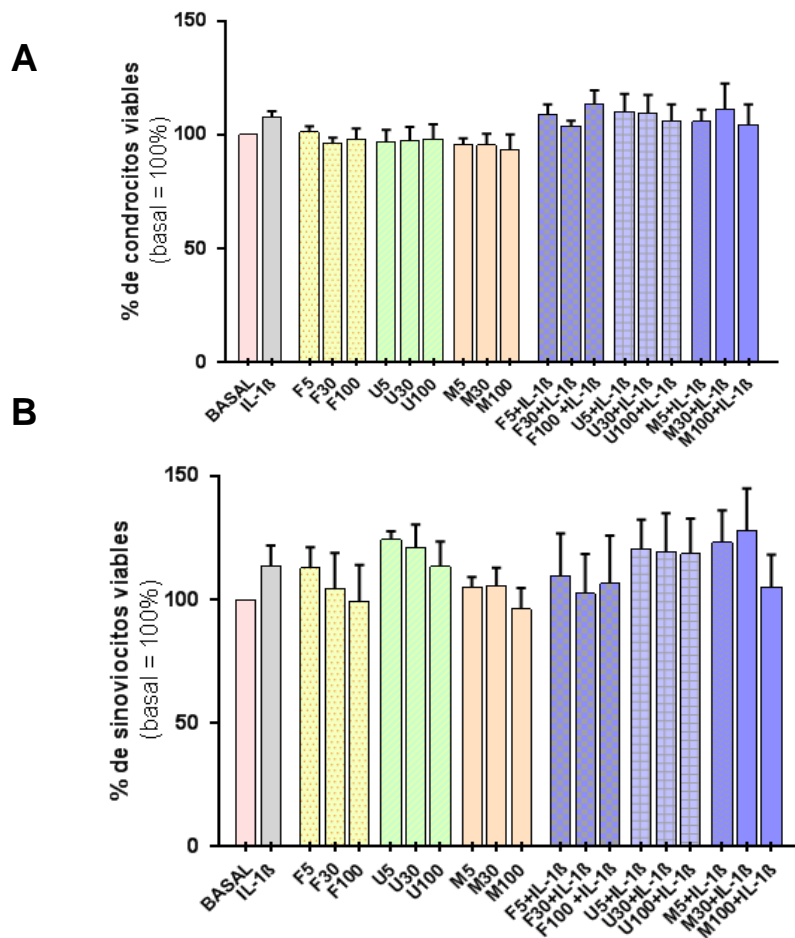
### **3.11. ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Os datos expresáronse como a media  $\pm$  error estándar da media (EEM). A análise estatística dos datos realizouse co programa GraphPad Prism 7 (GraphPad Software, La Jolla, Estados Unidos) aplicando probas de análise de varianza (ANOVA; analysis of variance) co test de Friedman. Todos os test foron realizados cunha formulación bilateral considerando estatisticamente significativos valores de  $p < 0.05$ .

## 4. RESULTADOS

### 4.1. ANÁLISE DA VIABILIDADE CELULAR

Para valorar se os fucoidanos afectan a viabilidade celular dos condrocitos e sinoviocitos realizouse un ensaio de MTT. Para isto, as células cultiváronse durante 48 h con concentracións crecentes dos fucoidanos na presenza ou ausencia de IL-1 $\beta$ , un estímulo que se empregará nos seguintes experimentos.



**Figura 4: Histogramas da viabilidade celular.** As células articulares estimuláronse cos fucoidanos procedentes de *Fucus vesiculosus* (F) *Undaria pinnatifida* (U) *Macrocytis pyrifera* (M) as concentracións crecentes de (5, 30 e 100  $\mu\text{g/mL}$ ) en presenza ou ausencia de IL-1 $\beta$  para valorar a viabilidade celular mediante MTT. Cada columna amosa a porcentaxe de células viables (basal = 100%). Os resultados exprésanse como a media  $\pm$  EEM. **A:** Condrocitos (n=5 experimentos independentes por duplicado). **B:** Sinoviocitos (n=4 experimentos independentes por duplicado).



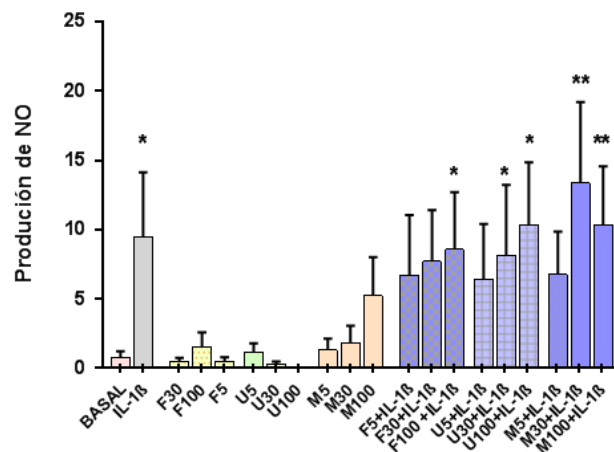
Como se visualiza nas Figura 4 A e 4B, ningún dos estímulos empregados alterou significativamente a viabilidade celular respecto á condición basal (condrocitos e sinoviocitos sen tratar). Non obstante, pódese ver que nos sinoviocitos tratados con fucoidanos a 100 µg/mL decaeu a porcentaxe de células viables, pero esta diferenza non chega a ser significativa.

En resumo, os resultados obtidos amosan que os fucoidanos non foron citotóxicos, polo que se consideraron seguros nos nosos seguintes experimentos en condrocitos e sinoviocitos artrósicos.

## 4.2. ACTIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS FUCOIDANOS

### 4.2.1. Determinación de NO

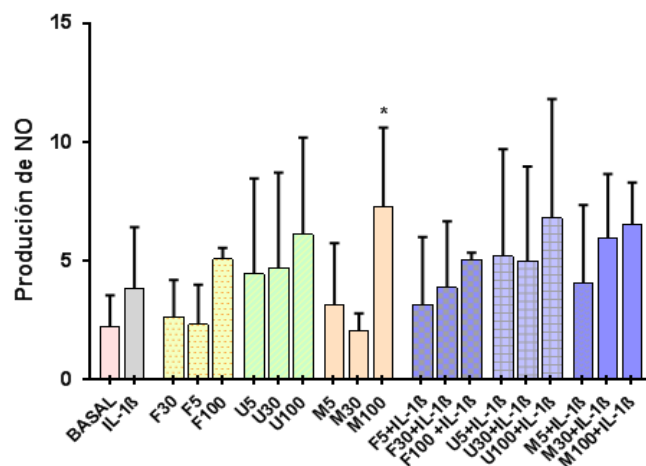
Para determinar o efecto dos fucoidanos sobre a produción de NO usouse o método de Griess. Como control positivo da produción de NO, as células estimuláronse con IL-1 $\beta$ . Nos condrocitos (Figura 5) observouse que IL-1 $\beta$  provoca un aumento na síntese de NO mentres que os fucoidanos por si só non inducen a súa produción, excepto o de *Macrocytis pyrifera* a 100 µg/mL.



**Figura 5: Representación gráfica da produción de NO.** Os condrocitos foron estimulados durante 48 h coas diferentes concentracións dos fucoidanos (5, 30 e 100 µg/mL) en presenza ou ausencia de IL-1 $\beta$  para determinar a produción de NO co método de Griess. Os datos exprésanse como a media  $\pm$  EEM (n=3 Experimentos independentes por duplicado, \*p<0.05 versus (vs.) basal, \*\*p<0.01 vs. basal). F: *Fucus vesiculosus*, U: *Undaria pinnatifida* e M: *Macrocytis pyrifera*.

Ademais, os resultados obtidos nos condrocitos amosaron que a dose de 5  $\mu\text{g/mL}$  (sobre todo de *Undaria pinnatifida*) é a que conseguiu diminuír máis claramente o NO inducido por IL-1 $\beta$ , pero sen alcanzar diferenzas significativas. En xeral, a concentración de 30  $\mu\text{g/mL}$ , agás do *Macrocystis pyrifera*, é a seguinte que máis atenúa o NO en presenza desta citoquina. Pola contra, as doses de 100  $\mu\text{g/mL}$  non presentaron un efecto protector fronte á produción de NO.

Por outra parte tamén se valorou a síntese de NO nos sinoviocitos seguindo a mesma estratexia experimental (Figura 6).



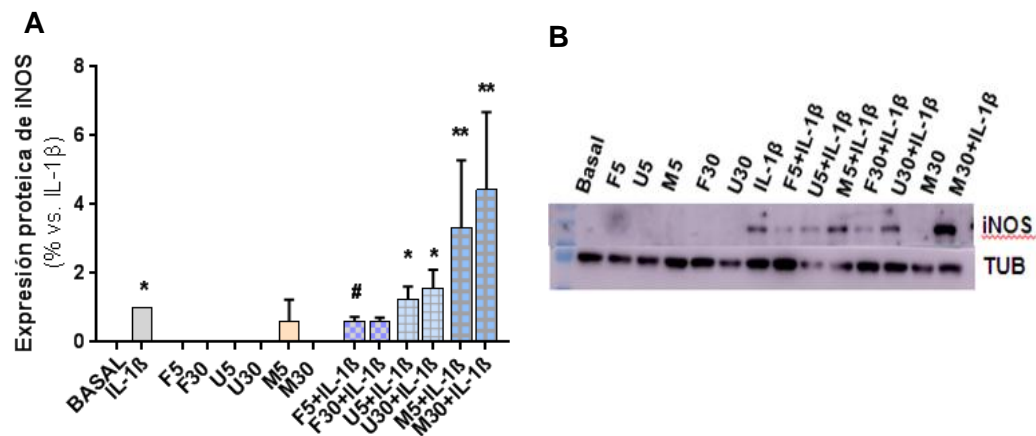
**Figura 6: Producción de NO en sinoviocitos.** Os sinoviocitos foron estimulados durante 48 h coas diferentes concentracións dos fucoidanos (5, 30 e 100  $\mu\text{g/mL}$ ) en presenza ou ausencia de IL-1 $\beta$  para determinar a produción de NO co método de Griess. Os datos exprésanse como a media  $\pm$  EEM ( $n=3$  experimentos independentes por duplicado,  $*p<0.05$  vs. basal). F: *Fucus vesiculosus*, U: *Undaria pinnatifida* e M: *Macrocystis pyrifera*

O ensaio de NO en sinoviocitos revelou que a síntese de NO por IL-1 $\beta$  foi débil, polo que a modulación atopada cos fucoidanos apenas foi apreciable. O único fucoidano que conseguiu diminuír a síntese de NO respecto a IL-1 $\beta$  ( $3.83\pm 2.60$ ) foi o de *Fucus vesiculosus* a 5  $\mu\text{g/mL}$  ( $3.13\pm 2.88$ ), aínda que non é estatisticamente significativo. Contrariamente, todas as concentracións de 100  $\mu\text{g/mL}$  dos polisacáridos foron as que máis aumentaron a produción deste radical.

Os resultados nas células articulares coincidiron en que a dose 100 µg/mL non presenta efectos beneficiosos e nalgúns casos prexudiciais. Por tanto, seleccionáronse as doses de 5 e 30 µg/mL como as concentracións óptimas para continuar o estudo.

#### 4.2.2. Efecto na expresión proteica de iNOS

O incremento da síntese de NO por IL-1β é mediada principalmente pola regulación na expresión de iNOS. Polo que para corroborar os resultados previamente obtidos, avalíouse a expresión proteica desta encima. Para esta análise, os condrocitos foron incubados cos ditos polisacáridos a doses de 5 µg/mL e 30 µg/mL en presenza ou ausencia de IL-1β.



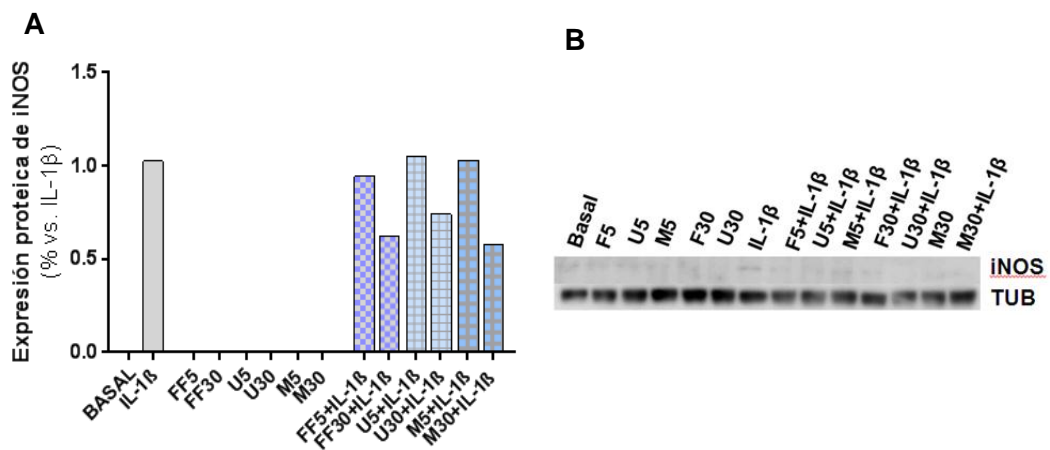
**Figura 7: Expresión proteica de iNOS en condrocitos.** A expresión de iNOS cuantificouse mediante Western Blot tras 48 h de estimulación con IL-1β (control positivo) e as doses correspondentes dos distintos fucoidanos (5 e 30 µg/mL) procedentes de *Fucus vesiculosus* (F) *Undaria pinnatifida* (U) *Macrocystis pyrifera* (M). **A:** Histograma onde os valores se expresan como a media ± EEM (n= 3 experimentos independentes \*p<0.05 vs. basal, # p<0.05 vs. IL-1β, \*\*p>0.01 vs. basal). **B:** Imaxe representativa da membrana do Western Blot de iNOS e tubulina (TUB).

Como se visualiza na Figura 7, o de *Fucus vesiculosus* foi o único fucoidano capaz de reducir a expresión de iNOS respecto ao control positivo (IL-1β: 1). De feito, a dose de 5 µg/mL (0,60±0.13) reduciu de forma estatisticamente significativa a expresión da encima.

Por outra parte, as concentracións analizadas do *Undaria pinnatifida* e *Macrocystis pyrifera* incrementaron a produción de iNOS incluso máis que IL-1 $\beta$ .

Tendo en conta a análise dos resultados feitos ata agora, pódese observar que nos condrocitos a concentración de 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  dos fucoidanos foi a que mellor reduciu a resposta inflamatoria inducida. Sumado a isto, viuse que o *Fucus vesiculosus* a unha concentración de 30  $\mu\text{g}/\text{mL}$  tamén foi capaz de diminuír a expresión proteica de iNOS polo que se decidiu continuar o estudo comparando os fucoidanos a unha dose de 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  e do *Fucus vesiculosus*, a maiores, a unha concentración de 30  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

Adicionalmente (segundo a mesma estratexia experimental) tamén se a analizou a expresión proteica de iNOS nos sinoviocitos.



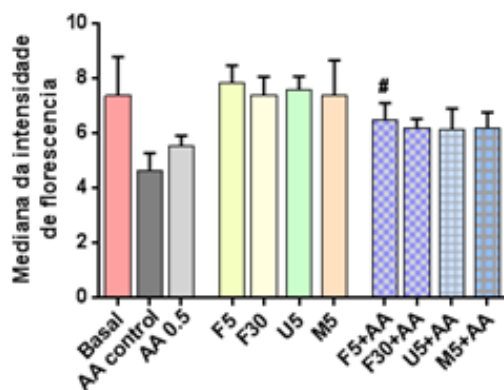
**Figura 8: Representación da expresión proteica de iNOS en sinoviocitos.** A expresión de iNOS nos sinoviocitos cuantificouse por WEstern Blot tras 24 h de estimulación con IL-1 $\beta$  (control positivo) e as doses correspondentes dos fucoidanos (5 e 30  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) procedentes de *Fucus vesiculosus* (F) *Undaria pinnatifida* (U) *Macrocystis pyrifera* (M). **A:** Histograma cos valores dun 1 experimento. **B:** Imaxe representativa dos resultados do Western Blot de iNOS e tubulina (TUB).

Na Figura 8 pódese observar unha resposta dose-dependente, sendo as doses de 30  $\mu\text{g}/\text{mL}$  do *Macrocystis pyrifera* e *Fucus vesiculosus* as que presentaron valores máis baixos de iNOS. Non obstante, estes datos non

son suficientes para decantarse por unha dose a seguir, polo que nos seguintes estudos en sinoviocitos se continuou coas concentracións de 5 e 30  $\mu\text{g/mL}$ .

#### 4.2.3. Papel sobre o potencial de membrana mitocondrial

A disfunción mitocondrial considérase unha alteración que ten lugar nos condrocitos artrósicos e que está a participar na súa patoxénese. Entre outros procesos, esta alteración promove o estrés oxidativo e a acumulación de ROS. Por iso, decidiuse avaliar a posible acción protectora dos fucoidanos fronte á disfunción mitocondrial. O primeiro paso, foi analizar mediante citometría de fluxo o seu efecto sobre a despolarización mitocondrial co fluoróforo TMRM. A disfunción das mitocondrias induciuse mediante a incubación dos condrocitos cun inhibidor da cadea respiratoria mitocondrial (AA 0.5  $\mu\text{g/mL}$ ) e, a continuación, as células tratáronse cos fucoidanos mencionados durante 2 h. O control positivo foron os condrocitos estimulados con AA 10  $\mu\text{g/mL}$  que provocou unha maior despolarización da membrana.



**Figura 9: Representación do efecto dos fucoidanos na polarización mitocondrial.** Os condrocitos estimuláronse durante 2 h con AA na presenza das diferentes doses dos fucoidanos (5 e 30  $\mu\text{g/mL}$ ). 30 min antes de recoller as células engadiuse o TMRM. A continuación, determinouse a fluorescencia emitida mediante citometría de fluxo. Os resultados corresponden á mediana da intensidade da fluorescencia emitida e amósanse como a media  $\pm$  EEM de 3 experimentos independentes. (#  $p < 0.05$  vs. IL-1 $\beta$ ). F: *Fucus vesiculosus*, U: *Undaria pinnatifida* e M: *Macrocystis pyrifera*.

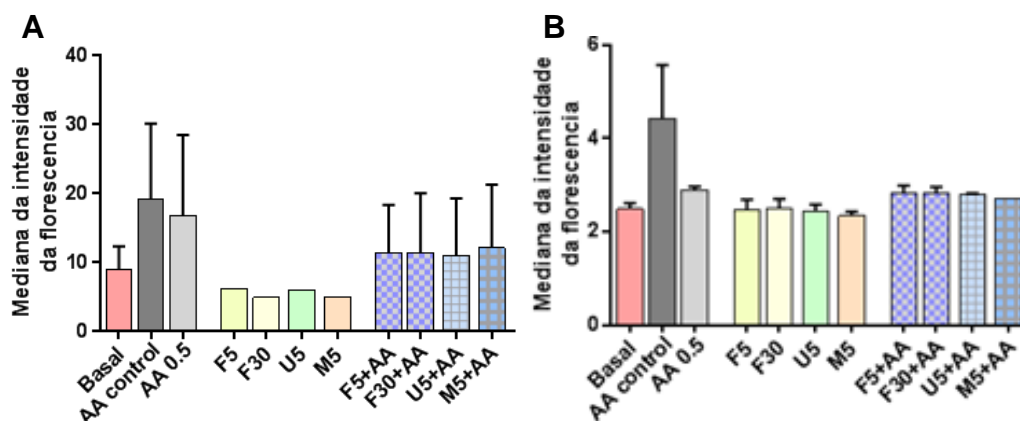
Na Figura 9 contéplase que todos os fucoidanos foron capaces de recuperar a polarización da membrana mitocondrial, especialmente o de *Fucus vesiculosus* 5 µg/mL que presenta unha diferenza estatisticamente significativa con respecto aos condrocitos con AA 0.5 µg/mL ( $p < 0.05$ ).

#### **4.2.4. Papel dos fucoidanos na diminución da produción de ROS**

Como xa se comentou, unha das consecuencias da disfunción mitocondrial e o incremento do estrés oxidativo e a produción de ROS. Por esta razón, tamén se quixeron detectar os ROS citoplasmáticos e o superóxido mitocondrial (principal ROS producido a nivel das mitocondrias) inducidos por AA. Para testar estes procesos, os condrocitos incubáronse durante 30 min cos fluoróforos DCF e MitoSOX red respectivamente. A fluorescencia emitida por estes valorouse mediante citometría de fluxo.

Tras a análise dos resultados viuse que os 3 fucoidanos reduciron os ROS citoplasmáticos inducidos pola condición con AA 0.5 µg/mL ( $16.81 \pm 8.24$ ). *Undaria pinnatifida* ( $11.04 \pm 5.82$ ) foi o que máis diminuíu o ROS producido seguido do *Fucus vesiculosus* 5 µg/mL ( $11.32 \pm 4.95$ ) e 30 µg/mL ( $11.38 \pm 6.10$ ), aínda que a diferenza entre todos os fucoidanos foi escasa (Figura 10A).

No referente ó superóxido mitocondrial (Figura 10B), as modulacións detectadas con AA 0.5 µg/mL foron moi pequenas ( $2.89 \pm 0.05$ ), polo que apenas se observaron os efectos dos fucoidanos sobre a síntese do radical. Porén, o de *Macrocystis pyrifera* (2.71) pareceu ser o que maiores reducións conseguiu en relación ó de *Fucus vesiculosus* ( $2.83 \pm 0.10$ ) e *Undaria pinnatifida* ( $2.78 \pm 0.02$ ).



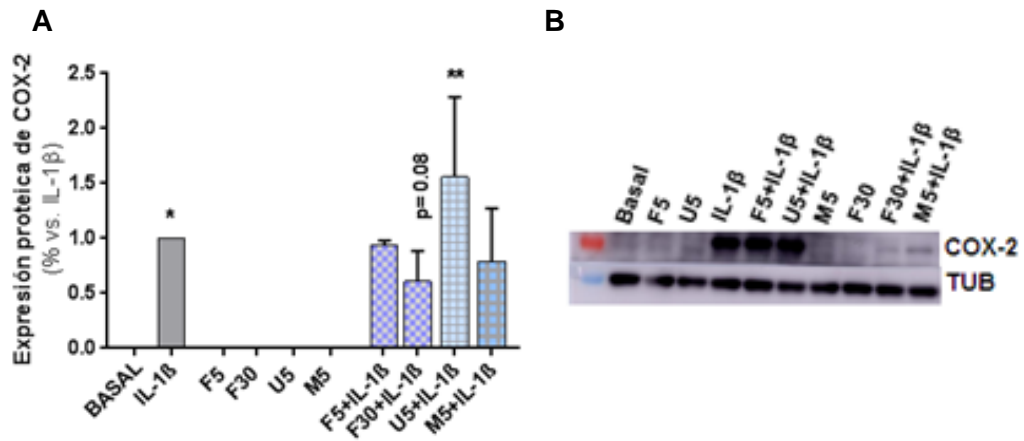
**Figura 10: Histograma da determinación de ROS en condrocitos.** Os condrocitos foron tratados durante 2 h (DCF; **A**) e 1 h (MitoSOX; **B**) co inhibidor mitocondrial (AA) e os fucoidanos procedentes de *Fucus vesiculosus* (F) *Undaria pinnatifida* (U) *Macrocystis pyrifera* (M) as doses de 5 e 30  $\mu\text{g/mL}$ . Para detectar os ROS xerados incubáronse cos seus respectivos fluoróforos 30 min antes de os analizar mediante citometría de fluxo. Os resultados corresponden á mediana da intensidade da fluorescencia emitida e amósanse como a media  $\pm$  EEM de 2 experimentos independentes.

### 4.3. EFECTO DOS FUCOIDANOS SOBRE A INFLAMACIÓN

#### 4.3.1. Efecto na expresión proteica de mediadores inflamatorios

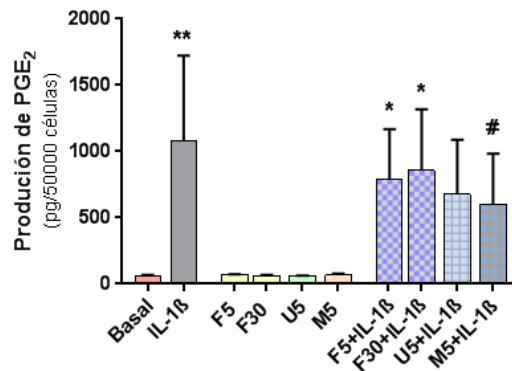
Para valorar a capacidade antiinflamatoria dos fucoidanos nas células articulares, cuantificouse a expresión proteica de COX-2, unha encima frecuente na inflamación e involucrada na síntese de  $\text{PGE}_2$ , molécula de carácter lipídico cuxa produción só se valorou nos condrocitos. Como condición control da súa produción, as células estimuláronse con IL-1 $\beta$  durante 48 h na presenza dos fucoidanos mencionados.

Nos resultados obtidos en condrocitos (Figura 11) obsérvase que o de *Fucus vesiculosus* 30  $\mu\text{g/mL}$  foi o polisacárido que máis reduciu a expresión de COX-2 inducida con IL-1 $\beta$ , case de maneira significativa ( $p=0.08$ ). Seguidamente, o de *Macrocystis pyrifera* tamén diminuíu a encima estudada pero de novo sen ver diferenzas significativas. O *Fucus vesiculosus* 5  $\mu\text{g/mL}$  apenas modificou a súa expresión, cuns valores semellantes aos de IL-1 $\beta$ . Por último, a incubación con *Undaria pinnatifida* incluso incrementou a súa produción .



**Figura 11: Expresión proteica de COX-2 en condrocitos.** A expresión de COX-2 cuantificouse mediante Western Blot transcorridas 48 h de estimulación dos condrocitos con IL-1 $\beta$  (control positivo) e os fucoidanos de *Fucus vesiculosus* (F), *Undaria pinnatifida* (U) e *Macrocystis pyrifera* (M) as doses de 5 e 30  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . **A:** Os valores do gráfico exprésanse como a media  $\pm$  EEM (n= 3 experimentos independentes \*p<0.05 vs. basal, \*\*p>0.01 vs. basal). **B:** Imaxe representativa da membrana do Western Blot analizado con COX-2 e tubulina (TUB).

Para constatar se os fucoidanos son capaces de reducir a liberación do produto de COX-2, PGE<sub>2</sub>, estudouse a súa produción mediante ELISA.

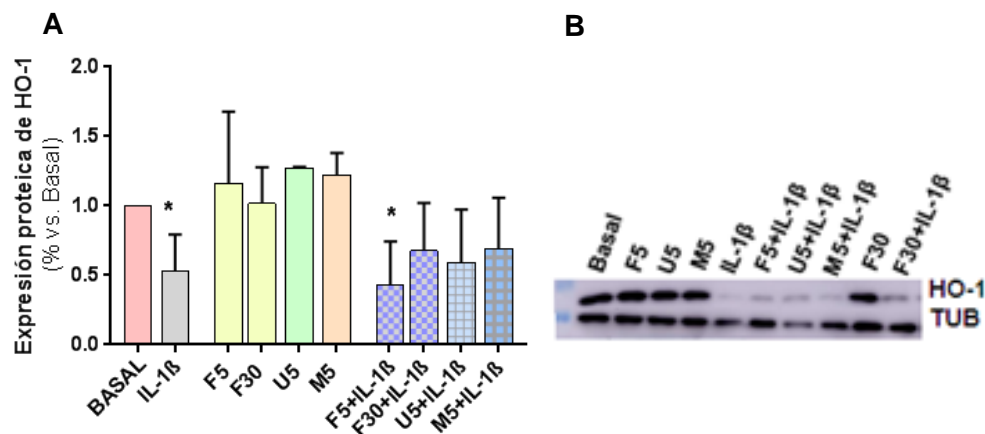


**Figura 12: Gráfico da produción de PGE<sub>2</sub>.** Os condrocitos estimuláronse coas concentracións dos fucoidanos (5 e 30  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) con e sen IL-1 $\beta$  durante 48 h. A cantidade de PGE<sub>2</sub> segregada cuantificouse por ELISA. Os resultados exprésanse como media  $\pm$  EEM (n=3 experimentos independentes \*\*p<0.01 vs. basal, \*p>0.05 vs. basal, # p<0.05 vs. IL-1 $\beta$ ). F: *Fucus vesiculosus*, U: *Undaria pinnatifida* e M: *Macrocystis pyrifera*



Na Figura 12 obsérvase como a estimulación con IL-1 $\beta$  provocou un aumento significativo da PGE<sub>2</sub>. Pola contra, a incubación cos fucoidanos reduciu a súa produción, sendo estas diferenzas significativas para o *Macrocystis pyrifera*.

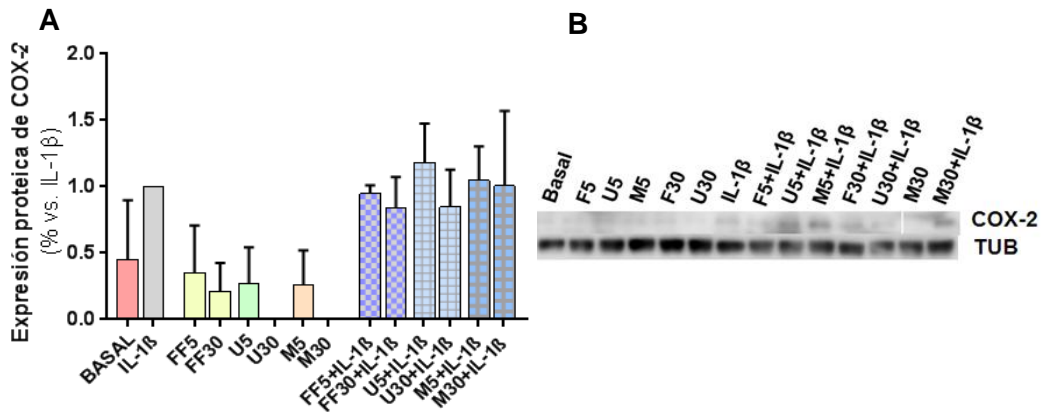
Finalmente, investigouse a expresión proteica de HO-1. Esta encima presenta un papel importante na resposta contra a inflamación e o estrés oxidativo. Polo que se decidiu avaliar se a modulación da inflamación polos fucoidanos se daba a través da HO-1.



**Figura 13: Expresión proteica de HO-1 en condrocitos.** A expresión de HO-1 determinouse mediante Western Blot tras 48 h da estimulación dos condrocitos cos diferentes fucoidanos derivados de *Fucus vesiculosus* (F), *Undaria pinnatifida* (U) e *Macrocystis pyrifera* (M) a concentracións de 5 e 30  $\mu$ g/mL en presenza ou ausencia de IL-1 $\beta$ . **A:** Os datos do histograma preséntanse como a media  $\pm$  EEM de 3 experimentos independentes. \* $p < 0.05$  vs. basal. **B:** Imaxe representativa da membrana do Western Blot con COX-2 e tubulina (TUB).

Como se pode observar na Figura 13, os polisacáridos estudados (por si só) aumentaron a expresión de HO-1, mentres que IL-1 $\beta$  a diminuíu de forma significativa. Sumado a isto, viuse que o co-tratamento de IL-1 $\beta$  cos fucoidanos, especialmente con *Macrocystis pyrifera* e *Fucus vesiculosus* 30  $\mu$ g/mL, recuperou a síntese de HO-1, excepto o *Fucus vesiculosus* 5  $\mu$ g/mL que a diminuíu. Non obstante, as diferenzas encontradas non foron estatisticamente significativas.

Tras estudar a actividade antiinflamatoria dos fucoidanos nos condrocitos, quíxose avaliar se esta actividade era similar nos sinoviocitos. Por esta razón examinouse do mesmo modo a expresión proteica de COX-2 e HO-1.

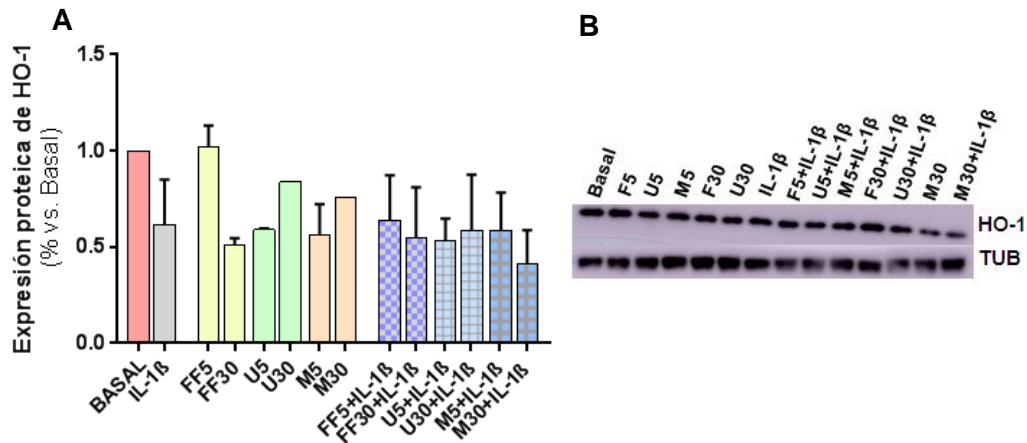


**Figura 14: Análise da expresión proteica de COX-2.** Os sinoviocitos foron estimulados durante 24 h cos diferentes fucoidanos as concentracións de 5 e 30  $\mu\text{g}/\text{mL}$  con ou sen IL-1 $\beta$  para determinar a expresión de COX-2 mediante Western Blot. **A:** Os datos do gráfico preséntanse como a media  $\pm$  EEM de 2 experimentos independentes.. **B:** Imaxe representativa dos resultados do Western Blot de COX-2 e tubulina (TUB). F: *Fucus vesiculosus*, U: *Undaria pinnatifida* e M: *Macrocytis pyrifera*

Tras valorar a expresión de COX-2 (Figura 14) observouse como IL-1 $\beta$  induciu un aumento da súa síntese (1) mentres que as concentracións de 30  $\mu\text{g}/\text{mL}$  dos fucoidanos de *Fucus vesiculosus* ( $0,84\pm 0,23$ ) e *Undaria pinnatifida* ( $0,85\pm 0,27$ ) en presenza desta citoquina conseguiron unha redución da proteína, seguido do *Fucus vesiculosus* 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Pola contra o de *Macrocytis pyrifera* e *Undaria pinnatifida* 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  non conseguiron frear a súa expresión.

A continuación, estudouse a expresión de HO-1 como se amosa na Figura 15. Todos os fucoidanos por si só agás o *Fucus vesiculosus* 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , diminuíron a expresión de HO-1 en relación ó basal. O *Fucus vesiculosus* 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ( $0,64\pm 0,23$ ) pareceu ser o único polisacárido que freou a diminución desta encima antioxidante provocada por IL-1 $\beta$  ( $0,61\pm 0,23$ ), mentres que o *Macrocytis pyrifera* 30  $\mu\text{g}/\text{mL}$  aínda reduciu

máis a súa expresión ( $0.41 \pm 0.17$ ). Aínda así, os valores atopados amosaron que a diferenza na expresión de HO-1 con IL-1 $\beta$  e co tratamento con *Fucus vesiculosus* 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  foi moi pequena.



**Figura 15: Análise da expresión de HO-1 en sinoviocitos.** Os sinoviocitos estimuláronse durante 24 h coas concentracións dos fucoidanos (5 e 30  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) procedentes de *Fucus vesiculosus* (F), *Undaria pinnatifida* (U) e *Macrocystis pyrifera* (M) con e sen IL-1 $\beta$  para cuantificar a expresión de HO-1 por Western Blot. **A:** Os resultados exprésanse como media  $\pm$  EEM de 2 experimentos independentes. **B:** Imaxe representativa da membrana do Western Blot cos resultados de HO-1 e tubulina (TUB).

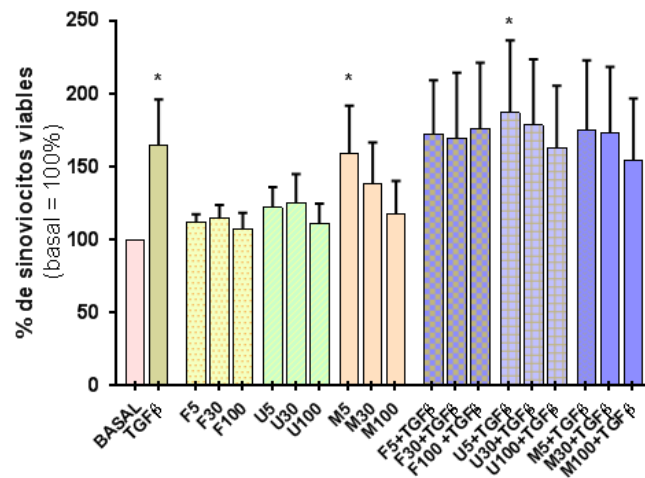
#### 4.4. EFECTO DOS FUCOIDANOS NA FIBROSE SINOVIAL

A fibrose sinovial é un proceso patolóxico desencadeado pola inflamación e o dano tisular que ocorre durante a fisiopatoxénese da OA. Por este motivo, tamén nos pareceu interesante estudar se os fucoidanos exercen un efecto protector sobre esta alteración.

Para levar a cabo as seguintes probas, os sinoviocitos incubáronse con TGF- $\beta$  (principal mediador da fibrose sinovial) e os diferentes fucoidanos.

Primeiramente avalíouse de novo a viabilidade celular nos sinoviocitos (Figura 16). Como era de esperar, a viabilidade celular non se viu afectada por ningunha das condicións. A pesar disto, a dose de 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  presentou, xeralmente, valores inferiores ás demais

concentracións, ao igual que detectamos no ensaio de viabilidade feito anteriormente con IL-1 $\beta$ .

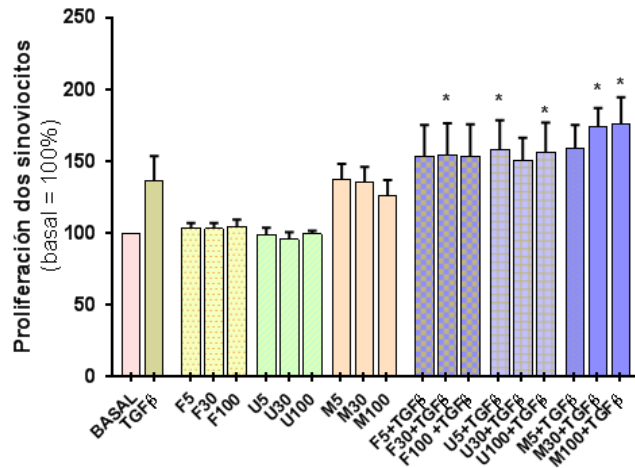


**Figura 16: Gráfico da viabilidade dos sinoviocitos con TGF- $\beta$ .** Os sinoviocitos estimuláronse durante 48 h cos fucoidanos procedentes de *Fucus vesiculosus* (F) *Undaria pinnatifida* (U) *Macrocytis pyrifera* (M) a concentracións de 5, 30 e 100  $\mu\text{g/mL}$  en presenza ou ausencia de TGF- $\beta$  para valorar a viabilidade celular mediante MTT. Cada columna amosa a porcentaxe de células viables sendo a do basal do 100%. Os resultados exprésanse como a media  $\pm$  EEM de 3 experimentos independentes por duplicado. \* $p < 0.05$  vs. basal.

#### 4.4.1. O impacto dos fucoidanos na proliferación de sinoviocitos.

Unha vez comprobada a non toxicidade dos fucoidanos, valorouse se os polisacáridos eran idóneos para inhibir a proliferación celular causada por TGF- $\beta$ . Para iso, os sinoviocitos estimuláronse durante 48 h co nomeado factor de crecemento e os fucoidanos.

Como se revela na Figura 17, ningún dos fucoidanos logrou frear a proliferación ocasionada por TGF- $\beta$ . Así mesmo, o *Macrocytis pyrifera* foi o fucoidano que exhibiu valores máis altos tanto só como xunto ó TGF- $\beta$ .

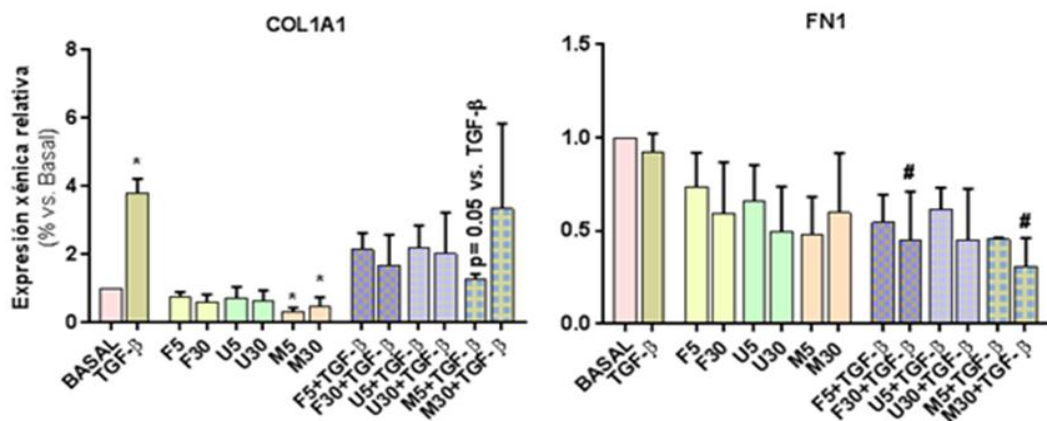


**Figura 17: Histograma da proliferación celular nos sinoviocitos.** Os sinoviocitos estimuláronse coas concentracións crecentes de 5, 30 e 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  dos fucoidanos procedentes de *Fucus vesiculosus* (F) *Undaria pinnatifida* (U) *Macrocystis pyrifera* (M) en presenza ou ausencia de TGF- $\beta$  para analizar a proliferación por MTT. Cada columna amosa a porcentaxe da proliferación sinovial (Basal = 100%). Os resultados exprésanse como a media  $\pm$  EEM de 3 experimentos por duplicado. \* $p < 0.05$  vs. basal.

Debido a que non se amosaron diferenzas evidentes entre as doses dos polisacáridos e dado ós resultados obtidos a nivel da viabilidade celular, decidiuse manter o estudo coas concentracións elixidas no modelo inflamatorio (5 e 30  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ).

#### 4.4.2. Efecto na expresión xénica de marcadores fibróticos.

O aumento da expresión de fibronectina e coláxeno tipo I é característico na fibrose sinovial o que favorece ao engrosamento da membrana sinovial e á progresión da OA. Así pois, investigouse o impacto dos fucoidanos na expresión xénica destes marcadores fibróticos. Para esta análise, os sinoviocitos foron incubados durante 24 h con TGF- $\beta$  e os diferentes fucoidanos (Figura 18).



**Figura 18: Representación gráfica da expresión xénica de COL1A e FN1.** A expresión relativa do ARNm cuantificouse transcorridas 24 h da estimulación con TGF-β e os fucoidanos as doses de 5 e 30 μg/mL mediante RT-qPCR. Os valores amósanse como a media ± EEM das condicións respecto ao basal que se normalizou a 1. (n=3 experimentos independentes \*p<0.05 vs. basal, # p<0.05 vs. TGF-β). F: *Fucus vesiculosus*, U: *Undaria pinnatifida* e M: *Macrocytis pyrifera*.

Como se observa na Figura 18 os niveis de coláxeno incrementáronse significativamente con TGF-β mentres que os fucoidanos por si mesmos se mantiveron en valores similares e, incluso menores, á condición basal. Respecto á coestimulación de TGF-β e os fucoidanos, viuse que todos os fucoidanos diminuíron a expresión de coláxeno excepto o de *Macrocytis pyrifera* 30 μg/mL. En contraste, o polisacarádido procedente de *Macrocytis pyrifera* 5 μg/mL amosou o mellor resultado, reducindo case de forma significativa os niveis de coláxeno en relación ó TGF-β (p=0.05).

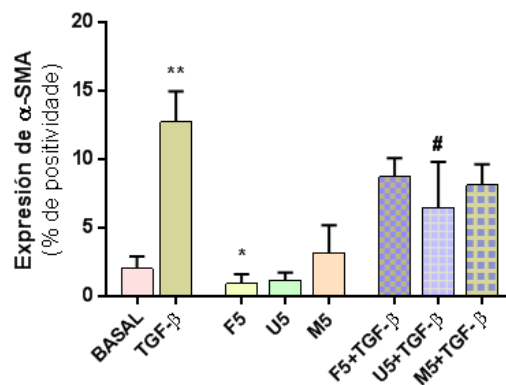
Por outra parte, o TGF-β non modulou a expresión de fibronectina respecto ó basal. Porén, os fucoidanos por si só diminuíron a súa expresión. Na presenza de TGF-β, os fucoidanos tamén conseguiron frear a expresión deste xene, diminuíndo dunha maneira dependente da dose case o 50% do valor obtido no control positivo. O de *Macrocytis pyrifera* a 30 μg/mL foi o que maior redución exhibiu seguido do *Fucus vesiculosus* 30 μg/mL, ambos de maneira significativa respecto ó TGF-β.

Nos resultados que se reflectiron ata o momento non se puideron detectar diferenzas claras entre as concentracións dos fucoidanos. Porén, a dose

de 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  parece ser igual de efectiva ca de 30  $\mu\text{g}/\text{mL}$  para deter a fibrose inducida con TGF- $\beta$ . Deste modo, escolleuse esta dose para realizar o seguinte estudo.

#### 4.4.3. Efecto na expresión celular de $\alpha$ -SMA.

Finalmente, quíxose estudar o papel que desempeñan os fucoidanos sobre os niveis celulares  $\alpha$ -SMA, un marcador dos cambios no fenotipo celular que ocorren durante a fibrose sinovial. Para levar a cabo esta proba, os sinoviocitos foron incubados durante 48 h cos fucoidanos con ou sen TGF- $\beta$  e valorouse a expresión de  $\alpha$ -SMA mediante inmunocitoquímica (Figura 19). As imaxes representativas do ensaio poden atoparse no (ANEXO II).



**Figura 19: Gráfica da expresión de  $\alpha$ -SMA en sinoviocitos.** Os sinoviocitos, foron estimulados durante 48 h con TGF- $\beta$  (control positivo) e cotratados cos fucoidanos procedentes de *Fucus vesiculosus* (F) *Undaria pinnatifida* (U) *Macrocystis pyrifera* (M) a 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . A continuación, analizouse a positividade de  $\alpha$ -SMA mediante inmunocitoquímica. Os datos exprésanse como media  $\pm$  EEM de 3 experimentos \* $p < 0.05$  vs. basal, \*\* $p < 0.01$  vs. basal #  $p < 0.05$  vs. TGF- $\beta$ .

Como era de esperar, a expresión da actina aumentou significativamente con TGF- $\beta$  mentres que cos polisacáridos diminuíu en relación ó basal, agás co de *Macrocystis pyrifera*. Sumado a isto, a expresión de  $\alpha$ -SMA inducida con TGF- $\beta$  reduciuse en presenza dos fucoidanos, principalmente con *Undaria pinnatifida* o cal amosou unha diminución significativa dos seus niveis (da actina), seguido do *Macrocystis pyrifera*.

## 5. DISCUSIÓN

A OA trátase dunha alteración crónica e progresiva que supón un importante problema de saúde a nivel mundial. Actualmente, esta enfermidade non ten cura e as terapias existentes consisten en diminuír a dor, manter a función articular e minimizar a discapacidade. Estes tratamentos supoñen un gasto sanitario considerable e teñen efectos secundarios para os pacientes. Por este motivo, estanse investigando produtos naturais máis baratos e con menos efectos adversos, como alternativa terapéutica para a OA.

Os fucoidanos son polisacáridos sulfatados naturais procedentes, a gran maioría, de algas pardas mariñas que se caracterizan polas diversas propiedades biolóxicas que presentan, as cales poden variar en función da especie de procedencia <sup>33,34</sup>. Por esta razón, o obxectivo principal deste traballo foi estudar os efectos de 3 fucoidanos sobre as respostas catabólicas comunmente dadas na OA nas células articulares.

En primeiro lugar, os nosos resultados amosaron que os fucoidanos a unhas concentracións crecentes (5 µg/mL, 30 µg/mL e 100 µg/mL) non son tóxicos para as células articulares. Polo tanto, consideramos que son seguros para continuar co estudo que se propuxo. Estes datos son apoiados por estudos previos que valoraron a citotoxicidade dos fucoidanos <sup>41-43</sup>.

No referente ó estrés oxidativo, algúns radicais libres como o NO poden ser mediadores importantes da patoxénese da OA polo que era interesante estudar o efecto antioxidante dos fucoidanos <sup>44</sup>. Existen evidencias de que os fucoidanos exercen un papel antioxidante para combater o efecto patolóxico do NO. Park e colaboradores <sup>44</sup> mais Phull e colaboradores <sup>45</sup>, demostraron en ensaios “in vitro” en macrófagos de rato e en condrocitos de coello que os fucoidanos de baixo peso molecular como o de *Fucus vesiculosus* e *Undaria pinnatifida* son capaces de inhibir o NO inducido. De acordo con estes, no noso estudo observouse que os fucoidanos citados reduciron os niveis de NO inducidos por IL-1β.



Para comprobar estes achados, estudouse a expresión da encima responsable da síntese de NO (iNOS) en presenza de IL-1 $\beta$ . Tras a análise, observamos que o *Fucus vesiculosus* a doses baixas invertiu a produción de iNOS de maneira significativa nos condrocitos, tal e como se describiu en investigacións similares en queratinocitos <sup>41</sup>. Sen embargo, os nosos datos están en controversia con outra publicación sobre a redución por *Undaria pinnatifida* da expresión de iNOS activada con IL-1 $\beta$  <sup>46</sup>, xa que nos nosos experimentos en condrocitos, este fucoidano incrementou a expresión da encima. Pola contra, os nosos resultados tamén coinciden con esta publicación <sup>46</sup>, xa que amosaron unha redución da produción de NO inducida con IL-1 $\beta$  por *Undaria pinnatifida*. Ademais, nos sinoviocitos tamén se observou o seu efecto positivo. Porén, requírense de estudos posteriores nesta mesma liña para determinar con seguridade se a actividade de iNOS é regulada por *Undaria pinnatifida*.

Na análise do papel dos fucoidanos sobre a disfunción mitocondrial e a xeración de ROS, eventos que xogan un papel importante na patoloxía da OA <sup>27</sup>, contemplouse o efecto beneficioso destes produtos naturais nos condrocitos artrósicos. Este ensaio exhibiu como novamente o fucoidano de *Fucus vesiculosus* 5  $\mu$ g/mL protexeu de maneira significativa fronte a despolarización mitocondrial provocada por unha inhibición da cadea respiratoria mitocondrial. Respecto ós ROS citoplasmáticos e ó superóxido mitocondrial, estes diminuíron con todos os fucoidanos e con valores similares entre eles. Esta redución nos produtos da alteración mitocondrial está en concordancia con outras publicacións semellantes de Kim e colaboradores <sup>42,47</sup> sobre outros fucoidanos distintos do *Fucus vesiculosus*. Non obstante, sinalan que os polisacáridos con niveis altos de fucosa e sulfato (coma é o de *Fucus vesiculosus*) son efectivos para a eliminación de radicais libres amosando unha maior actividade antioxidante <sup>34,47</sup>.

Por outra parte, estudos recentes describiron a capacidade antiinflamatoria e a regulación efectiva de COX-2 polos fucoidanos <sup>46,48</sup>.

No traballo actual, atopouse que os fucoidanos tamén diminuíron a expresión de COX-2 inducida por IL-1 $\beta$  nos condrocitos, sendo *Fucus vesiculosus* 30  $\mu$ g/mL o máis efectivo. En contraste, *Undaria pinnatifida* 5  $\mu$ g/mL estimulou a súa síntese a diferenza das conclusións publicadas por outros autores en condrocitos de coello e macrófagos de rato <sup>46,48</sup>. Porén, os nosos resultados exhibiron que este fucoidano foi capaz de modular a produción de PGE<sub>2</sub>, unha molécula producida por COX-2. Ademais, a diminución da expresión de COX-2, tamén se observou nos sinoviocitos humanos onde o de *Fucus vesiculosus* 30  $\mu$ g/mL novamente alcanzou as cotas máis baixas xunto ó de *Undaria pinnatifida* 30  $\mu$ g/mL. En futuros ensaios, estudarase o papel dos fucoidanos na expresión xénica deste mediador inflamatorio para confirmar estes datos e ver se a súa modulación se da a nivel transcripcional.

Sumado a isto, para corroborar o impacto dos fucoidanos sobre a expresión de COX-2, estudáronse os seus efectos fronte a segregación de PGE<sub>2</sub>. Os nosos resultados amosaron que o fucoidano de *Macrocystis pyrifera* diminuíu significativamente a produción de PGE<sub>2</sub> inducida por IL-1 $\beta$ , seguido do *Undaria pinnatifida*. Como xa se comentou, estes datos difiren dos obtidos anteriormente na expresión de COX-2 en condrocitos, especialmente en *Undaria pinnatifida* que incrementou a expresión de COX-2 en presenza de IL-1 $\beta$ , pero conseguiu ser dos máis eficaces na redución de PGE<sub>2</sub>. Isto pode explicarse pola prostaglandina E sintasa-1 microsomal (mPGES-1), unha encima inducible expresada en varios tipos celulares humanos, que ó igual que COX-2 participa na síntese de PGE<sub>2</sub>. Estudos previos destacan a presenza de niveis altos de mPGES-1 nas células articulares en pacientes con OA e conclúen que parece ser a principal encima reguladora da biosíntese de PGE<sub>2</sub> no contexto da inflamación <sup>49,50</sup>. Por esta razón, sería de gran interese enfocar novos estudos sobre *Undaria pinnatifida* na modulación de mPGES-1, xa que a diminución na segregación de PGE<sub>2</sub> atopada pode deberse polos efectos dos polisacáridos sobre esta vía.

A HO-1 trátase dunha encima antioxidante que atenúa o estrés oxidativo e a inflamación eliminando os ROS que se acumulan durante o proceso inflamatorio <sup>41</sup>. Coa finalidade de coñecer se a modulación da resposta inflamatoria polos polisacáridos sulfatados se daba a través da activación desta encima, valorouse a expresión proteica de HO-1 nun ambiente inflamatorio. Os nosos datos en condrocitos revelaron que os fucoidanos aumentaron a expresión da HO-1 en presenza de IL-1 $\beta$ , especialmente o *Macrocytis pyrifera* e o *Fucus vesiculosus* 30  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , excepto a dose de 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  deste fucoidano. Pola contra, os fucoidanos non aumentaron a expresión desta encima antioxidante nos sinoviocitos. Tomados xuntos, os nosos resultados en condrocitos suxiren que estes fucoidanos poderían presentar os seus efectos antiinflamatorios a través da regulación dos niveis de HO-1. Estes datos coinciden cos resultados dunha investigación en queratinocitos que, ademais, suxeriu que o aumento na expresión de HO-1 se daba a través da activación das vías Nrf2 e ERK, vías que regulan a súa expresión entre a de outras como a superóxido dismutasa, unha encima involucrada fronte ó dano oxidativo <sup>41</sup>. Adicionalmente, outro mecanismo polo que os polisacáridos poderían exercer os seus efectos é a supresión das citoquinas inflamatorias a través da inhibición do factor de transcripción NF-kB ou a través da activación das rutas AKT, p38 e MAPK <sup>43,48</sup>. Por esta razón, son necesarios máis estudos para determinar se o efecto dos fucoidanos tamén se dá por estas vías suxeridas.

En resumo, no entorno da inflamación os fucoidanos foron capaces de modular as respostas catabólicas inducidas, principalmente o de *Fucus vesiculosus* como antioxidante e antiinflamatorio nas células articulares. Porén, o de *Macrocytis pyrifera* foi o que máis diminuíu a produción de PGE<sub>2</sub>. Neste sentido, cabe mencionar que se comezaron a realizar ensaios “in vivo” onde se viron que os fucoidanos de *Macrocytis pyrifera* e *Fucus Vesiculosus* foron capaces de reducir os síntomas en pacientes con OA sen provocar efectos tóxicos <sup>51, 52</sup>.

Finalmente, tamén se quixo avaliar o potencial dos fucoidanos sobre a fibrose sinovial. A fibrose sinovial é outro factor clave na patoloxía da OA sendo o TGF- $\beta$  o principal mediador deste proceso. Este mesmo promove a aparición de múltiples alteracións como cambios no fenotipo celular, o depósito excesivo de MEC, a proliferación celular e a secreción de citocinas proinflamatorias<sup>15</sup>. Coa finalidade de comprobar a capacidade reguladora dos polisacáridos na fibrose sinovial, estudouse a expresión de marcadores fibróticos inducidos por TGF- $\beta$  nos sinoviocitos.

Primeiramente, valorouse a capacidade dos fucoidanos para frear a proliferación celular estimulada. Os nosos resultados indicaron que estes derivados naturais non modularon a proliferación inducida con TGF- $\beta$ , sendo o de *Macrocystis pyrifera* o que maiores valores amosou tanto só coma en presenza de TGF- $\beta$ . Estes datos están en controversia con publicacións que describen o potencial antiproliferativo dos fucoidanos dada a súa capacidade para inhibir o nomeado factor de crecemento en fibroblastos humanos e hepatocitos de rato<sup>53,54</sup>. En vista a estes resultados, son necesarios máis ensaios específicos sobre esta liña.

A fibronectina e o coláxeno tipo 1 son moléculas da MEC cuxos niveis aumentan en presenza de TGF- $\beta$  o que favorece ó depósito excesivo de matriz<sup>23,55</sup>. Investigacións previas demostraron que os fucoidanos tales como o de *Fucus Vesiculosus* frearon o crecemento da MEC dunha forma dose-dependente mediante a inhibición da expresión de coláxeno e fibronectina na fibrose hepática en ratos<sup>55</sup>, en células epiteliais de retina humana<sup>56</sup> e en células mesanxiais de rato<sup>57</sup>. De acordo con estes, observouse nos sinoviocitos que os fucoidanos reduciron a expresión de coláxeno e fibronectina en presenza de TGF- $\beta$ , especialmente o de *Macrocystis pyrifera*. Sen embargo, no caso do coláxeno a diminución non se deu dunha maneira dependente da dose. Así mesmo, Li e colaboradores<sup>58</sup> falan do efecto dos fucoidanos de baixo peso molecular sobre a fibrose. Pola contra, os nosos datos indican que o máis efectivo foi o *Macrocystis pyrifera* de maior peso molecular. Datos que coinciden

cun estudo realizado nunha liña celular “HK-2”<sup>59</sup>, que describiu que os efectos inhibitorios do fucoidano sobre TGF- $\beta$  foron maiores a maior peso molecular do fucoidano en comparación co *Fucus Vesiculosus*, de baixo peso molecular.

Do mesmo modo, a expresión de  $\alpha$ -SMA é un marcador característico dos cambios que se dan no fenotipo celular durante a fibrose sinovial<sup>57</sup>. Por tanto, estudouse a expresión de  $\alpha$ -SMA para comprobar o cambio fenotípico nos sinoviocitos e o papel dos fucoidanos na expresión desta proteína. Os nosos resultados resaltaron a capacidade dos polisacáridos de reducir a expresión de  $\alpha$ -SMA estimulada por TGF- $\beta$ , sobre todo *Undaria pinnatifida* que a diminuíu de maneira significativa. Resultados semellantes se atoparon nos poucos estudos realizados sobre este tema noutros tipos celulares<sup>55-58</sup>. O traballo feito por Kim e colaboradores<sup>59</sup>, suxeriu que os fucoidanos poden impedir os efectos de TGF- $\beta$ , e en consecuencia dos seus produtos, actuando sobre as vías de sinalización Smad 2 e 3 fosforiladas. Máis adiante será conveniente realizar máis estudos para profundizar nos efectos dos fucoidanos sobre a fibrose sinovial.

Para rematar, cabe mencionar as limitacións desta investigación que deben de ser recoñecidas. O tamaño da mostraxe baixo dado o acceso limitado ás mostras humanas ou a contaminacións celulares foi unha limitación importante xa que sería beneficioso obter un maior número de mostras para fortalecer o estudo. Por outra parte, tamén será necesario profundar nas vías moleculares implicadas nos efectos dos fucoidanos.

En resumo, os tres fucoidanos avaliados foron capaces de diminuír as respostas catabólicas inducidas nos condrocitos e sinoviocitos artrósicos, reducindo o estrés oxidativo e freando a acción de certos mediadores inflamatorios e marcadores fibróticos. Sen embargo, aínda que estes resultados suxiren ós fucoidanos como unha alternativa terapéutica natural, non son suficientes para dar conclusións definitivas e débese seguir estudando a súa implicación no metabolismo celular durante a OA.

## 6. CONCLUSIÓNS

- Os fucoidanos de *Fucus Vesiculosus*, *Undaria pinnatifida* e *Macrocystis pyrifera*, as doses estudadas, non afectan a viabilidade dos condrocitos e dos sinoviocitos.
- O de *Fucus Vesiculosus* é o fucoidano que presenta un maior efecto antioxidante na disfunción mitocondrial inducida con AA e no ambiente inflamatorio provocado por IL-1 $\beta$  respecto ó de *Undaria pinnatifida* e *Macrocystis pyrifera*, que é o que peor actividade antioxidante presenta.
- Os fucoidanos analizados son capaces de modular a resposta inflamatoria inducida con IL-1 $\beta$ . *Fucus Vesiculosus* presenta a maior capacidade para reducir a expresión de COX-2 nas células articulares e o de *Macrocystis pyrifera* para diminuír a produción de PGE<sub>2</sub> nos condrocitos. Ademáis, estes fucoidanos regularon positivamente a expresión de HO-1 nos condrocitos.
- O fucoidano de *Macrocystis pyrifera* ofrece un mellor potencial antifibrótico nos sinoviocitos modulando máis notoriamente a expresión de coláxeno e de fibronectina. Este fucoidano tamén atenua a expresión de  $\alpha$ -SMA aínda que é o de *Undaria pinnatifida* o que máis a reduce.
- En canto as concentracións, a dose de 5  $\mu$ g/mL parece ser suficiente para alcanzar un efecto protector nas células articulares. Non obstante, atopáronse discrepancias nalgúns experimentos que evitan sacar conclusións claras sobre a concentración óptima a utilizar.

## 7. AGRADECEMENTOS

Ao meu tutor, Carlos, por acollerme, ensinarme e guiarme no laboratorio así como pola súa enorme paciencia, apoio e compromiso en todo momento. A todos os membros do grupo de Terapia Celular e Medicina Rexenerativa e, en xeral, do INIBIC pola súa dispoñibilidade e axuda. A os doantes e a todas aquelas persoas que fixeron posible a realización deste traballo e, por último, ó Servizo de Normalización Lingüística polo seu asesoramento.

## **8. BIBLIOGRAFIA**

1. Goldring SR, Goldring MB. Changes in the osteochondral unit during osteoarthritis: structure, function and cartilage–bone crosstalk. *Nat Rev Rheumatol.* 2016; 12(11): 632-644.
2. Ea HK, Bazille C, Lioté F. Histología y fisiología de la membrana sinovial. EMC. 2008; 41(4): 1-6.
3. Bhosale AM, Richardson JB. Articular cartilage: structure, injuries and review of management. *British Medical Bulletin.* 2008; 87: 77–95.
4. Gomoll AH, MinasT. The quality of healing: Articular cartilage. *Wound Rep Reg.* 2014; 22: 30–38.
5. Largo Carazo R, Herrero-Beaumont Cuenca G. Artrosis: Etiopatogenia, Epidemiología y Clasificación. En: Alperi López M, Balsa Criado A, Blanco Alonso R, Hernández Cruz B, Medina Luezas J, Muñoz Fernández S et al. *Manual SER de enfermedades reumáticas.* 6ª ed. Madrid: Elsevier; 2014, p.465-470.
6. Mariani E, Pulsatelli L, Facchini A. Signaling Pathways in Cartilage Repair. *Int J Mol Sci.* 2014; 15: 8667-8698.
7. Akkiraju H, Nohe A. Role of Chondrocytes in Cartilage Formation, Progression of Osteoarthritis and Cartilage Regeneration. *J Dev Biol.* 2015; 3(4): 177-192.
8. Houard X, Goldring MB, Berenbaum F. Homeostatic Mechanisms in Articular Cartilage and Role of Inflammation in Osteoarthritis. *Curr Rheumatol Rep.* 2013; 15(11): 375-394.
9. Bomer N, Hollander W, Ramos YFM, Meulenbelt I. Translating genomics into mechanisms of disease: Osteoarthritis. *Best Practice & Research Clinical Rheumatology.* 2015; 29: 683-691.
10. Loeser RF, Goldring SR, Scanzello CR, Goldring MB. Osteoarthritis: A Disease of the Joint as an Organ. *Arthritis and Rheumatism.* 2012; 64(4): 1697–1707.
11. Raman S, FitzGerald U, Murphy JM. Interplay of Inflammatory Mediators with Epigenetics and Cartilage Modification in Osteoarthritis. *Front Bioeng Biotechnol.* 2018; 6(22): 1-9.

12. Mayan MD, Gago-Fuentes R, Carpintero-Fernandez P, Fernandez-Puente P, Filgueira-Fernandez P, Goyanes N et al. Articular chondrocyte network mediated by gap junctions: role in metabolic cartilage homeostasis. *Ann Rheum Dis*. 2013; 0:1-10.
13. Martel-Pelletier J, Boileau C, Pelletier JP, Roughley PJ. Cartilage in normal and osteoarthritis conditions. *Best Practice & Research Clinical Rheumatology*. 2008; 22(2): 351-384.
14. Bartok B, Firestein GS. Fibroblast-like synoviocytes: key effector cells in rheumatoid arthritis. *Immunological Reviews*. 2010; 233: 233–255.
15. Remst DFG, Blaney Davidson EN, Kraan PM. Unravelling osteoarthritis related synovial fibrosis: a step closer to solving joint stiffness. *Rheumatology*. 2015; 54: 1954-1963.
16. Varela-Eirin M, Loureir J, Fonseca E, Corrochano S, Caeiro JR, Collado, M, Mayan MD. Cartilage regeneration and ageing: Targeting cellular plasticity in osteoarthritis. *Ageing Res Rev*. 2018; 42: 56-71.
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 and Cartilage*. 2015; 23(8): 233-1241.
18. Maldonado M, Nam J. The Role of Changes in Extracellular Matrix of Cartilage in the Presence of Inflammation on the Pathology of Osteoarthritis. *BioMED Research International*. 2013; 0: 1-10.
19. Shen J, Abu-Amer Y, O’Keefe RJ, McAlinden A. Inflammation and epigenetic regulation in osteoarthritis. *Connect Tissue Res*. 2017; 58(1):49-63.
20. Martel-Pelletier J, Barr AJ, Cicuttini FM, Conaghan PG, Cooper C, Goldring MB et al. Osteoarthritis. *Nat Rev Dis Primers*. 2016; 2(16072): 1-18.
21. Wehling P, Evans C, Wehling J, Maixner W. Effectiveness of intra-articular therapies in osteoarthritis: a literature review. *Ther Adv Musculoskel Dis*. 2017; 0(0): 1-14.



22. Johnson VL, Hunter DJ. The epidemiology of osteoarthritis. *Best Practice and Research Clinical Rheumatology*. 2014; 28: 5-15.
23. Sun EY, Fleck AKM, Abu-Hakmeh AE, Kotsakis A, Leonard GR, Wan LQ. Cartilage Metabolism is Modulated by Synovial Fluid Through Metalloproteinase Activity. *Annals of Biomedical Engineering*. 2018: 1-9.
24. Malesud CJ. The Biological Basis of Osteoarthritis: State of the Evidence. *Curr Opin Rheumatol*. 2015; 27(3): 289–294.
25. De Andrés MC, Maneiro E, Martín MA, Arenas J Blanco FJ. Nitric oxide compounds have different effects profiles on human articular chondrocyte metabolism. *Arthritis Research and Therapy*. 2013; 15: 1-12.
26. Hyun HS, Hyun AK. Chondrocyte Apoptosis in the Pathogenesis of Osteoarthritis. *Int J Mol Sci*. 2015; 16: 26035–26054.
27. López-Armada MJ, Riveiro-Naveira RR, Vaamonde-García C, Valcárcel-Ares MN. Mitochondrial dysfunction and the inflammatory response. *Mitochondrion*. 2013; 13: 106-118.
28. Kapoor M, Marter-Pelletier J, Lajeunesse D, Pelletier JP, Fahmi H. Role of proinflammatory cytokines in the pathophysiology of osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol*. 2011; 7(1): 33-42.
29. Van der Kraan PM. The changing role of TGF $\beta$  in healthy, ageing and osteoarthritic joints. *Nat Rev Rheumatol*. 2018; 13: 155-163.
30. Cunha L, Grenha A. Sulfated Seaweed Polysaccharides as Multifunctional Materials in Drug Delivery Applications. *Mar Drugs*. 2016; 14: 1-42.
31. Li B, Lu F, Wei X, Zhao R. Fucoidan: Structure and Bioactivity. *Molecules*. 2008; 13(8): 1671-1695.
32. Phull AB, Kim SJ. Fucoidan as bio-functional molecule: Insights into the anti-inflammatory potential and associated molecular mechanisms. *Journal of Functional Foods*. 2017; 38: 415–426.
33. Fitton JH, Stringer DN, Karpinić SS. Therapies from Fucoidan: An Update. *Mar Drugs*. 2015; 13: 5920-5946.

34. Zhang W, Oda T, Yu Q, Jin JO. Fucoidan from *Macrocystis pyrifera* Has Powerful Immune-Modulatory Effects Compared to Three Other Fucoidans. *Mar Drugs*. 2015; 13: 1084-1101.
35. Yang L, Wang P, Wang H, Li Q, Teng H, Liu Z. Fucoidan Derived from *Undaria pinnatifida* Induces Apoptosis in Human Hepatocellular Carcinoma SMMC-7721 Cells via the ROS-Mediated Mitochondrial Pathway. *Mar Drugs*. 2013; 11: 1961-1976.
36. Rui X, Pan HF, Shao SL, Xu XM. Anti-tumor and anti-angiogenic effects of Fucoidan on prostate cancer: possible JAK/STAT3 pathway. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 2017; 17: 378-386.
37. Zhang Z, Teruya K, Eto H, Shirahata S. Induction of Apoptosis by Low-Molecular-Weight Fucoidan through Calcium and Caspase Dependent Mitochondrial Pathways in MDA-MB-231 Breast Cancer Cells. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2013; 77(2): 235-242
38. Jin JO, Yu Q. Fucoidan delays apoptosis and induces pro-inflammatory cytokine production in human neutrophils. *Int J Biol Macromol*. 2015; 73: 65-71.
39. Burguera EF, Vela-Anero A, Magalhães J, Meijide-Faílde R, Blanco FJ. Effect of hydrogen sulfide sources on inflammation and catabolic markers on interleukin 1 $\beta$ -stimulated human articular chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage*. 2014 ; 22(7): 1026-1033.
40. Válcárcel-Ares MN, Riveiro-Naveira RR, Vaamonde-García C, Loureiro J, Hermida-Carballo L, Blanco FFJ, López-Armada MJ. Mitochondrial dysfunction promotes and aggravates the inflammatory response in normal human synoviocytes. *Rheumatology*. 2014; 53 (7): 1332-1343.
41. Ryu MJ, Chung HS. Fucoidan reduces oxidative stress by regulating the gene expression of HO-1 and SOD-1 through the Nrf2/ERK signaling pathway in HaCaT cells. *Molecular Medicine Reports*. 2016; 14: 3255-3260.
42. Kim KJ, Lee BY. Fucoidan from the sporophyll of *Undaria pinnatifida* suppresses adipocyte differentiation by inhibition of inflammation-related cytokines in 3T3-L1 cells. *Nutr Res*. 2012; 32: 439-447.

43. Shu Z, Shi X, Nie D, Guan B. Low-Molecular-Weight Fucoidan Inhibits the Viability and Invasiveness and Triggers Apoptosis in IL-1 $\beta$ -Treated Human Rheumatoid Arthritis Fibroblast Synoviocytes. *Inflammation*. 2015; 38(5): 1777-1786.
44. Park J, Cha JD, Choi KM, Lee KY, Han KM, Jang YS. Fucoidan inhibits LPS-induced inflammation in vitro and during the acute response in vivo. *International Immunopharmacology*. 2017; 43: 91–98.
45. Phull AR, Majid M, Haq I, Khan MR, Kim SJ. In vitro and in vivo evaluation of anti-arthritic, antioxidant efficacy of fucoidan from *Undaria pinnatifida* (Harvey) Suringar. *Int J Biol Macromol*. 2017; 97: 468-480.
46. Kim KJ, Yoon KY, Lee BY. Low molecular weight fucoidan from the sporophyll of *Undaria pinnatifida* suppresses inflammation by promoting the inhibition of mitogen-activated protein kinases and oxidative stress in RAW264.7 cells. *Fitoterapia*. 2012; 83(8):1628-1635.
47. Kim EA, Lee SH, Ko CI, Cha SH, Kang MC, Kang SM, Ko SC et al. Protective effect of fucoidan against AAPH-induced oxidative stress in zebrafish model. *Carbohydr Polym*. 2012; 102:185-191.
48. Phull AR, Kim SJ. Fucoidan from *Undaria pinnatifida* regulates type II collagen and COX-2 expression via MAPK and PI3K pathways in rabbit articular chondrocytes. *Biologia*. 2017; 72(11): 1362-1369.
49. Bogdan D, Falcone J, Kanjiya MP, Park SH, Carbonetti G, Studholme K et al. Fatty acid binding protein 5 controls microsomal prostaglandin E synthase 1 (mPGES-1) induction during inflammation. *J Biol Chem*. 2018; 293 (14): 5295-5306.
50. Tuure L, Hämäläinen M, Moilanen T, Moilanen E. Aurothiomalate inhibits the expression of mPGES-1 in primary human chondrocytes. *Scand J Rheumatol*. 2015; 44: 74–79.
51. Myers SP, Mulder AM, Baker DG, Robinson SR, Rolfe MI, Brooks L, Fitton JH. Effects of fucoidan from *Fucus vesiculosus* in reducing symptoms of osteoarthritis: a randomized placebo-controlled trial. *Biologics: Targets and Therapy*. 2016; 10: 81–88.

52. Myers SP, O'Connor J, Fitton JH, Brooks L, Connellan P, Wohlmuth H, Cheras PA, Morris C. A combined phase I and II open label study on the effects of a seaweed extract nutrient complex on osteoarthritis. *Biologics: Targets and Therapy*. 2010; 4: 33–44.
53. O'Leary R, Rerek M, Wood EJ. Fucoidan Modulates the Effect of Transforming Growth Factor (TGF)- $\beta$  1 on Fibroblast Proliferation and Wound Repopulation in in Vitro Models of Dermal Wound Repair. *Biol Pharm*. 2004; 27(2): 266—270.
54. Hong SW, Jung KH, Lee HS, Zheng HM, Choi MJ, Lee C, Hong SS. Suppression by Fucoidan of Liver Fibrogenesis via the TGF- $\beta$ /Smad Pathway in Protecting against Oxidative Stress. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2011; 75(5): 833-840.
55. Li J, Chen K, Li S, Feng J, Liu T, Wang F et al. Protective effect of fucoidan from *Fucus vesiculosus* on liver fibrosis via the TGF- $\beta$ 1/Smad pathway mediated inhibition of extracellular matrix and autophagy. *Drug Des Devel Ther*. 2016; 10: 619-630.
56. Zhang Y, Zhao D, Yang S, Yao H, Li M, Zhao C et al. Protective Effects of Fucoidan on Epithelial-Mesenchymal Transition of Retinal Pigment Epithelial Cells and Progression of Proliferative Vitreoretinopathy. *Cell Physiol Biochem*. 2018; 46(4): 1704-1715.
57. Chen J, Cui W, Zhang Q, Jia Y, Sun Y, Weng L. Low molecular weight fucoidan ameliorates diabetic nephropathy via inhibiting epithelial-mesenchymal transition and fibrotic processes. *Am J Transl Res*. 2015; 7(9): 1553-1563.
58. Li X, Li X, Zhang Q, Zhao T. Low molecular weight fucoidan and its fractions inhibit renal epithelial mesenchymal transition induced by TGF- $\beta$ 1 or FGF-2. *Int J Biol Macromol*. 2017; 105(2): 1482-1490.
59. Kim TH, Lee EK, Lee MJ, Kim JH, Yang WS. Fucoidan inhibits activation and receptor binding of transforming growth factor- $\beta$ 1. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013; 432(1) :163-168.

## 9. ANEXOS

### ANEXO I: EJEMPLO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO



#### INFORMACIÓN PARA EL PACIENTE Y CONSENTIMIENTO INFORMADO

D. / Dña.:

#### INTRODUCCIÓN.

Se le propone participar en un proyecto de investigación sobre enfermedades del aparato locomotor que será realizado por el Servicio de Reumatología del Complejo Hospitalario Universitario A Coruña, bajo la dirección del **Dr. Blanco**.

Este proyecto será realizado en la Unidad de Investigación del C.H.U. A Coruña.

#### OBJETIVO DEL PROYECTO.-

El objetivo de este estudio se centra en estudiar los mecanismos que participan en la patogénesis de las enfermedades del aparato locomotor.

#### DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO.-

Usted ha sido sometido a una intervención quirúrgica en la que se le han extraído tejidos articulares los cuales, siguiendo la normativa de eliminación de residuos biológicos, serán incinerados. Si usted decide participar en este estudio, sus tejidos, en lugar de ser eliminados, serán enviados a la Unidad de Investigación del C.H.U. A Coruña para que se almacenen en el Banco de Muestras de dicho Hospital para, posteriormente, realizar los estudios de investigación encaminados a conocer mejor por qué se producen algunas enfermedades del aparato locomotor.

Así mismo se le solicita autorización para la extracción de saliva o 10ml de sangre, siendo extraída esta última siguiendo el procedimiento rutinario para efectuar análisis estándar de sangre.

#### RIESGOS.-

Usted no va a sufrir ningún tipo de inconveniente o riesgo físico adicional al de la propia intervención quirúrgica a la que se le ha sometido, por consentir la utilización de las muestras que se le han extraído durante la misma.

### **COMPENSACIÓN.-**

Usted no recibirá ningún tipo de compensación económica o de cualquier otro tipo por su participación, independientemente de que los resultados de los estudios que se van a realizar puedan dar lugar a patentes con fines médicos.

### **CONFIDENCIALIDAD.-**

Toda la información que se obtenga de analizar su muestra, así como toda la información clínica referente a usted utilizada en las investigaciones futuras, será considerada confidencial y tratada en consecuencia, de acuerdo con lo establecido en la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de Diciembre, de Protección de Datos de Carácter Personal y la Ley 14/2007, de 3 de Julio de Investigación Biomédica.

Para garantizar la confidencialidad de su identidad (asegurar que la información de su muestra de sangre no se relaciona con su identidad), su muestra sólo irá identificada desde el mismo momento de la extracción con un código. Sólo este código, y nunca su identidad aparecerá en las bases de datos donde figure la información clínica o genética referida a usted. La relación entre su código y su identidad quedará custodiada por el personal autorizado del equipo investigador, adoptándose las medidas necesarias para que tal información no esté disponible salvo para el personal autorizado, el cual tiene el deber legal de guardar secreto. De esta manera podemos asegurar que cualquier información que se obtenga a partir de su muestra de sangre permanezca confidencial.

Es importante que entienda que existe la posibilidad de que sus datos y parte de su muestra sean transferidos a otros equipos de investigación que trabajen en el mismo campo. En tal caso, se asegurará que estos datos sean tratados con la misma confidencialidad descrita anteriormente.

Por otro lado, es posible que los resultados de las investigaciones sean publicados en la literatura científica, pero entendiendo estos resultados como los obtenidos de la totalidad de las muestras, no los resultados individuales. Si este fuera el caso, su identidad permanecerá completamente confidencial y nunca formará parte de ninguna publicación.

Con su aceptación a participar en el proyecto, usted accede a que esta información pueda ser transferida en las mencionadas condiciones.

## **NUEVOS HALLAZGOS Y RESULTADOS.-**

Como ya se ha descrito, se adoptarán estrictas medidas de seguridad para garantizar la confidencialidad de los resultados de los estudios realizados.

La evaluación de los resultados se hará sólo por grupos (por ejemplo, hombres / mujeres, grupos de edad, etc.) y no de forma individual. Debe comprender que los resultados de valor que se pudieran obtener provendrían del estudio de múltiples muestras, y en ningún caso de la suya exclusivamente.

Las implicaciones médicas de los resultados de las distintas pruebas, si es que los hay, sólo serán conocidas cuando se hayan completado los proyectos de investigación.

Usted debe saber que, en cumplimiento de la Ley 14/2007, de 3 de Julio, de Investigación Biomédica, tiene derecho a conocer o no, la información obtenida con el análisis de sus muestras.

En el caso de que usted decida no ser informado, la ley establece que cuando la información obtenida sea necesaria para evitar un grave perjuicio para la salud de sus familiares biológicos, se podrá informar a los afectados o a sus representantes legales.

## **PARTICIPACIÓN VOLUNTARIA.-**

- Su participación en el proyecto de investigación es totalmente voluntaria.
- Si firma el consentimiento informado, confirmará que desea participar.
- Puede negarse a participar o retirar su consentimiento en cualquier momento posterior a la firma sin tener que explicar los motivos.
- Si decide retirar su consentimiento, su muestra será destruida y sólo se guardará la información obtenida hasta ese momento.
- Su no-participación o retirada posterior del consentimiento no afectará en modo alguno a su asistencia médica presente o futura.

## **OBTENCIÓN DE INFORMACIÓN ADICIONAL.-**

Usted puede contactar con cualquier miembro del Servicio de Reumatología del C.H.U. A Coruña si le surge cualquier duda sobre su participación en este proyecto o sobre sus derechos como paciente, en el teléfono **981176399**. En todo momento se pondrán los medios necesarios para facilitarle la información más adecuada.

## CONSENTIMIENTO INFORMADO DEL PACIENTE

Yo \_\_\_\_\_ (nombre del paciente),

He leído la información que se me ha entregado.

Se le ha entregado copia de esta información.

He podido hacer preguntas sobre el proyecto.

He recibido suficiente información sobre el mismo.

He hablado de ello con \_\_\_\_\_

Comprendo que mi participación es voluntaria.

Comprendo que puedo retirar mi consentimiento:

1º. Cuando quiera.

2º. Sin tener que dar explicaciones.

3º. Sin que esto repercuta en mis cuidados médicos.

Presto libremente mi conformidad para participar en el proyecto.

---

**FIRMA DEL PACIENTE**

**Nombre**

**Fecha**

He explicado por completo los detalles relevantes de este proyecto al donante y/o la persona autorizada a dar el consentimiento en su nombre.

---

**FIRMA**

**Nombre**

**Fecha**



**ANEXO II: IMAXES REPRESENTATIVAS DA EXPRESSÃO DE  $\alpha$ -SMA**

