



**UNIVERSIDADE DA CORUÑA**

FACULTADE DE CIENCIAS DA SAÚDE

**MESTRADO EN ASISTENCIA E INVESTIGACIÓN SANITARIA  
ESPECIALIDADE: FUNDAMENTOS DA INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA**

Curso académico 2018-19

**TRABALLO DE FIN DE MESTRADO**

# **Efectos antiinflamatorios e antifibróticos dos fucoidanos en células articulares artrósicas**

**David Carballo Beltrán**

**24 de Xuño do 2019**



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.

CERTIFICA QUE:

A presente memoria do Traballo de Fin de Mestrado titulada — **“Efectos antiinflamatorios e antifibróticos dos fucoidanos en células articulares artrósicas”** presentada David Carballo Beltrán 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 24 de xuño de 2019.

Digitally signed  
by VAAMONDE  
GARCIA  
CARLOS -  
46911149G  
Date:  
2019.06.24  
21:06:13 +02'00'

Asdo. Dr. Carlos Vaamonde García

Asdo. David Carballo Beltrán

<b><u>ÍNDICE</u></b>	<b>Página</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS/ TÁBOAS.....</b>	<b>I</b>
<b>ÍNDICE DE ABREVIATURAS.....</b>	<b>I</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>II</b>
<b>RESUMEN.....</b>	<b>III</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>IV</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 A articulación: Articulacións sinoviais .....</b>	<b>1</b>
<b>1.2 A Cartilaxe nas articulacións sinoviais .....</b>	<b>2</b>
<b>1.3 O tecido sinovial nas articulacións sinoviais .....</b>	<b>3</b>
<b>1.4 A artrose .....</b>	<b>4</b>
<b>1.4.1 Inflamación nos tecidos articulares artrósicos .....</b>	<b>6</b>
<b>1.4.2 Estrés oxidativo nos tecidos articulares artrósicos .....</b>	<b>8</b>
<b>1.4.3 Fibrose no tecido sinovial artrósico.....</b>	<b>8</b>
<b>1.5 Potenciais dianas terapéuticas contra as enfermidades reumáticas.....</b>	<b>9</b>
<b>1.5.1 Os fucoidanos. Estrutura e propiedades biolóxicas.....</b>	<b>11</b>
<b>2. OBXECTIVOS .....</b>	<b>12</b>
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>13</b>
<b>3.1 Recollida de mostras .....</b>	<b>14</b>
<b>3.2 Cultivo celular .....</b>	<b>14</b>
<b>3.3 Preparación de estímulos: Fucoidanos, IL-1<math>\beta</math> e TGF- <math>\beta</math> .....</b>	<b>15</b>
<b>3.4 Análise da expresión xénica.....</b>	<b>15</b>
<b>3.4.1 Extracción de ARN ,.....</b>	<b>15</b>
<b>3.4.2 Cuantificación do ARN .....</b>	<b>15</b>
<b>3.4.3 Retrotranscricion a ADNc .....</b>	<b>16</b>
<b>3.4.4 qPCR .....</b>	<b>16</b>
<b>3.5 Análise dos niveis proteicos (<i>Western Blot</i>) .....</b>	<b>17</b>

3.5.1	Electroforese .....	17
3.5.2	Inmunodetección.....	18
3.6	Determinación de NO.....	18
3.7	Determinación de IL-6 .....	19
3.8	Localización por inmunofluorescencia de <i>NF-κβ</i> .....	19
3.9	Análise da capacidade prolífera .....	19
3.10	Análise da capacidade invectiva .....	20
3.11	Análise da capacidade cicatrizante .....	20
3.12	Cuantificación de coláxeno liberado.....	21
3.13	Análise estatístico .....	21
4.	RESULTADOS .....	22
4.1	Resposta inflamatoria en condrocitos.....	22
4.1.1	Niveis relativos de expresión xénica dos mediadores inflamatorios: <i>IL-6</i> , <i>IL-8</i> e <i>Cox-2</i> .....	22
4.1.2	Niveis de IL-6 liberados ao medio extracelular .....	23
4.1.3	Localización celular de <i>NF-κβ</i> .....	23
4.2	Resposta inflamatoria en sinoviocitos .....	25
4.2.1	Niveis relativos de expresión xénica dos mediadores inflamatorios <i>IL-6</i> , <i>IL-8</i> e <i>COX-2</i> .....	25
4.2.2	Niveis relativos de IL-6 liberados ao medio extracelular .....	26
4.2.3	Niveis do mediador de estrés oxidativo NO .....	26
4.2.4	Niveis relativos do mediador antioxidante HO-1 .....	27
4.3	Resposta profibrótica en sinoviocitos.....	28
4.3.1	Niveis relativos de expresión xénica dos mediadores fibróticos: <i>Col1a1</i> , <i>Col3a1</i> e <i>Plod2b</i> .....	28
4.3.2	Niveis relativos de coláxeno intracelular .....	29
4.3.3	Grao relativo de proliferación.....	30
4.3.4	Grao relativo de cicatrización.....	31
4.3.5	Grao relativo de invasión .....	31
5.	DISCUSIÓN.....	32
6.	CONCLUSIÓNS .....	36
7.	BIBLIOGRAFÍA.....	37
	AGRADECIMIENTOS.....	43
	ANEXO I .....	44

## **ÍNDICE DE ABREVIATURAS**

**ADN:** Ácido desoxirribonucleico.

**ADNsa:** Desoxirribonucleasa.

**ADNc:** Ácido desoxirribonucleico complementario.

**ARN:** Ácido ribonucleico.

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

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

**COX-2:** Ciclooxixenasa 2.

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

**EDTA:** Ácido etilenodiaminotetracético.

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

**HO-1:** Hemosixenasa 1.

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

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

**CME:** compoñentes da matriz extracelular

**NO:** Óxido nítrico

**PBS:** Tampón fosfato salino (*Phosphate Buffered Saline*).

**PGE2:** Prostaglandina E2

**PVDF:** Fluoruro de polivinilideno.

**qPCR:** Reacción en cadea de polimerasa cuantitativa (Quantitative polymerase chain reaction).

**SBF:** Soro bovino fetal.

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

**TGF- $\beta$ :** Factor transformador de crecemento beta (*Transforming Growth Factor Beta*).

## **ÍNDICE DE FIGURAS**

**FIGURA 1:** Tipos de articulacións sinoviais

**FIGURA 2:** (A) Estrutura da cartilaxe hialino. (B) Imaxe histolóxica da cartilaxe

**FIGURA 3:** Corte histolóxico da membrana sinovial

**FIGURA 4:** (A) Tecidos do xeonllo afectados pola artrose (B) Cortes histolóxicos da cartilaxe e dos tecidos sinoviais normal e artrósico

**FIGURA 5:** Relación entre a inflamación sinovial e a artrose

**FIGURA 6:** Esquema da activación dos sinoviocitos en fibroblastos (*FLS*)

**FIGURA 7:** Dianas terapéuticas contra as enfermidades reumáticas

**FIGURA 8:** Estrutura molecular do fucoïdano *Fucus vesiculosus*

**FIGURA 9:** Propiedades biolóxicas dos fucoïdanos

**FIGURA 10:** Mecanismos de acción moleculares dos fucoïdanos no interior das células

**FIGURA 11:** Efecto dos fucoïdanos na expresión dos mediadores proinflamatorios: IL-6, IL-8, e COX-2

**FIGURA 12:** Efecto dos fucoïdanos na liberación de IL-6 ó medio

**FIGURA 13:** Localización celular de *NF- $\kappa$ B* detectado por inmunofluorescencia

**FIGURA 14:** Efecto dos fucoïdanos na expresión dos mediadores proinflamatorios: IL-6, IL-8, e COX-2

**FIGURA 15:** Efecto dos fucoïdanos na liberación de IL-6 ó medio extracelular

**FIGURA 16:** Efecto dos fucoïdanos na liberación de NO

**FIGURA 17:** Efecto dos fucoïdanos na produción proteica do antioxidante HO-1

**FIGURA 18:** Efecto dos fucoïdanos na expresión xénica dos CME sinovial

**FIGURA 19:** Efecto dos fucoïdanos na presenza de coláxeno intracelular

**FIGURA 20:** Efecto dos fucoïdanos na proliferación celular

**FIGURA 21:** Efecto dos fucoïdanos na capacidade de cicatrización

**FIGURA 22:** Efecto dos fucoïdanos na capacidade de invasión

### **ÍNDICE DE TÁBOAS:**

**TÁBOA 1:** Secuencia dos cebadores empregados na *qPCR*

**TÁBOA 2:** Dilucións dos anticorpos empregados na inmunodetección das proteínas de interese: HO-1 e tubulina como normalizador de resultados.

## **RESUMO**

**Introdución e obxectivo:** A artrose é unha alteración tisular nas articulacións sinoviais caracterizada principalmente pola destrución da cartilaxe. Actualmente os tratamentos céntranse en aliviar a dor, por iso xurde cada vez máis terapias alternativas baseadas en principios activos naturais. Os fucoidanos, polisacáridos presentes en algas pardas e algúns invertebrados, son un bo candidato para ser unha destas terapias alternativas contra a artrose polas súas propiedades antiinflamatorias, antioxidantes e antifibróticas atopadas noutras patoloxías.

**Metodoloxía:** As células articulares cultiváronse baixo diferentes doses de fucoidanos procedentes de *Fucus vesiculosus*, *Undaria pinnatifida* e *Macrocystis pyrifera*. A continuación, valorouse as súas capacidades para modular a inflamación inducida por IL-1 $\beta$  a través da expresión xénica de *Il-6*, *Il-8* e *Cox-2*, da liberación extracelular de IL-6 e da localización por inmunofluorescencia de *NF-k $\beta$* . O estrés oxidativo e a resposta antioxidante dos fucoidanos foi avaliada mediante a produción de NO e HO-1, respectivamente. Por último, o seu papel fronte a activación da fibrose sinovial inducida por *TGF- $\beta$*  foi estudada a través de ensaios de proliferación, invasión e cicatrización, así como a expresión xénica dos compoñentes da matriz extracelular (coláxeno I e III) e *plod2*.

**Resultados:** Os resultados mostran a capacidade dos fucoidanos para modular procesos catabólicos comunmente observados nas células articulares artrósicas. Destaca *Undaria pinnatifida* como antiinflamatorio, antioxidante e antifibrótico. Aínda así, tanto *Fucus vesiculosus* como *Macrocystis pyrifera* modulan tamén certas rutas metabólicas nos dous tipos celulares estudados: *Fucus vesiculosus* reduce significativamente a liberación de NO en sinoviocitos e *Macrocystis pyrifera* reduce a liberación de IL-6 en condrocitos. Finalmente, observouse que a dose 5 $\mu$ g/ml é a máis efectiva para exercer actividades antioxidante en todos os fucoidanos, mentres que a dose 30  $\mu$ g/ml mostra unha maior capacidade antifibrótica.

**Conclusión:** Os fucoïdanos testados *Fucus vesiculosus*, *Undaria pinnatifida* e *Macrocystis pyrifera* tamén actúan como antiinflamatorios, antioxidantes e anti-fibróticos a distintos niveis metabólicos nas células articulares artrósicas. Polo tanto, os nosos resultados suxiren os fucoïdanos son potenciais tratamentos alternativos contra os fenotipos catabólicos celulares dados nas células artrósicas.

## **RESUMEN**

**Introducción y objetivo:** La artrosis es una alteración tisular en las articulaciones sinoviales caracterizada principalmente por la destrucción del cartílago. Actualmente los tratamientos se centran en aliviar el dolor, por eso aparecen cada vez más terapias alternativas basadas en principios activos naturales. Los fucoïdanos, polisacáridos presentes en algas pardas y algunos invertebrados, son un buen candidato para ser una de estas terapias alternativas contra la artrosis por sus propiedades antiinflamatorias, antioxidantes y antifibróticas encontradas en otras patologías.

**Metodología:** Las células articular se cultivaron bajo diferentes dosis de fucoïdanos procedentes de *Fucus vesiculosus*, *Undaria pinnatifida* y *Macrocystis pyrifera*. A continuación, se valoró sus capacidades para modular a inflamación inducida por IL-1 $\beta$  a través de la expresión génica de IL-6, IL-8 y Cox-2, de la liberación extracelular de IL-6 y de la localización por inmunofluorescencia de NF- $\kappa$  $\beta$ . El estrés oxidativo y la respuesta antioxidante de los fucoïdanos fue evaluada mediante la producción de NO y HO-1, respectivamente. Por último, su papel frente a activación de la fibrosis sinovial inducida por TGF- $\beta$  fue estudiada a través de ensayos de proliferación, invasión y cicatrización, así como la expresión xénica de los componentes de la matriz extracelular ,



**Resultados:** los resultados muestran la capacidad de los fucoidanos para modular procesos catabólicos comúnmente observados en células articulares artrósicas. Destaca *Undaria pinnatifida* como antiinflamatorio, antioxidante y anti-fibrótico. Aun así, tanto *Fucus vesiculosus* como *Macrocystis pyrifera* modulan también ciertas rutas metabólicas en los dos tipos celulares estudiados: *Fucus vesiculosus* reduce significativamente en sinoviocitos la liberación de NO y *Macrocystis pyrifera* reduce liberación de IL-6. Finalmente, se observó que la dosis 5µg/ml es la mas efectiva para ejercer actividades antioxidante en todos los fucoidanos, mientras que la dosis 30 µg/ml muestra una mayor capacidad antifibrótica.

**Conclusión:** Los fucoidanos analizados *Fucus vesiculosus*, *Undaria pinnatifida* y *Macrocystis pyrifera* también actúan como antiinflamatorios, antioxidantes y anti-fibróticos a distintos niveles metabólicos en las células articular artrósicas. Por lo tanto, nuestros resultados sugieren que los fucoidanos son potenciales tratamientos alternativos contra los fenotipos catabólicos celulares dados en las células artrósicas

## **ABSTRACT**

**Introduction and objective:** Osteoarthritis (OA) is a tissue alteration in the synovial joints characterized mainly by the destruction of cartilage. The current treatments are focused on relieving pain. Thus, there is a growing interest on alternative therapies based on natural active ingredients. Fucoidans, polysaccharides extracted from brown algae and some invertebrates, are a good candidate to be one of these alternative therapies against OA due to their anti-inflammatory, antioxidant and antifibrotic properties found in other pathologies.

**Methodology:** Articular cells were cultivated under different doses of fucoidans. Their biological properties were evaluated to modulate IL-1β-

induced inflammation through *Il-6*, *Il-8* and *Cox-2* gene expression, IL-6 extracellular release and NF- $\kappa$ B translocation. Oxidative stress and antioxidant response were evaluated by the production of NO and HO-1, respectively. Finally, profibrotic pathways were activated in synoviocytes by TGF- $\beta$  through proliferation, invasion and wound repair, as well as gene expression of matrix.

**Results:** results show the ability of fucoïdanes to modulate catabolic processes commonly observed in OA articular cells. *Undaria Pinnatifida* stands out as anti-inflammatory, antioxidant and antifibrotic. Even so, both *Fucus vesiculosus* and *Macrocystis pyrifera* also modulate metabolic pathways in the both cells studied: *Fucus vesiculosus* significantly reduces the levels of NO released in synoviocytes, and *Macrocystis pyrifera* reduces the levels of IL-6 released. Finally, we observed that the 5 $\mu$ g/ml dose is the most effective antioxidant, while the 30 $\mu$ g/ml dose shows a higher antifibrotic capacity.

**Conclusion:** Fucoïdanes analyzed, *Fucus vesiculosus*, *Undaria pinnatifida* and *Macrocystis pyrifera* also act as anti-inflammatory, antioxidants and anti-fibrotic to different metabolic levels in OA joint cells. Therefore, our work suggests that the fucoïdanes are a potential alternative treatment against catabolic phenotype in OA articular cells.

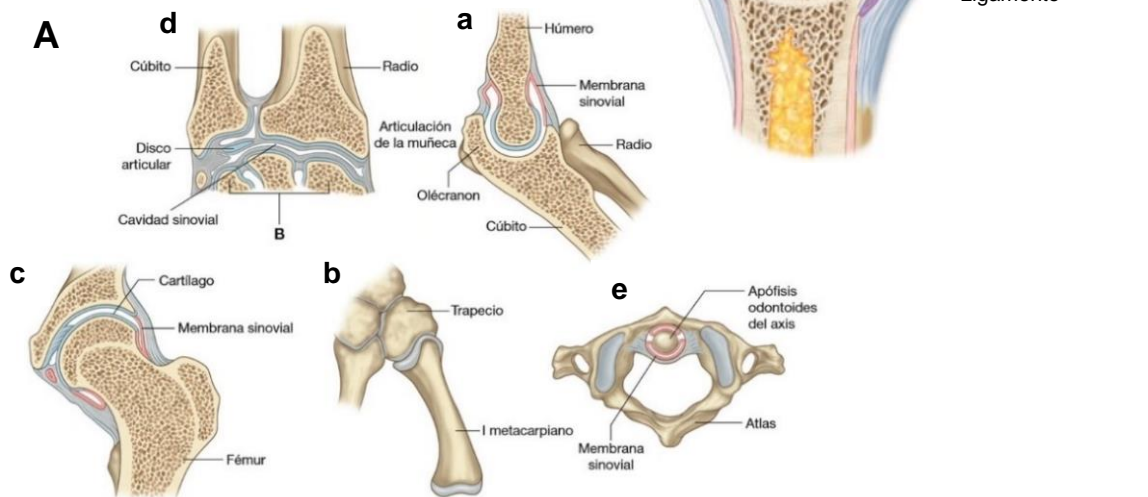
## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1 A articulación: Articulacións sinoviais.

Os ósos do noso corpo e do resto dos mamíferos manteñen a súa cohesión entre eles grazas a un conxunto de tecidos. A este conxunto dásele o nome de articulación. Aínda que o termo fai unha maior referencia ao sistema locomotor, é importante destacar que hai articulacións con moi diferente grado de movemento. As articulacións clasifícanse en 3 tipos segundo a natureza dos tecidos que a compoñen: fibrosas, cartilaxinosas e sinoviais. As de menor ou escasa locomoción corresponden as articulacións de tecido conxuntivo de tipo fibroso e sen cavidades articulares. Podemos atopalas entre os ósos que forman o cranio. Seguindo na escala ascendente de mobilidade, as articulacións cartilaxinosas son semi-móbeis e sen cavidade articular. Os discos intervertebrais están unidos por este tipo. E, por último, o máis sofisticado, as articulación sinoviais, con alta capacidade de movemento, con cavidade articular e con cartilaxe hialino recubrendo as superficies óseas <sup>1</sup> (FIGURA 1).

A articulación sinovial componse por diversos tecidos e sustancias que dotan a esta dunha gran motilidade. Esta articulación orgánízase en cápsula externa, membrana sinovial, cavidade sinovial co líquido sinovial, cartilaxe hialino, ósos e ligamentos. A articulación máis complexa do corpo humano é o xeonllo (FIGURA 1), a súa función principal é soportar o peso do corpo mentres corre, camiña ou está de pé, polo que debe ser moi estable. Hai tres ósos que se unen no xeonllo: o fémur, a tibia e a rótula, entre ambos ósos localízase o menisco, que evita a fricción de ambos e amortece as forzas de compresión que se producen ó saltar. A cartilaxe cubre as cabezas dos ósos e a súa función é absorber as presións exercidas sobre ela. Toda a articulación está recuberta pola cápsula articular, cuxa capa interna denomínase membrana sinovial. Nesta capa prodúcese o líquido sinovial, que lubrica a articulación e a nutre. A estabilidade do xeonllo está determina tamén da pola acción dos músculos e os ligamentos incrustados nos distintos ósos <sup>2</sup>.

**FIGURA 1. (A) Tipos de articulacións sinoviais, localizadas no:** A cóbado (a) , ombreiro (b), cadeira (c), boneca da man (d) e columna vertebral (e). Imaxe extraída e modificada de *Richard L. Drake, 2015* **(B) Estrutura da articulación sinovial do xeonllo.** Imaxe extraída e modificada de *Anthony Mescher, 2016*<sup>3 4</sup>



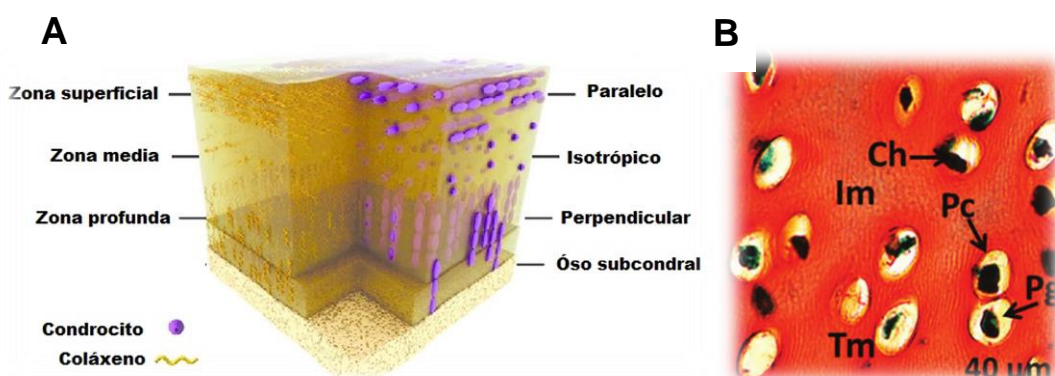
## 1.2 A Cartilaxe nas articulacións sinoviais

Unha das capas comúns de todas as articulacións do corpo (articulacións, discos intervertebrais, traquea ou nariz) é a cartilaxe. A cartilaxe é un tecido conectivo viscoelástico, avascular e aneural polo que necesita o aporte nutritivo que lle proporciona o líquido sinovial. A cartilaxe pode presentarse en 3 formas diferentes dependendo da localización: fibrocartilaxe, cartilaxe elástica e hialino.

A cartilaxe hialino recubre os ósos das articulacións sinoviais. O compoñente principal deste tecido é a auga, que actúa como amortecedor de presións. Outros compoñentes son os proteoglicanos, glucosaminoglicanos, ácido

hialurónico, ou coláxeno. Así mesmo, o 50% do peso seco da cartilaxe é coláxeno II (FIGURA 2).<sup>5,6</sup>

Nesta cartilaxe están embebidos os condrocitos, o único tipo celular deste tecido (FIGURA 2), os cales son os responsables da síntese dos compoñentes da matriz extracelular (CME) tales como o coláxeno II e proteoglicanos.<sup>5,6</sup>



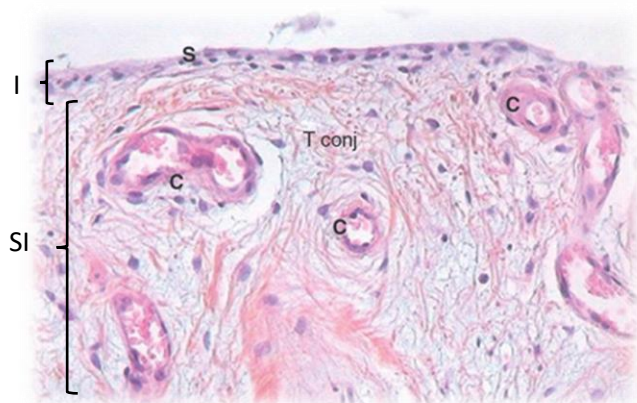
**FIGURA 2** (A) Estrutura da cartilaxe hialino. Estratificada en 3 zonas sobre o óso subcondral: superficial, media e profunda. A disposición do coláxeno e condrocitos varía segundo o estrato. (B) Imaxe histolóxica da cartilaxe tinguida con safranina-O. Nela observase os condrocitos tinguidos en negro (Ch) rodeados pericelularmente dun glucocalix (Pg) e unha cápsula (Pc). De vermello está coloreado a matriz territorial e interterritorial (TM e IM). Imaxes extraídas de *Camarero-Espinosa et al., 2016*<sup>6</sup>

### 1.3 O tecido sinovial nas articulacións sinoviais

O tecido sinovial é un tecido conectivo presente exclusivamente nas articulacións sinoviais. O tecido sinovial é o encargado de lubricar e limitar a fricción e desgaste da cartilaxe ademais de manter a composición e volume do fluído sinovial. A membrana sinovial presenta invaxinacións ao longo da súa extensión e divídese en dúas capas, a íntima e sub-íntima (FIGURA 3). A membrana íntima presenta dous tipos celulares que se distinguen pola súa morfoloxía e función. Atopamos por tanto sinoviocitos tipo A, pouco abundantes (20%) responsables da fagocitosis, e os

sinoviocitos tipo B ou fibroblastos (70%), responsables de segregar ácido hialurónico, coláxeno, fibronectina e outros CME. Por outra banda, a capa sub-íntima conecta directamente coa cápsula articular. Esta componse por vasos sanguíneos e linfáticos, elementos do sistema inmune como macrófagos ou mastocitos, e fibras elásticas.

O líquido sinovial é producido polos sinoviocitos tipo A. Este fluído contén citoquinas, factores de crecemento, glúcidos, lípidos, proteínas e CME dirixidos ao mantemento dos condrocitos e da matriz extracelular da cartilaxe. Polo tanto, a membrana sinovial xoga un papel importante no mantemento da articulación, polo que un fallo na súa funcionalidade ou na súa estrutura poden desencadear artropatías como a artritis reumatoide ou artrose <sup>7-9</sup>

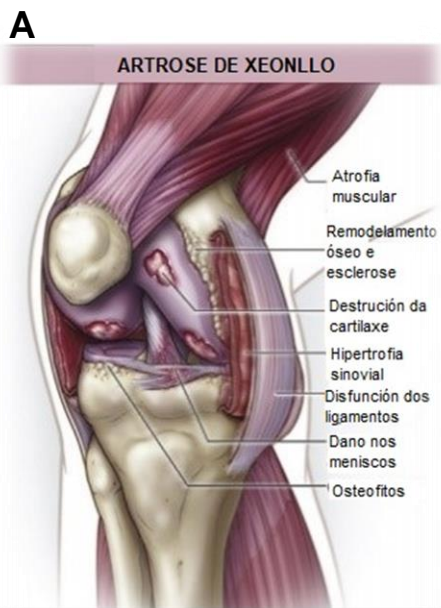


**FIGURA 3. Corte histolóxico de una membrana sinovial,** tinguida con hematoxilina-eosina a 20 aumentos. Revestimento de sinoviocitos (S) na capa íntima (I). A capa sub-íntima (SI) formado por tecido conxuntivo laxo (T conj) con seccións capilares (C). Imaxe extraída e modificada de Ea et al., 2008 <sup>10</sup>

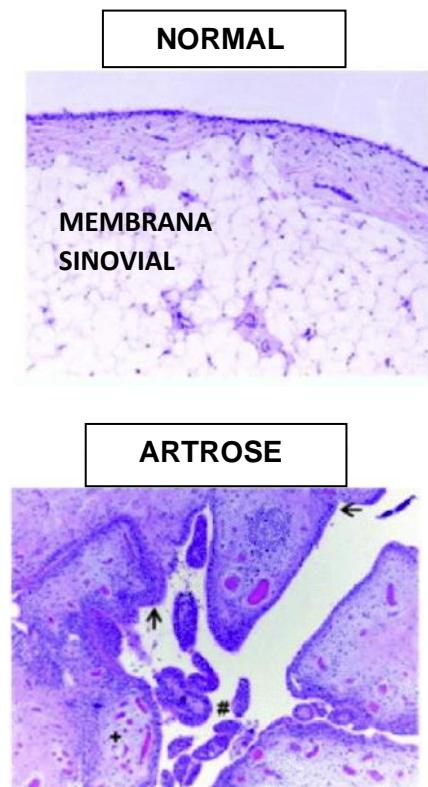
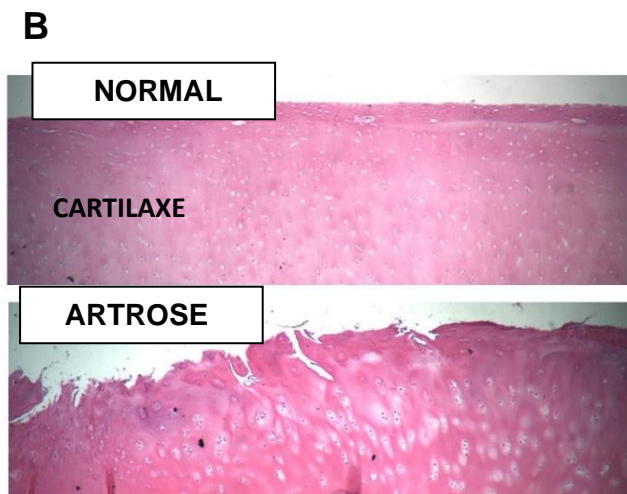
#### **1.4 A artrose**

A artrose ou osteoartritis (OA) é unha alteración nas articulacións sinoviais fundamentada principalmente no catabolismo da cartilaxe. A artrose pode afectar ás estruturas próximas, como poden ser o óso subcondral, tecido sinovial, ligamentos, músculo ou menisco (FIGURA 4). A artrose está causada por moitos factores (factores xenéticos, inflamatorios, mecánicos ou metabólico) que inician un desequilibrio no catabolismo e anabolismo do tecido cartilaxinoso <sup>11-13</sup>.

Na actualidade, non existen fármacos que curen a artrose, pero hai medicamentos que son útiles para controlar a dor e mellorar a funcionalidade da articulación de doentes con artrose: analxésicos, antiinflamatorios, condroprotectores e terapia intraarticular. Todos estes tratamentos teñen baixos efectos secundarios. O problema é a incompatibilidade destes fármacos con outros receitados a persoas maiores, por exemplo os anticoagulantes <sup>14</sup>.



**FIGURA 4. (A) Tecidos do xeonllo afectados pola artrose:** atrofia muscular, re-modelaxe ósea e esclerose, destrución da cartilaxe, hipertrofia sinovial, disfunción dos ligamentos ou dano nos meniscos. Imaxe extraída e modificada de *Blanco, 2018* <sup>15</sup> **(B) Cortes histolóxicos da cartilaxe (esquerda) e do tecido sinovial (dereita) normais e artrósicos.** Imaxes extraídas e modificadas de *Kong et al., 2017* <sup>16</sup>



### **1.4.1 Inflamación nos tecidos articulares artrósicos**

A inflamación é unha resposta inmune a patóxenos ou anomalías nas células e que xoga un papel importante na artrose. A inflamación eleva os niveis de citocinas proinflamatorias que activan o sistema inmune innato composto por células fagocíticas como macrófagos ou neutrófilos. IL-1, IL-6 ou o factor de necrosis tumoral (*TNF $\alpha$* ) son unhas destas citocinas responsable da estimulación destas células. Estas citocinas activan nas células rutas inflamatorias coma a modulada por *NF- $\kappa$ B*, (factor nuclear potenciador das cadeas lixeiras kappa das células B activadas). *NF- $\kappa$ B* é un factor nuclear que se atopa secuestrado no citoplasma e que transloca ó núcleo en presenza destas citocinas para activar a transcrición de xenes involucrados en respostas proinflamatorias e catabólicas.<sup>17,18</sup>

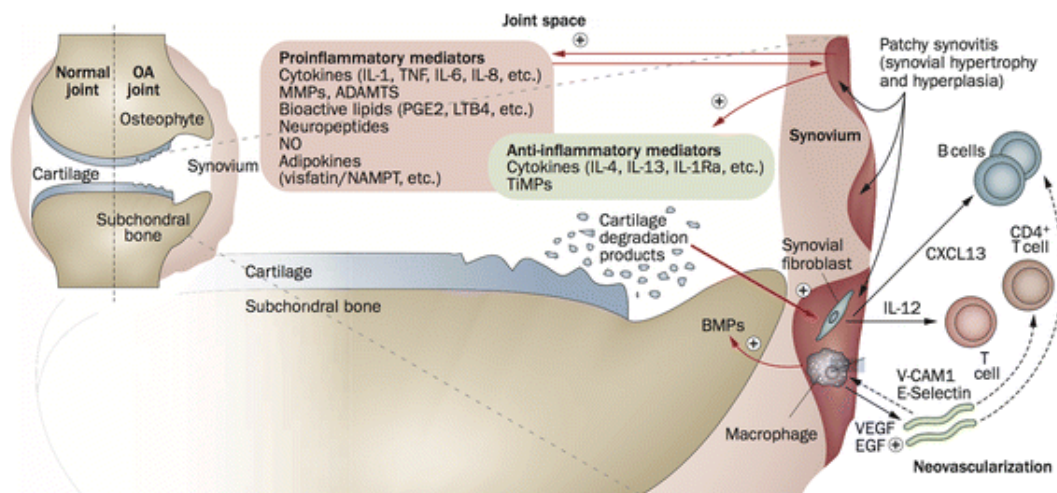
O mantemento da cartilaxe basease nun balance metabólico equilibrado nos condrocitos. O fenotipo dos condrocitos poder variar segundo as condicións fisiolóxicas ou de estrés: fenotipo condroblástico (expresa os tipos de coláxeno II e III), fenotipo anabólico (manteñen e rexenera o CEM sintetizando coláxeno II e proteoglicanos), un fenotipo catabólico (expresa encimas proteolíticas en resposta a factores proinflamatorios como el *TNF- $\alpha$* , interleucina IL-1 $\beta$  ou óxido nítrico (NO)), un fenotipo hipertrófico (expresa coláxeno X e é característico da zona profunda da cartilaxe) e finalmente o último fenotipo, o fibroblástico (repara o cartilaxe expresando coláxeno I). Na artrose observase un aumento do fenotipo catabólico dos condrocitos, que ademais de expresar citocinas proinflamatorias, producen un elevado número de metaloproteasas. As metaloproteasas son sintetizadas por condrocitos en resposta a estímulos inflamatorios, incluíndo IL-1  $\beta$ , *TNF- $\alpha$*  e NO. Unha das familias de metaloproteasas máis relevantes na artrose e a colaxenasa 3 (*MMP-3*) que degrada o principal compoñente da cartilaxe, o coláxeno II.<sup>19</sup>

A inflamación tamén xoga un papel importante na membrana sinovial, o cal caracterízase por un tecido altamente vascularizado e hiperplásico. Estes procesos poden finalmente, ó non ser controlados, derivar en fibrose



(FIGURA 4). Unha das consecuencia destes cambios na membrana sinovial é un aumento do número de leucocitos e macrófagos en resposta a adhesión das citoquinas aos receptores de membrana dos sinoviocitos <sup>9</sup>. Os receptores do sinoviocito son un dos principais mecanismos de modulación das respostas proinflamatorias, tales como os receptores de interleucinas IL-1, que inducen un efecto catabólico mediante a produción de interleucinas (IL-6, IL-8, IL-15) ou prostaglandinas (PGE<sub>2</sub>). As prostaglandinas poden ser sintetizadas polas dúas isoformas da ciclooxigenasa, COX-1 (constitutiva) e COX-2 (inducido por citoquinas como IL-1) <sup>20,21</sup>.

Pola contra, as citoquinas IL-4, IL-10 e encimas coma a Hemoxigenasa-1 (HO-1) actúan como mediadores antiinflamatorios, contrarrestando o efecto catabólico tanto no sinovio coma na cartilaxe. O equilibrio entre a liberación de mediadores proinflamatorios e as respostas antiinflamatorias xogan un papel importante no balance entre a formación e destrución da matriz extracelular dos tecidos. Na artrose este equilibrio vese danado afectando ó bo funcionamento dos tecidos (FIGURA 5) <sup>8</sup>



**FIGURA 5. Relación entre a inflamación sinovial e a artrose.** A inflamación sinovial provoca unha degradación do cartilaxe (artrose) mediada por citoquinas proinflamatorias como IL-1, IL-6, IL-8 ou NO. Imaxe extraída de *Mathiessen y Conaghan, 2017* <sup>9</sup>

#### **1.4.2 Estrés oxidativo nos tecidos articulares artrósicos**

O estrés oxidativo dáse como consecuencia dun desequilibrio entre a produción e a destrución das especies reactivas de osíxeno (*ROS*). Unha síntese descontrolada de *ROS* poder provocar danos nas mitocondrias, nos lípidos de membrana, nos ácidos riboxidonucleicos e nas proteínas <sup>22</sup>.

As proteínas nitradas son unha das consecuencias dos danos provocados por este estrés oxidativo. Estas proteínas anómalas proveñen da súa oxidación por parte de radicais como os peroxidonitritos que son o resultado da reacción entre o óxido nítrico (*NO*) e *ROS*. O *NO* é sintetizado pola Óxido Nítrico Sintasa inducida (*iNOS*) en presenza de citoquinas proinflamatorias como *IL-1*, *TNF $\alpha$*  e interferóns. Polo tanto, a inflamación nas células indirectamente provoca na célula un estrés oxidativo grazas ó aumento do *NO*. <sup>23</sup>

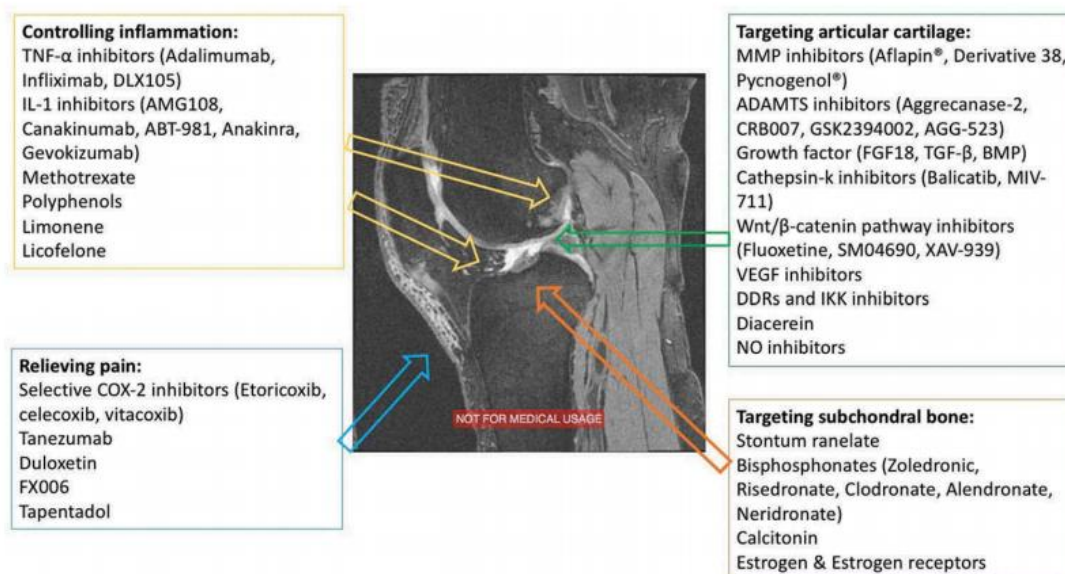
#### **1.4.3 Fibrose no tecido sinovial artrósicos**

A fibrose sinovial caracterízase por unha acumulación de células sinoviais fibroblásticas (*FLS*) que producen grandes cantidades de CME formando unha estrutura ríxida denominada pannus (FIGURA 6). Un dos factores que participan neste cambio na membrana sinovial é o Factor de Crecemento Tumoral *TGF- $\beta$* . Este factor de crecemento activa unha cascada de respostas que desencadean nun aumento da proliferación, da deposición de CME (por exemplo, fibronectina e, coláxeno I ou III) e da capacidade invectiva. *TGF- $\beta$*  tamén induce a inhibición das metaloproteasas evitando así a destrución do pannus. <sup>24</sup>



xenes profibróticos catabólicos  $NF-k\beta$ . Outros compostos antiinflamatorios son o Resveratrol, un fenol natural presente en uvas e baías que tamén modulan a resposta inhibindo a ruta COX2/PGE2 e a  $NF-k\beta$  <sup>32</sup>. As algas tamén presentan compostos cuxas propiedades son de gran interese no campo da reumatoloxía. Macroalgas como *Turbinaria ornata*, destacan por posuír compostos con propiedades antiinflamatorias, antioxidantes e inmunomoduladoras <sup>33</sup>. *In vivo*, extractos de polisacáridos sulfurados de baixo peso molecular (0,5KDa) extraídos da macroalga parda *Cladosiphon okamuranus* conseguiron reducir os niveis de leptinas e IL-1 nos ligamentos e no menisco artrósico-inducidos en ratas obesas <sup>34</sup>. Estes polisacáridos sulfurados son característicos de algas pardas e denomínanse fucoidanos.

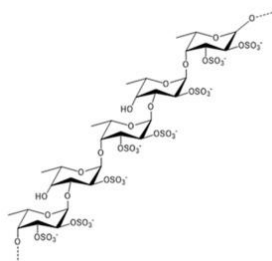
En resumo, as novas dianas terapéuticas focalízanse, entre outras, no control da inflamación, na destrución da cartilaxe ou na dor mediante tratamentos naturais. <sup>26,35</sup>



**FIGURA 7. Dianas terapéuticas contra as enfermidades reumáticas centradas no control da inflamación, na dor e no desgaste da cartilaxe e do óso subcondral.** Estas dianas son inhibidores de mediadores que participan na artrose (IL-1, COX-2, factores de crecemento como o  $TGF-\beta$ , ou metaloproteasas.). Imaxe extraída de *Zhu et al., 2018* <sup>26</sup>

### 1.5.1 Os fucoidanos. Estrutura e propiedades biolóxicas.

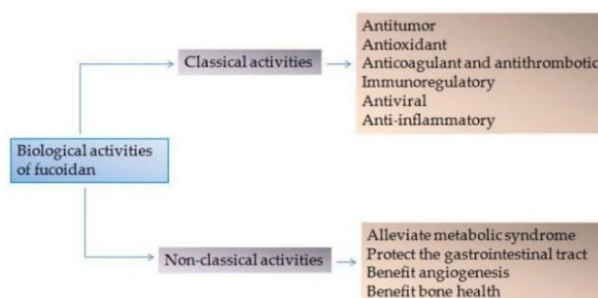
Os fucoidanos son polisacáridos con dúas cadeas principais sulfatadas nos carbonos 2 e 3. O principal monosacárido é L-fucosa-4-sulfato aos que se engaden outros compoñentes como ácido urónico, galactosa, xilosa, manosa, ramnosa, glucosa ou arabinosa (FIGURA 8). Os fucoidanos atópanse nas paredes celulares das algas pardas e en algúns invertebrados mariños. Os fucoidanos son unha estrutura complexa que diverxe quimicamente entre especies, e incluso entre individuos da mesma. A rexión o hábitat ou método de extracción son outros factores que inflúen na composición. Por exemplo, a cantidade e a estrutura dos fucoidanos varía entre estacións e entre especies segundo *Fletcher et al., 2017* <sup>36</sup>



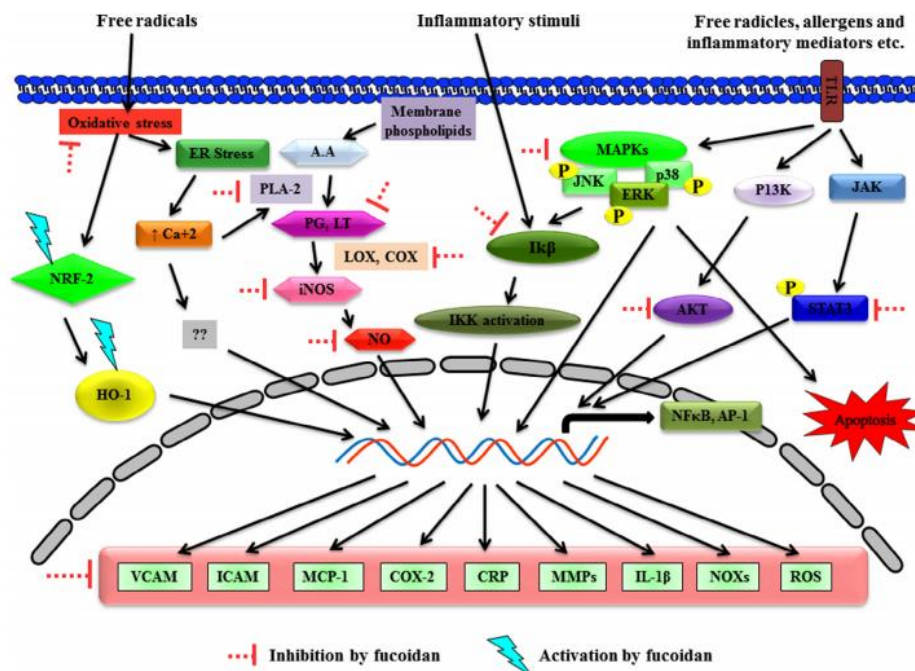
**FIGURA 8. Estrutura molecular do fucoidano *Fucus vesiculosus*.** Imaxe extraída de *Catarino et al., 2018* <sup>37</sup>

As algas pardas utilizan este composto como protección contra o desecamento, pero na clínica destacan por outras propiedades (FIGURA 9). De este forma os fucoidanos promoven ou inactivan distintas cascadas involucradas na expresión de xenes do metabolismo celular tal y como se mostra na FIGURA 10. Estes polisacáridos son polo tanto un potente antiinflamatorio, pero ademais son bos anti-anxióxénicos, antioxidantes e antivirais polo que estanse a estudar o seu uso contra o cancro, enfermidades intestinais, síndrome metabólica, ou enfermidades óseas como a osteoporosis, entre outras <sup>38–40</sup>

**FIGURA 9. Propiedades biolóxicas dos fucoidanos.** Destacan nas patoloxías articulares por ser antiinflamatorios ou antioxidantes. Imaxe extraída de *Wang et al., 2019*



Polo tanto, tendo en conta estas propiedades antiinflamatorias, antioxidantes e antifibróticas dos fucoidanos observadas noutros estudos, nos propoñemos con este traballo valorar as propiedades biolóxicas dos fucoidanos extraídos de *Fucus vesiculosus*, *Undaria pinnatifida* e *Macrocystis pyrifera* en células sinoviais e condrocitos de pacientes con artrose.



**FIGURA 10. Mecanismos de acción molecular dos fucoidanos no interior das células.** Os fucoidanos inhiben as rutas de HO-1 e bloquean as ruta do NO a distintos niveis, así como a expresión xénica de distintos mediadores proinflamatorios coma as metaloproteasas, COX-2, IL-1 ou ROS. Imaxe extraída de Klettner, 2016 <sup>38</sup>

## 2 OBXECTIVOS

Obxectivo principal: Estudar e comparar as propiedades antiinflamatorias, antioxidantes e anti-fibróticas dos fucoidanos *Fucus vesiculosus*, *Undaria pinnatifida* e *Macrocystis pyrifera* en células sinoviais e condrocitos de pacientes con artrose.

Obxectivos específicos:

- Valorar os niveis dos mediadores proinflamatorios IL-6, IL-8, COX-2 e *NF- $\kappa$ B* en condrocitos primarios procedentes de doentes artrósicos estimulados con IL-1 $\beta$  e os fucoïdanos.
- Valorar os niveis dos mediadores proinflamatorios IL-6, IL-8, COX-2 en sinoviocitos primarios procedentes de doentes artrósicos estimuladas con IL-1 $\beta$  e os fucoïdanos.
- Estudar a produción do mediador de estrés oxidativo NO e a expresión da encima antioxidante HO-1 en células sinoviais estimulados con IL-1 $\beta$  e os fucoïdanos.
- Valorar o efecto de *TGF- $\beta$*  na proliferación, a invasión e a produción de CME coma o coláxeno tipo I e III, e PLOD2 nas células sinoviais e a súa modulación cos fucoïdanos.

### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Recollida de mostrás**

Os condrocitos e sinoviocitos foron extraídos da articulacións artrósicas de xeonllo e cadeira procedentes de operacións cirúrxicas (fracturas e reemplazamentos articulares) no Complexo Hospitalario Universitario de A Coruña (CHUAC). O número de doantes foron 7 (4 mulleres e 3 homes). A idade media dos doentes é de 77 $\pm$ 13 anos. Todos os procesos levados a cabo durante a investigación respectaron as condicións éticas propostas na Lei 14/2007 da Investigación Biomédica e na Declaración de Helsinki. Todas as mostrás foron anónimas e procesadas baixo o consentimento do doante e xurado por escrito no consentimento informado (ANEXO I)

### **3.2 Cultivo celular**

Tal e como se describiu previamente <sup>19</sup>, a mostra da cartilaxe articular separouse do óso mecanicamente e dixeríuse encimáticamente con tripsina (Sigma-Aldrich, San Luis, Estados Unidos) e colaxenasa tipo IV (Sigma-Aldrich, San Luis, Estados Unidos). Os condrocitos xa libres resuspendéronse en medio *Dulbecco's modified Eagle's medium* (DMEM) (Lonza, Verviers, Bélxica) suplementado con 10% de soro bovino fetal (SBF) (Gibco, Life technologies, Pasley, Inglaterra) e penicilina e estreptomina (P/S) para evitar contaminación bacteriana e fúngica. Por outro lado, a membrana sinovial separouse da articulación e cortouse en anacos pequenos. Estes anacos resuspendéronse nunha placa en medio DMEM suplementado con 10% de soro bovino fetal SBF e P/S ata que as células sinovias abandoaron o tecido e pasaron á superficie da placa. As células xa illadas mantivéronse en cultivo durante semanas nunha estufa a 37 ° C cunha saturación de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) do 5%. Cando a células chegaron a confluencia fixéronse subcultivos con tripsina (Gibco, Life technologies, Pasley, Inglaterra). Os condrocitos usáronse para experimentos no segundo subcultivo mentres que os sinoviocitos empregáronse entre os subcultivos 3 e 8, e os sinoviocitos entre 3 e 8 veces. Antes de cada experimento depleccionáronse nun medio con menos concentración de SBF (DMEM 0,5% SBF) ata a confluencia (entre 24 e 48 horas).

### **3.3 Preparación de estímulos: Fucoidanos, IL-1 $\beta$ e TGF- $\beta$**

Os fucoidanos empregados proceden de 3 especies diferentes de algas pardas: *Fucus*: *Fucus vesiculosus* (20,7KDa) , *Undaria pinnatifida* (51,7KDa) e *Macrocystis pyrifera* (176,4 KDa). As concentracións ensaiadas foron 5  $\mu$ g/mL e 30  $\mu$ g/mL. A resposta inflamatoria simulouse engadindo ás células IL-1 $\beta$  (Sigma-Aldrich, San Luis, Estados Unidos) na concentración 5 ng/ml e, para as respostas fibróticas engadiuse TGF- $\beta$  (Abcam, Cambridge, Inglaterra) 10 ng/ml. Os medio de estimulación foron DMEM 0% SBF para condrocitos e 0,5% SBF para sinoviocitos, agás no



ensaio de ferida que se usou medio DMEM SBF 0% despois da ferida e no ensaio de proliferación DMEM 2% SBF.

### **3.4 Análise da expresión xénica**

Cultiváronse 250 mil células por pocillo en placas de 12 pocillos ata a confluencia. Despois, estimuláronse con fucoïdanos, IL-1 $\beta$  /TGF- $\beta$  durante 24 horas para os experimentos con condrocitos e 48 horas para o experimentos con sinoviocitos. A análise da expresión xénica das células cultivadas comeza ca extracción e cuantificación do ARN, a retrotranscrición a ADN complementario (ADNc) e finalmente amplifícanse por unha reacción en cadea da polimerasa a tempo real (*qPCR*).

#### **3.4.1 Extracción do ARN**

Seguindo o protocolo descrito <sup>41</sup>, o ARN extraeuse co *Trizol reagent* (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, Estados Unidos) que illa os ácidos nucleicos e lisa as células. Para a separación de fases (acuosa-orgánica) empregouse cloroformo. O ARN que quedou suspendido na fase acuosa recuperouse con isopropanol e elimínase os restos mediante lavados con etanol e centrifugacións

#### **3.4.2 Cuantificación do ARN e eliminación do ADN**

A cuantificación de ARN fíxose no *NanoDROD ND-1000* (Thermo Fisher Scientific) e posteriormente concentráronse todas as mostras a 500 ng de ARN. Os restos de ADN elimináronse quentándose as mostras con ADNsa no termociclador *Gene Amp PCR system 9700* (Applied Biosystems, California, Estados Unidos) a 37°C 30 minutos. A reacción freouse inactivando a encima con *EDTA* 65°C 10 minutos.

### **3.4.3 Retrotranscripci3n a cADN**

Xa obtido o ARN libre de impurezas retrotranscríbese para obter ADNc co kit *NZY First- Strand cADN Synthesis* (Nzytech, Lisboa, Portugal). Seguiuse o protocolo desta casa comercial.

### **3.4.4 qPCR**

As mostras co ADNc amplificaronse por *PCR* a tempo real con sondas *taqman*, deseñadas especificamente para incrementar a especificidade. A actividade exonucleasa 5`-3`de a Taq polimerasa escinde a sonda xa hibridada a secuencia diana. A sonda presenta en cada extremo un fluoróforo e un *quencher* que cando están próximos este inhibe o fluorocromo. A liberación da sonda grazas a Taq polimerasa permite que o fluorocromo escape do *quencher* e poida emitir sinal fluorescente. Este sinal é recollida polo *LightCycler 4800* (Roche Diagnostics, Basilea, Suiza). A PCR mídese en ciclos repetitivos: desnaturalización, hibridación e extensión. A fluorescencia detectase na extensión. O ciclo no que o aparello detecta por primeira vez sinal denomínase CP, e é o dato que se recolle para analizar a expresión xénica. Os datos foron normalizados empregando un control de carga (*HouseKeeping*). O *Housekeeping* é un xen que non está modulado polos estímulos empregados. Os xenes codificantes para HPRT e RPL13 foron os *housekeeping* empregados na *qPCR*. HPRT foi o marcador referencia en sinoviocitos e RPL13 en condrócitos. A secuencia dos cebadores empregados na *qPCR* móstranse na TÁBOA 1.

**TÁBOA 1. Secuencia dos cebadores empregados na qPCR**

XENE	CEBADOR DIRECTO	CEBADOR REVERSO
COX-2	CTTCACGCATCAGTTTTTCAAG	TCACCGTAAATATGATTTAAGTCCAC
IL-6	GATGAGTACAAAAGTCCTGATCCA	CTGCAGCCACTGGTTCTGT
IL-8	GAGCACTCCATAAGGCACAAA	ATGGTTCCTTCCGGTGGT
COL1A1	CTGGCCCCATTGGTAATGT	ACCAGGGAACCAGTAGCAC
COL3A2	CTGGACCCAGGGTCTTC	CATCTGATCCAGGGTTTCCA
FN1	CTGGCCGAAAATACATTGTAAA	CCACAGTCGGGTCAGGAG
PLOD2B	CACCGTAAATATGATTTAAGTCCAC	TCCGGAGTAGGGGAGTCTTT
HPRT1	CAAGCGGATGAACACCAAC	TGTGGGGCAGCATACCTC

### 3.5 Análise dos niveis proteicos (*Western Blot*)

Cultiváronse 250 mil células por pocillo en placas de 12 pocillos ata a confluencia. Despois, estimuláronse con fucoidanos e IL-1 $\beta$  durante 24 horas. As células rompéronse cun tampón de lisis composto por un 98% Tampón Tris HCl pH 8,8, 1% de PMSF e 1% dun cocktail de inhibidores de proteasas. As mostras quentáronse a 100°C, centrifugáronse e se gardaron a -20°C ata o seu procesamento.

#### 3.5.1 Electroforese

As mostras novamente quentáronse a 100°C para permitir que as proteínas perdan a conformación e sexan máis accesibles ó SDS do tampón de carga (10 % SDS, 200mM Tris-HCl pH 6.8, 50 % glicerol, 0.1 % azul de bromofenol e 10 % de  $\beta$ - mercaptetanol) previamente engadido. Logo, as mostras corréronse nun xel de electroforese desnaturizante de acrilamida/bisacrilamida (*SDS-PAGE*) ó 10%. As proteínas migraron do polo negativo ó positivo grazas ó SDS que dota ás proteínas das mostras cunha carga negativa. A electroforese fíxose nunha cubeta (Bio Rad, California, Estados Unidos) a 80V 2 horas cun tampón de electroforese TAE composto por Tris HCl, acetato e ácido etilendiamino tetraacético (*EDTA*). As bandas proteicas resultantes transferíronse a unha membrana de

fluoruro de polivinilideno (PVDF) (Millipore, Massachusetts, Estados Unidos) preactivada con metanol. A efectividade da transferencia comprobouse tinguido a membrana cunha solución de Vermello *Ponceau* (Sigma-Aldrich, San Luis, Estados Unidos)

### 3.5.2 Inmunodetección

A membrana bloquéase 1 hora e logo as proteínas de interese detectáronse con anticorpos primarios incluídos na TÁBOA 2 diluídos en leite o 5% toda a noite. Logo, engadíuselles os anticorpos secundarios anti-coello e anti-rato (tamén diluídos en leite) segundo a TABOA 2. As bandas detectáronse por quimioluminiscencia co *Luminata Classico Western HRP substrate* (Millipore, Massachusetts, estados Unidos,), no equipo *Amersham imager 600* (GE Healthcare, Amershan, Reino Unido). A cuantificación da intensidade das bandas proteicas realizouse por densitometría co programa informático *Image Quant 5.2* (GE Healthcare, Amershan, Reino Unido). Os resultados foron normalizados medindo os niveis proteicos da Tubulina (50 kDa). Empregouse a Tubulina porque a súa síntese é constante e non está modificada polos estímulos (fucoidanos e IL-1 $\beta$ )

**TÁBOA 2 . Dilucións dos anticorpos empregados na inmunodetección das proteínas de interese: HO-1 e tubulina como normalizador de resultados.**

	Anticorpo 1º	Anticorpo 2º
HO-1	Anti- HO1 (Enzo)	Anti- Coello (GE Healthcare)
	Dilución 1:1000	Dilución 1:1000
Tubulina	Anti- Tubulina (Sigma-Aldrich)	Anti- Rato
	Dilución 1:2000	Dilución 1:1000

### 3.6 Determinación de NO

Cultiváronse 25 mil sinoviocitos por pocillo en placas de 96. Logo, estimuláronse con fucoidanos e IL-1 $\beta$  durante 48 horas. O reactivo de Griess (Enzo, Life Science) detecta en solución a presenza de nitritos

orgánicos coma o Óxido Nítrico (NO). Os niveis de NO foron medidos por absorbancia a 540 nm no *NanoQuant Infinite M200* (Tecan, Männedorf, Suiza). Os datos obtidos foron estropolados a unha curva standard de Nitrito Sódico (0,1-10  $\mu$ M)

### **3.7 Determinación de IL-6**

Cultiváronse 25 mil células por pocillo en placas de 96 pocillos. Logo, estimuláronse con fucoidanos e IL-1 $\beta$  durante 48 horas. Retírouse o sobrenadante previa centrifugación e transferiuse a outra placa. Os sobrenadantes gardáronse a -80°C. O IL-6 liberado nos sobrenadantes detectouse mediante *ELISA* seguindo as instrucións do kit comercial *DuoSet ELISA IL-6* (R&Dsystems, Mineapolis, Estados Unidos) empregado. A absorbancia mediuse no *NanoQuant Infinite M200* (Tecan, Männedorf, Suiza)

### **3.8 Inmunofluorescencia de NF- $\kappa$ $\beta$**

Cultiváronse 7 mil condrocitos por pocillo en *chambers* de 8 pocillo. Logo, estimuláronse con fucoidanos e IL-1 $\beta$  durante 1 hora. Os cultivos fixéronse en acetona e permeabilizáronse con *PBS*, *Tween* ó 0,2% e *Triton*. As células incubáronse cun anticorpo monoclonal fronte a *NF- $\kappa$  $\beta$*  (Santa Cruz) diluído en *PBS* e *ween* ó 0,2% a unha relación de 1:50 toda a noite. Despois de repetitivos lavados incubouse o anti-corpo secundario anti--mouse marcado con fluoresceína 30 minutos. Os núcleos foron tinguidos con 4,6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) durante 2 minutos. Finalmente se montou en *glicergel* (DAKO Real, Madrid, España) e se visualizou ó microscopio de fluorescencia *Olympus BX61* (Olympus Biosystems, Tokio, Japón)

### **3.9 Análise da capacidade prolífera**

Cultiváronse 25 mil células por pocillo en placas de 96 pocillos ata a confluencia. As células sinoviais foron estimuladas con fucoidanos e *TGF- $\beta$*  durante 48 horas en placas de 96 pocillos. A continuación valorouse a

proliferación celular mediante o kit “*BrdU Cell proliferation assay Kit*” (Cell signaling technology) e seguindo o seu protocolo.

### **3.10 Análise da capacidade invectiva**

Cultiváronse 100 mil sinoviocitos por pocillo en placa de 24 pocillos con fucoidanos e *TGF-β*. O ensaio de invasión realizouse en insertos de 8 μm de poro sobre placas de 24 pocillos. O matrixel unha red proteica xelatinosa que simula un tecido, incubouse 1 hora nos insertos para facilitar a súa xelificación sobre a membrana porosa do inserto. O cultivo celular de sinoviocitos xa pretratado 48 horas cos fucoidanos e *TGF-β* levantáronse con tripsina e pasáronse 30 mil células/pocillo ós insertos e incubáronse 24 horas. Como quimio-atraente utilizouse unha diferenza de concentración de SBF no medio de cultivo. O medio sobre o pocillo levaba un 10% de SBF e o medio no inserto un 0,5%. Transcorridas as 24 horas as células retidas na membrana do inserto fixéronse con metanol e tinguíronse con violeta de metilo. As células superficiais non invectivas elimináronse cun hisopo mentres que as células que atravesaron o matrixel foron fotografadas nun microscopio invertido e cuantificáronse no programa informático *imagej*.

### **3.11 Análise da capacidade cicatrizante**

Cultiváronse 50 mil sinoviocitos por pocillo en placa de 24 pocillos con fucoidanos e *TGF-β*. Despois, estimuláronse con fucoidanos e *TGF-β* durante 48 horas. Transcorrida a estimulación, raspouse a placa de cultivo cunha punta de pipeta de 10 μl quedando así unha ‘ferida’. A continuación as células incubáronse en medio sen SBF durante 24h. Se obtiveron fotos antes no momento facer o raspado e ás 24 horas. O peche da ferida foi analizado medindo o área reducido no programa informático *imagej*.

### **3.12 Cuantificación de coláxeno liberado**

Cultiváronse 50 mil sinoviocitos por pocillo en placa de 96 pocillos con fucoidanos e *TGF- $\beta$*  ata a confluencia. Despois, estimuláronse con fucoidanos e *TGF- $\beta$*  durante 48 horas. A tinguidura con *Picosirus Red (PSR)* permite cuantificar relativamente a presenza de coláxeno formado no cultivo celular xa que o *PSR* únese especificamente a este CME e a coloración pode ser posteriormente cuantificada mediante a absorbancia a 550 nm nun espectofotómetro <sup>42</sup>. As células previamente fixadas en metanol incubáronse 3 horas cunha solución de *PSR* ó 0,1% (Sigma-Aldrich, San Luis, Estados Unidos). Retírouse a solución e lavouse o fondo celular con ácido acético ó 0,1%. Finalmente engadiuse Hidróxido Sódico ó 0,1M e leuse a absorbancia no *NanoQuant Infinite M200* (Tecan, Männedorf, Suiza) a 550nm.

### **3.13 Análise estatístico**

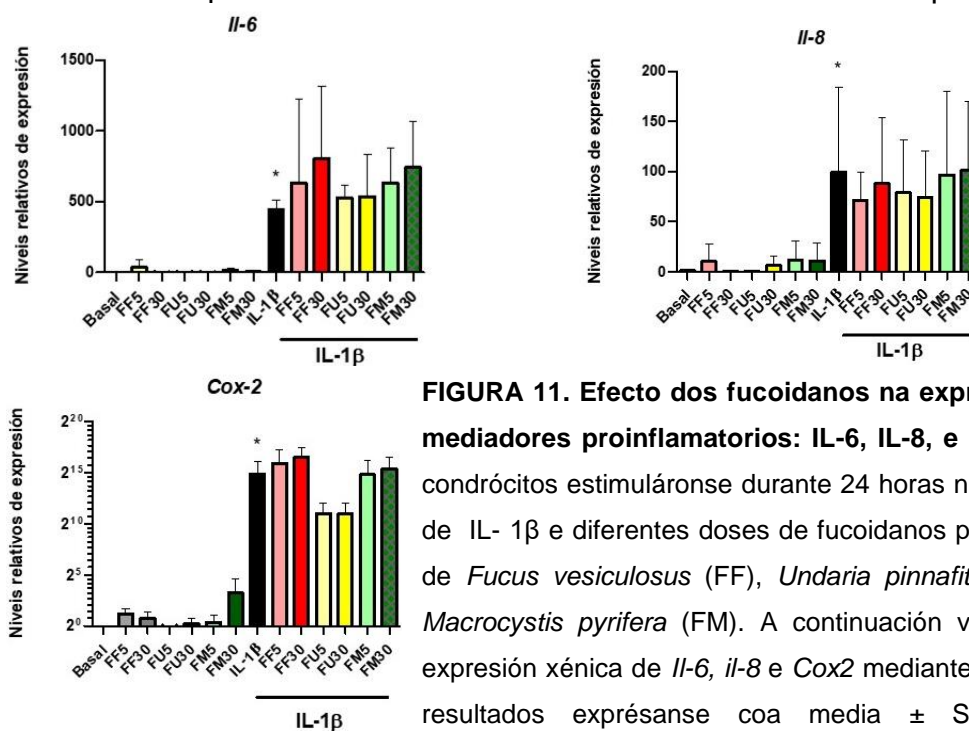
Os datos expresáronse como a media  $\pm$  SD. A análise estatística dos datos realizouse co programa *GraphPad Prism 5* (GraphPad Software, La Jolla, Estados Unidos) aplicando o test pareado con unha cola considerando estatisticamente significativos valores de  $p < 0.05$ .

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Resposta inflamatoria en condrocitos

#### 4.1.1 Niveis relativos de expresión xénica dos mediadores inflamatorios IL-6, IL-8 e COX-2

Como foi amplamente descrito, IL-6, IL-8 e PGE2 son mediadores que actúan como indutores proinflamatorios. Con este experimento queremos observar se os fucoidanos modulan a expresión dos xenes que codifican para os mediadores IL-6, IL-8 e a encima que cataliza PGE2, COX-2 en presenza ou ausencia do indutor proinflamatorio IL-1 $\beta$ . Os resultados obtidos representados na FIGURA 11 mostran que ningún dos fucoidanos testados modulou a expresión xénica dos mediadores proinflamatorios estudados, agás *Mactocystis pyrifera*, que estimulou a expresión de Cox-2. Pola contra, demostrase o efecto inflamatorio de IL-1 $\beta$ , o cal incrementou a expresión de todos os xenes testados. Ademais, os fucoidanos non modularon o efecto de IL-1 $\beta$ , a excepción de *Undaria pinnatifida* que reduciu a expresión do xen Cox-2 nas células tratadas con IL-1 $\beta$

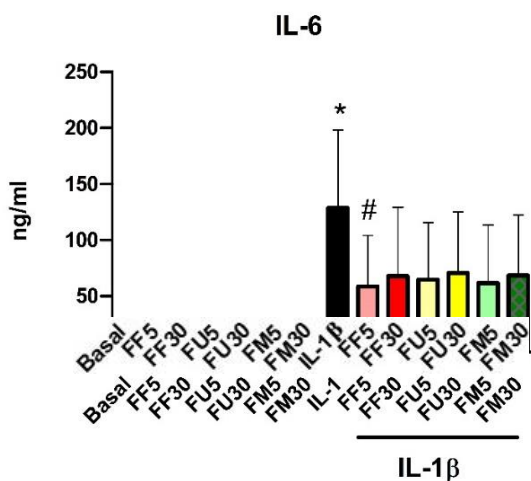


**FIGURA 11. Efecto dos fucoidanos na expresión dos mediadores proinflamatorios: IL-6, IL-8, e COX-2.** Os condrocitos estimuláronse durante 24 horas na presenza de IL-1 $\beta$  e diferentes doses de fucoidanos procedentes de *Fucus vesiculosus* (FF), *Undaria pinnatifida* (FU) e *Macrocystis pyrifera* (FM). A continuación valorouse a expresión xénica de IL-6, IL-8 e Cox2 mediante qPCR. Os resultados exprésanse coa media  $\pm$  SD dos 3 experimentos. As expresión dos 3 xenes baixo o estímulo de IL-1 $\beta$  é significativa fronte ós basais (\* p < 0.05).



#### 4.1.2 Niveis de IL-6 liberados ó medio extracelular

Para confirmar os resultados obtidos a nivel de expresión xénica, valorouse os niveis da citoquina IL-6 liberados ó medio extracelular mediante *ELISA* tal y como se mostra na FIGURA 12. Nas células estimuladas só con IL-1 $\beta$ , a liberación de IL-6 foi significativa fronte ó basal (\*  $p < 0.05$ ). Nas células non estimuladas con IL-1 $\beta$ , os fucoidanos non modularon a liberación de IL-6, agás *Macrocystis pyrifera* 30  $\mu\text{g/mL}$  que a incrementou. A liberación desta citoquina co-relaciónanse coa súa expresión xénica. Por outra banda, os fucoidanos reduciron a liberación de IL-6, sendo só significativo *Fucus vesiculosus* (#  $p < 0.05$  vs. IL-1 $\beta$ ). En xeral, a liberación de IL-6 foi lixeiramente menor cas doses 5  $\mu\text{g/mL}$ .

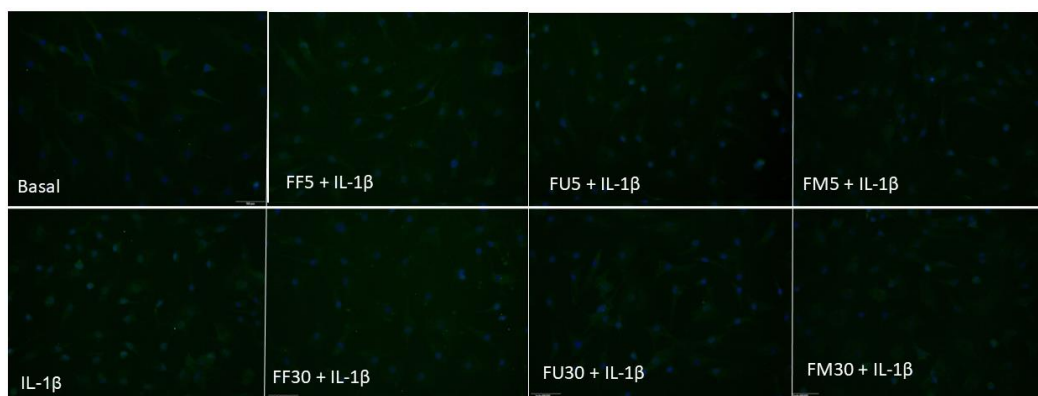


**FIGURA 12. Efecto dos fucoidanos na liberación de IL-6 ó medio.** Os condrocitos estimuláronse durante 24 horas na presenza de IL-1 $\beta$  e diferentes doses de fucoidanos procedentes de *Fucus vesiculosus* (FF), *Undaria pinnatifida* (FU) e *Macrocystis pyrifera* (FM). A continuación detectouse a liberación de IL-6 mediante *ELISA*. Os resultados exprésanse coa media  $\pm$  SD dos 4 experimentos. IL-1 $\beta$  induce significativamente (\* $p < 0.05$  vs. Basal). *Fucus vesiculosus* 5  $\mu\text{g/mL}$  reduce significativamente a inflamación (#  $p < 0.05$  vs. IL-1 $\beta$ ).

#### 4.1.3 Localización celular de *NF-k $\beta$*

*NF-k $\beta$*  é un factor de transcripción que se atopa secuestrado no citoplasma, que na presenza de estímulos proinflamatorios transloca ó núcleo para inducir a transcripción de citoquinas como IL-6, IL-8 ou COX-2. Tal e como vimos na sección anterior, a liberación de IL-6 redúcese en todos os fucoidanos aínda que só foi significativo para *Fucus vesiculosus* 5  $\mu\text{g/mL}$ .

Neste apartado quixemos ver se esta diminución é debida a que os fucoidanos actúan sobre *NF- $\kappa$ B*. Mediante a inmunodetección de *NF- $\kappa$ B* detectamos a súa presenza mediante unha fluorescencia verde (FITC) e o núcleo con unha fluorescencia azul (DAPI). As imaxes obtidas móstranse na FIGURA 13. Na mostra con IL-1 $\beta$ , a emisión verde e azul están solapadas no núcleo, isto significa que *NF- $\kappa$ B* está translocando ó núcleo. Na condición basal non existe este solapamento de emisións polo que *NF- $\kappa$ B* aínda atópase secuestrado no citoplasma. Os condrocitos tratados con os fucoidanos retiveron a translocación do factor sendo as células tratadas con *Undaria pinnatifida* 30  $\mu$ g/mL as que máis se aproximaron a emisión das células sen tratamentos.

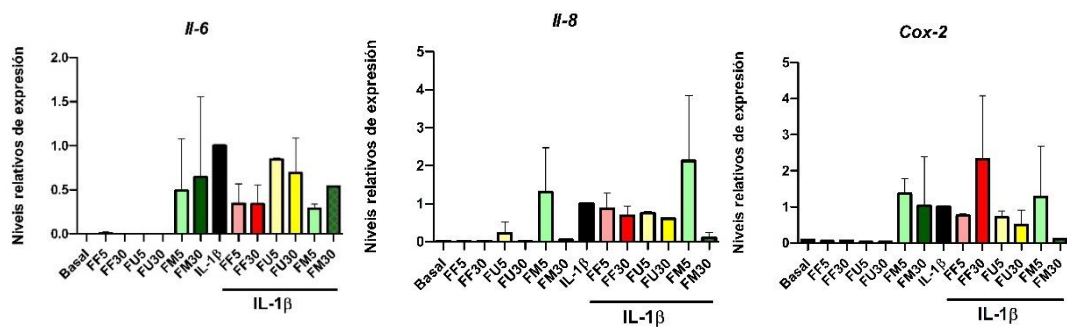


**FIGURA 13.** Representación da localización de *NF- $\kappa$ B* detectado por inmunofluorescencia (FITC) despois de 1 hora de estimulación. Os condrocitos estimuláronse durante 24 horas na presenza de IL- 1 $\beta$  e diferentes doses de fucoidanos procedentes de *Fucus vesiculosus* (FF), *Undaria pinnatifida* (FU) e *Macrocystis pyrifera* (FM). Estudouse a localización de *NF- $\kappa$ B* por inmunofluorescencia mediante anticorpos marcados con FITC (verde). Os núcleos foron contra-tinguidos con DAPI (azul). As imaxes foron obtidas a 20 aumentos no microscopio de fluorescencia *Olympus BX61* (Olympus Biosystems, Tokio, Xapón).

## 4.2 Resposta inflamatoria en sinoviocitos

### 4.2.1 Niveis relativos de expresión xénica dos mediadores inflamatorios IL-6, IL-8 e COX-2

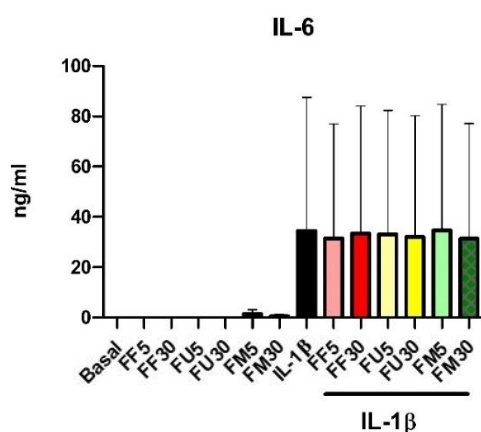
Despois de observar os efectos antiinflamatorios dalgúns fucoidanos sobre os condrocitos, estudouse se estes resultados podían repetirse nas células fibroblásticas do tecido sinovial, os sinoviocitos tipo B. Para elo, primeiramente analizouse a expresión xénica dos mediadores proinflamatorios *IL-6*, *IL-8* e *Cox-2*. Os resultados mostran que *IL-1 $\beta$*  induce significativamente a expresión dos xenes estudados. Ó igual que nos condrocitos, ningún dos fucoidanos estudados modulou a expresión xénica dos mediadores proinflamatorios agás de novo *Mactocystis pyrifera*. Pola contra o efecto inflamatorio de *IL-1 $\beta$*  foi modulado por *Macrocystis pyrifera* 30  $\mu$ g/mL en tódolos xenes. Ademais, destaca o efecto de *Fucus vesiculosus* e *Undaria pinnatifida* 5  $\mu$ g/mL sobre a expresión de *IL-6*.



**FIGURA 14.** Representación do efecto dos fucoidanos na expresión dos mediadores proinflamatorios: IL-6, IL-8, e COX-2. Os sinoviocitos estimuláronse durante 48 horas con IL-1 $\beta$  e os fucoidanos; Fucoxantano *Fucus vesiculosus* (FF), Fucoxantano *Undaria pinnatifida* (FU) e Fucoxantano *Macrocystis pyrifera* (FM). A continuación valorouse a expresión xénica de *IL-6*, *IL-8* e *Cox2* mediante *qPCR*. Os resultados exprésanse coa media dos 2 experimentos.  $\pm$  SD dos 2 experimentos.

#### 4.2.2 Niveis de IL-6 liberados ao medio extracelular

Os resultados obtidos da expresión xénica quixéronse comprobar mediante o estudo da liberación ó medio extracelular da citoquina IL-6. Sen embargo ningún fucoidano modulou a súa liberación, tanto na presenza como na ausencia de IL-1 $\beta$  (FIGURA 15). Non obstante, da mesma forma que nos condrocitos, obsérvase que *Macrocystis pyrifera* promoveu a expresión por sí mesma a liberación de IL-6 nos sinoviocitos.

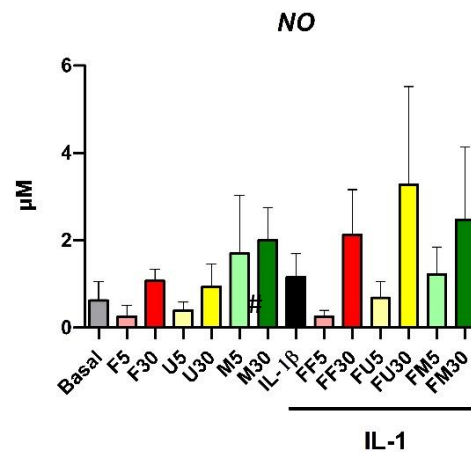


**FIGURA 15. Efecto dos fucoidanos na liberación de IL-6 ó medio extracelular .** Os sinoviocitos estimuláronse durante 48 horas con IL- 1 $\beta$  e diferentes doses de fucoidanos procedentes de *Fucus vesiculosus* (FF), *Undaria pinnatifida* (FU) e *Macrocystis pyrifera* (FM). A continuación valorouse o niveis de IL-6 liberados ó medio. Os resultados exprésanse coa media  $\pm$  SD dos 3 experimentos.

#### 4.2.3 Niveis do mediador de estrés oxidativo NO

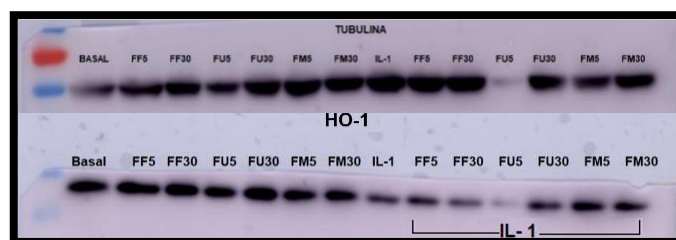
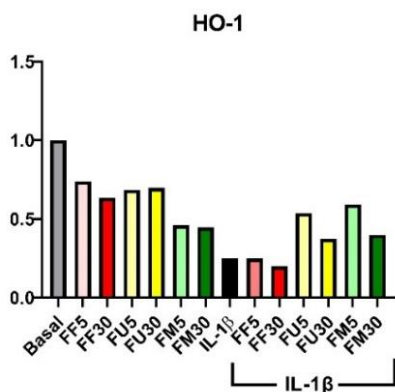
No interior da célula a reacción de ROS co seu entorno provoca unha cascada de sinais que resultan nunha disfunción ou morte celular. Un destes mediadores do estrés é o NO, sintetizado por *iNOS* en presenza de IL-1 $\beta$ . Neste apartado do estudo, o obxectivo foi determinar se o efecto dos fucoidanos era actuar como antioxidante reducindo NO. Os resultados representados na FIGURA 16 mostran que en xeral os fucoidanos a unha dose de 5  $\mu$ g/mL mostran un poder antioxidante, con ou sen IL-1 $\beta$ . Unicamente *Fucus vesiculosus* 5  $\mu$ g/mL reduce significativamente NO (#  $p < 0.05$  vs. IL-1 $\beta$ ).

**FIGURA 16. Efecto dos fucoidanos na liberación de NO.** Os sinoviocitos estimuláronse durante 48 horas con IL-1 $\beta$  doses de fucoidanos procedentes de *Fucus vesiculosus* (FF), *Undaria pinnatifida* (FU) e *Macrocystis pyrifera* (FM). Os resultados exprésanse coa media  $\pm$  SD dos 3 experimentos. A continuación valorouse os niveis de NO no medio co reactivo de Griess. Unicamente *Fucus vesiculosus* 5  $\mu$ g/mL reduce significativamente NO (#  $p < 0.05$  vs. IL-1 $\beta$ ).



#### 4.2.4 Niveis relativos do mediador antioxidante HO-1

No estudo anterior observouse que os fucoidanos administrados modificaban os niveis de NO, alterando así o estrés oxidativo na célula. Debido a estes resultados, quixemos valorar os niveis da proteína HO-1, estreitamente relacionada cos efectos antioxidantes na célula. Os resultados deste estudo reflexan que IL-1 $\beta$  bloquea a produción da encima, e que os fucoidanos, agás *Fucus vesiculosus*, palían o efecto de IL-1 $\beta$  (FIGURA 17). Ademais, e coincidindo cos resultados do estudo anterior, a concentración de 5  $\mu$ g/mL foi a que mostrou unha maior recuperación da expresión de HO-1 en presenza de IL-1 $\beta$ .

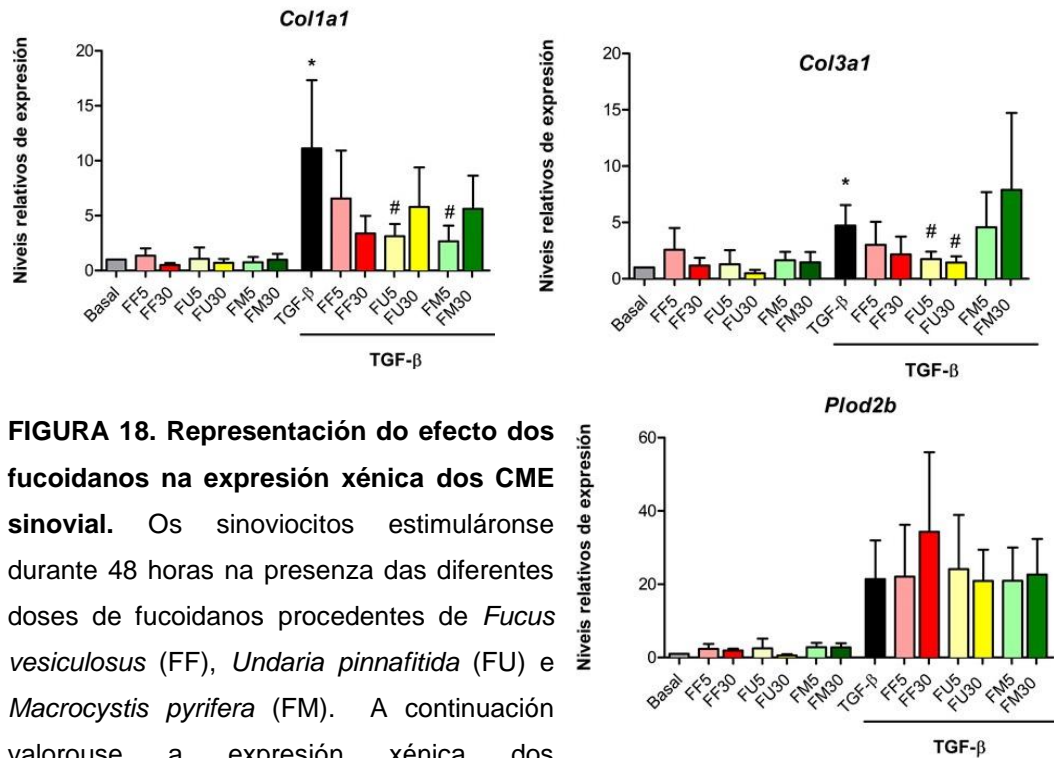


**FIGURA 17. Efecto dos fucoidanos na produción proteica do antioxidante HO-1.** Os sinoviocitos estimuláronse durante 48 horas con IL-1 $\beta$  e diferentes doses de fucoidanos procedentes de *Fucus vesiculosus* (FF), *Undaria pinnatifida* (FU) e *Macrocystis pyrifera* (FM). A continuación cuantificouse as proteínas por *Wester Blot*.

#### 4.4 Resposta profibrótica en sinoviocitos

##### 4.4.1 Niveis relativos de expresión xénica dos mediadores fibróticos: *Col1a1*, *Col3a1* e *Plod2b*

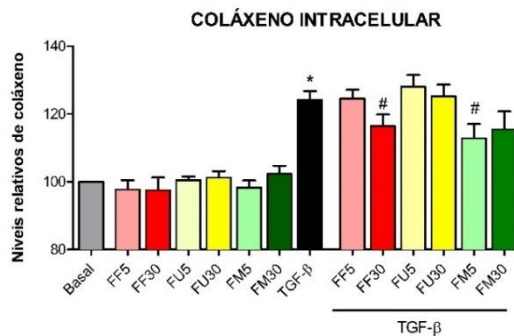
Como consecuencia da reacción inflamatoria prolongada pódese xerar na membrana sinovial un tecido fibrótico denominado pannus sinovial. O pannus caracterízase por unha estrutura ríxida formada por unha gran acumulación células sinoviais tipo fibroblasto. Estes sinoviocitos presentan un fenotipo máis proliferativo e sintetizan máis matriz extracelular . Neste apartado do traballo, analizouse primeiramente os niveis de expresión dos xenes codificantes para algunha das proteínas máis abundantes da matriz, o coláxeno I e III. Ademais, estudouse a expresión do xen *plod2* que codifica para unha encima que cataliza a hidroxilación dos residuos de lisina nas secuencias do coláxeno. De esta forma, o coláxeno é mais dificilmente degradable <sup>43</sup>. Para inducir a resposta fibrótica estimularonse os sinoviocitos con *TGF-β*, un inductor profibrotico ben caracterizado. O obxectivo foi valorar a capacidade antifibrótica dos fucoidanos e ver se estes reducen a síntese de coláxenos e *plod2*. As células tratadas con *TGF-β* mostran unha maior expresión deste xen (\* $p < 0.05$  vs. basal). Por outra banda, os fucoidanos modularon en xeral este efecto, acadando a significación para ambos tipos de coláxeno con *Undaria pinnatifida* 5 µg/ml (# $p < 0.05$  vs. *TGF-β*). Pola contra, a expresión de *Plod2* non foi modulado polos fucoidanos/*TGF-β*. (FIGURA 8)



**FIGURA 18. Representación do efecto dos fucoidanos na expresión xénica dos CME sinovial.** Os sinoviocitos estimuláronse durante 48 horas na presenza das diferentes doses de fucoidanos procedentes de *Fucus vesiculosus* (FF), *Undaria pinnatifida* (FU) e *Macrocystis pyrifera* (FM). A continuación valorouse a expresión xénica dos compoñentes do CEM por *qPCR*. Os resultados exprésanse coa media  $\pm$  SD dos 3 experimentos (#  $p < 0.05$  vs. TGF- $\beta$ , \* $p < 0.05$  vs. Basal)

#### 4.4.2 Niveis relativos de coláxeno intracelular

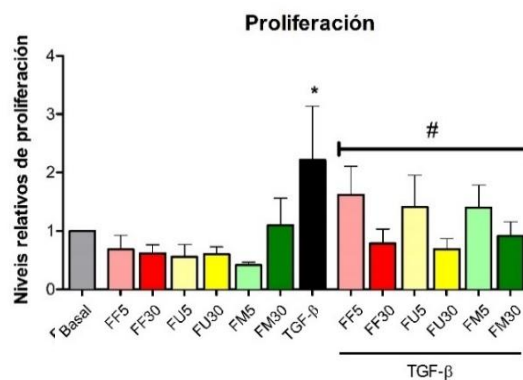
Para verificar os resultados obtidos para a expresión xénica de coláxeno, cuantificouse o coláxeno intracelular tinguindo as súas fibras con *PSR*. Os resultados móstranse na FIGURA 20. Como era esperable, os niveis inducidos por *TGF-β* foron significativamente maiores que na condición control (\* $p < 0.05$ ). *Fucus vesiculosus* 30  $\mu\text{g/mL}$  e *Macrocystis pyrifera* 5  $\mu\text{g/mL}$  reduciron significativamente a produción de fibras de coláxeno inducidas por *TGF-β* (#  $p < 0.05$ ).



**FIGURA 19. Efecto dos fucoidanos na presenza de coláxeno intracelular** Os sinoviocitos estimuláronse durante 72 horas na presenza das diferentes doses de fucoidanos procedentes de *Fucus vesiculosus* (FF), *Undaria pinnatifida* (FU) e *Macrocystis pyrifera* (FM). A continuación valorouse a presenza de fibras de coláxeno tinguidas co colorante *PSR*. Os resultados exprésanse coa media  $\pm$  SD dos 3 experimentos (#  $p < 0.05$  vs. *TGF-β*, \* $p < 0.05$  vs. Basal)

#### 4.4.3 Grao relativo de proliferación

Ademais de aumentar os CME, outra das características observadas na fibrose é o aumento do número de fibroblastos sinoviais, así como a súa migración e invasión a outros tecidos. Os resultados do ensaio de proliferación móstranse na FIGURA 20. As células estimuladas con *TGF-β* proliferaron de media máis de 2 veces respecto ó basal (\* $p < 0.05$ ). Ademais, os fucoidanos lograron frear a proliferación provocada por *TGF-β* (#  $p < 0.05$ ) sendo a dose 30  $\mu\text{g/ml}$  a que exhibiu valores máis baixos.

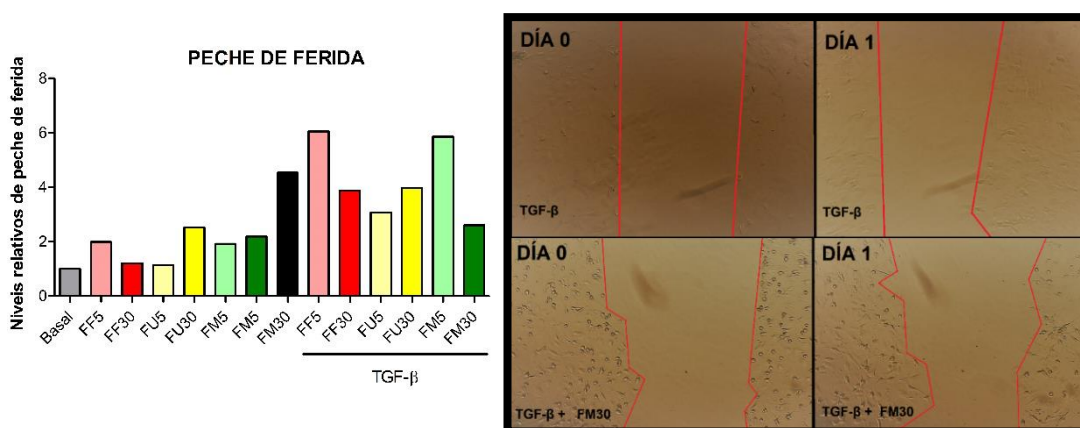


**FIGURA 20. Efecto dos fucoidanos na proliferación celular.** Os sinoviocitos estimuláronse durante 48 horas na presenza das diferentes con *TGF-β* e fucoidanos diferentes doses de fucoidanos procedentes de *Fucus vesiculosus* (FF), *Undaria pinnatifida* (FU) e *Macrocystis pyrifera* (FM). A continuación valorouse a hiperplasia sinovial mediante o kit *BrdU Cell proliferation assay (Cell signaling technology)*. Os resultados exprésanse coa media  $\pm$  SD dos 4 experimentos (#  $p < 0.05$  vs. *TGF-β*, \* $p < 0.05$  vs. Basal)



#### 4.4.1 Grao relativo de cicatrización

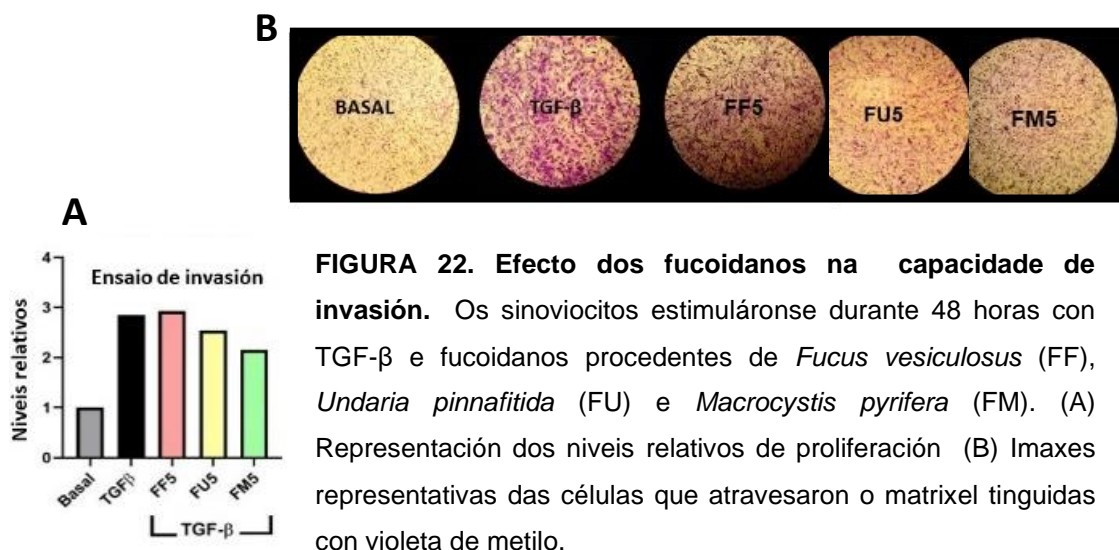
Outras das características dos sinoviocitos tipo fibroblasto é a capacidade de migrar. Os resultados mostran que se incrementou a migración das células pretratadas con  $TGF-\beta$  respecto o basal. O tratamento cos fucoidanos lograron frear a cicatrización provocada por  $TGF-\beta$ , agás *Fucus vesiculosus* e *Macrocystis pyrifera* 5  $\mu\text{g/ml}$  que a incrementou. Neste sentido, non se observou relación entre doses e entre fucoidanos.



**FIGURA 21. Efecto dos fucoidanos na capacidade de cicatrización.** Os sinoviocitos estimuláronse durante 48 horas con  $TGF-\beta$  e fucoidanos procedentes de *Fucus vesiculosus* (FF), *Undaria pinnatifida* (FU) e *Macrocystis pyrifera* (FM). A continuación simulouse a ferida na placa e captáronse as imaxes a tempo 0 horas e ás 24 horas.

#### 4.4.4 Grao relativo de invasión

A capacidade dos sinoviocitos tipo fibroblasto de invadir valorouse cuantificando as células que atravesaron o matrixel. Os resultados móstranse na FIGURA 22.  $TGF-\beta$  aumentou o número de células inyectivas con respecto o número observado nos basais. Todos os fucoidanos conseguiron reducir a capacidade inyectiva agás *Fucus vesiculosus*.



## 5. DISCUSIÓN

A artrose ou osteoartritis é un síndrome localizado nas articulacións sinoviais fundamentado principalmente no catabolismo da cartilaxe. Actualmente os tratamentos céntranse en aliviar a dor, por iso xurde cada vez máis terapias alternativas baseadas en principios activos naturais derivados de animais, plantas, algas ou microorganismos. Os fucoidanos, polisacáridos presentes en algas pardas e algúns invertebrados, son un bo candidato para ser unha destas terapias alternativas contra a artrose polas súas propiedades antiinflamatorias, antioxidantes e antifibróticas atopadas noutras patoloxías<sup>40</sup>. Neste traballo, os fucoidanos testados, *Fucus vesiculosus*, *Undaria pinnafitida* e *Macrocystis pyrifera* mostraron tamén estas propiedades nas células articulares artrósicas bloqueando a sinalización e liberación de mediadores proinflamatorios, e reducindo o estrés oxidativo, mediante inhibir a liberación de NO e promover a expresión da encima antioxidante HO-1. Ademais, tamén observamos que os fucoidanos inhibiron a activación de vías profibróticas nos fibroblastos sinoviais, atenuando a proliferación e invasión celular ademais da síntese de CME. Tomados no seu conxunto, estes resultados suxiren o uso dos fucoidanos como unha potencial estratexia terapéutica e preventiva contra a artrose.

Estudios previos dentro do grupo verifican a viabilidade dos fucoidanos nas células articulares. Ningún fucoidano foi citotóxico, aínda así, a concentración de 100 µg/mL presentou valores máis altos de citotoxicidade respecto as doses de 5 e 30 µg/mL. En consecuencia, neste traballo prescindíuse da dose de 100 µg/mL e ensaiouse soamente coas doses 5 e 30 µg/mL.

Co obxectivo de determinar o efecto antiinflamatorio dos fucoidanos, no noso estudo observamos que os fucoidanos procedentes de *Fucus vesiculosus* e *Undaria pinnatifida* modularon por si mesmos a expresión xénica e proteica dos mediadores proinflamatorios IL-6, IL-8 e COX-2 nos condrocitos e sinoviocitos artrósicos. Pola contra, detectamos que *Macrocystis pyrifera* induciu unha resposta proinflamatoria, incrementado os niveis de IL-6 e COX-2. Acorde cos nosos resultados, o efecto proinflamatorio dos fucoidanos de esta especie foi tamén observado noutros tipos celulares, por exemplo estimula a expresión das citoquinas IL-6 e IL-8 en células dendríticas do bazo de ratos C57BL<sup>44</sup>, mentres que os polisacáridos procedentes de *Undaria pinnatifida* non estimularon esta expresión. Nos estudos sobre o efecto modulador dos fucoidanos sobre a activación de respostas proinflamatorias, detectamos que *Undaria pinnatifida* foi o mais eficiente, reducindo a expresión dos xenes *Il-6*, *Il-8* e *cox-2* nos sinoviocitos. Aínda que contrariamente, ningún dos fucoidanos modulou a liberación de IL-6 nestas células.

No caso dos condrocitos, *Undaria pinnatifida* tamén modulou a expresión do xen *Cox-2*, como outros estudos xa tiñan mostrado <sup>45</sup>, e reduciu a liberación de IL-6 o igual que os fucoidanos procedentes das outras especies testadas. Pola contra, os datos obtidos da expresión e liberación de IL-6 non se co-relacionan nas células estudadas na nosa investigación. A diferenza nos tempos de estimulación para as avaliacións da expresión xénica e liberación da proteína podería ser a causa destas discrepancias.

O efecto modulador dos fucoidanos sobre a liberación de IL-6 atopada nos condrocitos, pode ser explicada pola inhibición da translocación nuclear de

*NF- $\kappa$ B*, e pola tanto da súa actividade transcricional proinflamatoria. Previamente observouse a capacidade dos fucoidanos de *Fucus vesiculosus*, nunhas doses similares as empregadas no noso estudo, para inhibir a actividade de *NF- $\kappa$ B* inducida por lipopolisacáridos (LPS) en células da microglía <sup>46</sup>. Ademais, e coincidindo ca maior efectividade antiinflamatoria, en termos xerais, de *Undaria pinnatifida*, os fucoidanos procedentes de este especie mostraron unha mellor inhibición da translocación de *NF- $\kappa$ B*. Estes datos suxiren que o bloqueo de esta vía é un dos mecanismos de acción dos efectos beneficiosos de estes polisacáridos.

A capacidade antioxidante dos fucoidanos mediuse por dúas vías. En primeiro lugar, analizando os niveis de NO, e determinando que fucoidanos actuaban mellor inhibindo a súa síntese; e por outra banda, estudando a presenza da encima antioxidante HO-1. HO-1, encima implicada no catabolismo dos grupos Hemo, é regulada polo Factor de Transcrición Nuclear Eritroide 2 (*Nrf2*). HO-1 tamén regula as reaccións re-dox mediante a expresión citoprotectores e antioxidantes. Nas células sen estrés oxidativo, *Nrf2* permanece inactivo e bloqueado no citoplasma formando un complexo coa súa proteína inhibidora, Keap1, un regulador negativo de *Nrf2*. <sup>47-49</sup>. Na nosa investigación IL-1 $\beta$  inhibiu a expresión de HO-1 como xa foi anteriormente descrito <sup>50,51</sup>. Os fucoidanos administrados, agás *Fucus vesiculosus*, recuperaron a síntese de HO-1, sendo as doses de 5  $\mu$ g/ml as mais efectivas. Na comparación con estudos previos, observouse que en queratinocitos HaCaT, os fucoidanos aumentaron os niveis de expresión e de proteína de HO-1 <sup>48</sup>. Este aumento foi debido a unha regulación positiva de *Nrf2* que se acumulou no núcleo.

A outra posible ruta na que poden interactuar os fucoidanos é mediante a redución do gas NO. O NO prodúcese a través da conversión de L-arginina a L-citrulina polas isoformas da encima *NO sintasa* (NOS). A forma inducida é expresada principalmente en condicións de inflamación ou infección <sup>52</sup>. O líquido sinovial procedente das articulacións humanas sas contén valores moi baixos de NO. Mentres que, as procedentes de doentes con artrosis ou

artritis reumatoide posúen altas concentracións de NO. Este fenómeno poder ser debido en gran medida a indución nos sinoviocitos da súa síntese por mediadores como IL-1 $\beta$ , o cal nos observamos no noso estudo. En relación os fucoidanos, nós detectamos que, en xeral, estes polisacáridos inhibiron a liberación de NO inducida por IL-1 $\beta$ .

Tomados xuntos, os resultados sobre o efecto antioxidante dos fucoidanos evidencian que a regulación de NO e a expresión da encima HO-1, parecen estar ligados xa que, as doses e especies de fucoidanos máis efectivas coincidiron entre ambos ensaios, e en especial para *Undaria pinnatifida* 5  $\mu$ g/mL. Neste sentido, dun estudo previo na liña celular de macrófagos J774.1 / JA-4 tratados con interferón  $\gamma$ , detectouse que ambos compostos estaban estreitamente relacionados. HO-1 actuaba como inhibidor de NO cando este supera os límites críticos<sup>53</sup>. Polo tanto, unha posible hipótese ós nosos resultados podería ser que os fucoidanos actúan sobre o factor transcricional *Nrf2* promovendo a síntese de HO-1. O aumento de HO-1 reduce o exceso de NO liberado a causa do estrés oxidativo. Sen embargo, máis estudos serán necesarios para comprobar a dependencia dos fucoidanos no sistema *Nrf-2*/HO-1 para os seus efectos antioxidantes.

En canto o papel antifibrótico dos fucoidanos nos sinoviocitos, estudamos as súas accións fronte as rutas clásicas activadas por *TGF- $\beta$* . Neste sentido, unha das principais vías de iniciación das resposta fibróticas parte dunha cascada complexa de sinalización que comeza na unión de *TGF- $\beta$*  no receptor de membrana *TGF- $\beta$*  tipo II activando as rutas dependentes e independentes de *smad*. *TGF- $\beta$*  modula a resposta prolifera, a cicatrización de feridas, ademais de ser un potencial desencadeante da quimiotaxis e deposición de CME <sup>54,55</sup>. Estudos recentes demostran as propiedades antifibróticas dos fucoidanos, inhibindo a unión de *TGF- $\beta$*  ó seu receptor celular (*TGF- $\beta$*  tipo II) bloqueando así a sinalización mediada por *Smad2*. Acorde con estes achados, os resultados do noso traballo tamén demostraron as propiedades antifibróticas dos fucoidanos. Os sinoviocitos diminuíron a proliferación celular, cun efecto dose dependente, sendo a maiores concentracións do fucoidano, as que mostraron mellores

respostas. Ademais, o niveis de coláxeno, principais compoñentes da CME, diminuíron significativamente con *Undaria pinnatifida*, sen embargo fallaron para modular a expresión do xen que codifica para a hidroxilasa que facilita o formación dunha rede de coláxeno máis densa. Finalmente, *Macrocystis pyrifera* e *Undaria pinnatifida* tamén reduciron a invasión e migración celular. Sumados a estes achados, nun estudo levados acabo no noso grupo visualizouse que o marcador de fenotipo fibrótico  $\alpha$ -SMA reduciuse significativamente en presenza dos fucoidanos, e principalmente con *Undaria pinnatifida*. No seu conxunto, os resultados demostran que *Undaria pinnatifida* 5  $\mu$ g/ml semella ser o tratamento máis efectivo contra a fibrose. En relación, nun estudo centrado en células renais humanas inmortalizadas HK2, o fucoidano de peso molecular 50 KDa (igual que o de *Undaria pinnatifida*) inhibiu a unión de  $TGF-\beta$  ó seu receptor e polo tanto a súa cascada de sinalización profibrótica. Na mesma liña, nun estudo en células humanas do endotelio vascular (*HU-VE-Cs*) e do músculo (*VSMC*) os fucoidanos de peso molecular medio (50 KDa) reduciron a hiperplasia e migración destas células dentro capa íntima dos vasos sanguíneos, mediante as metaloproteasas II.<sup>57</sup>

En resumo, os resultados mostran a capacidade dos fucoidanos para modular procesos catabólicos comunmente observados nas células articulares artrósicas. Destaca *Undaria pinnatifida* como antiinflamatorio, anti-oxidante e antifibrótico. Aínda así, tanto *Fucus vesiculosus* como *Macrocystis pyrifera* modulan tamén certas rutas metabólicas nos dous tipos celulares estudados: *Fucus vesiculosus* reduce significativamente en sinoviocitos a liberación de NO e *Macrocystis pyrifera* 30  $\mu$ g/ml reduce a expresión dos mediadores proinflamatorios. Finalmente, observouse que a dose 5 $\mu$ g/ml é a mais efectiva para exercer actividades antioxidante en todos os fucoidanos, mentres que a dose 30  $\mu$ g/ml mostra unha maior capacidade antifibrótica.

## 6. CONCLUSIONES

- En condrocitos, *Undaria pinntifida* é o fucoïdano que presenta un maior efecto antiinflamatorio na expresión dos mediadores proinflamatorios IL-8 e COX-2, na liberación de IL-6 e na inhibición de *NF- $\kappa$ B* inducida por IL-1 $\beta$ .
- En sinoviocitos, *Macrocystis pyrifera* 30  $\mu$ g/ml é o fucoïdano que presenta un maior efecto antiinflamatorio na expresión dos mediadores proinflamatorios agás na liberación de IL-6. A liberación non é modulada por ningún dos fucoïdanos.
- *Undaria pinntifida* 5  $\mu$ g/mL é o fucoïdano que presenta un maior efecto antioxidante en sinoviocitos reducindo a liberación de NO e recuperando a produción de HO-1 tralo tratamento con IL-1 $\beta$  . En xeral, a dose 5  $\mu$ g/ml ten unha resposta antioxidante maior.
- O fucoïdano de *Undaria pinntifida* 30  $\mu$ g/mL ofrece un mellor potencial antifibrótico nos sinoviocitos inhibindo máis a expresión de coláxeno inducida por *TGF  $\beta$* . A dose 30  $\mu$ g/m, en todos os fucoïdanos testados modula mellor a resposta fibrótica en sinoviocitos, reducindo a proliferación, a migración e a invasión celular.

## **7. BIBLIOGRAFÍA**

1. Reumatología SE de. Artrosis, Fisiopatología, diagnóstico y tratamiento [Internet]. Editorial Medica Panamericana; 2010.
2. Flandry F. Normal Anatomy and Biomechanics of the Knee. 2011;19(2):11.
3. Anthony Mescher. JUNQUEIRA'S Basic Histology. Text and Atlas. 14.<sup>a</sup> ed. McGraw Hill Education; 2016.
4. Richard L. Drake, Adam M.W. Mitchell and A. Wayne Vogl. GRAY. ANATOMÍA PARA ESTUDIANTES. 3<sup>a</sup>. Elsevier; 2015.
5. Correa D, Lietman SA. Articular cartilage repair: Current needs, methods and research directions. Semin Cell Dev Biol. febrero de 2017;62:67-77.
6. Camarero-Espinosa S, Rothen-Rutishauser B, Foster EJ, Weder C. Articular cartilage: from formation to tissue engineering. Biomater Sci. 2016;4(5):734-67.
7. Iturriaga V, Mena P, Oliveros R, Cerda C, Torres D, del-Sol M. Importancia del Líquido Sinovial en la Articulación Temporomandibular y sus Implicancias en la Patología Articular. Int J Morphol. marzo de 2018;36(1):297-302.
8. Kleine SA, Budsberg SC. Synovial membrane receptors as therapeutic targets: A review of receptor localization, structure, and function: SYNOVIAL MEMBRANE RECEPTORS AS THERAPEUTIC TARGETS. J Orthop Res. agosto de 2017;35(8):1589-605.
9. Mathiessen A, Conaghan PG. Synovitis in osteoarthritis: current understanding with therapeutic implications. Arthritis Res Ther [Internet]. diciembre de 2017 [citado 7 de mayo de 2019];19(1).
10. Ea H-K, Bazille C, Lioté F. Histología y fisiología de la membrana sinovial. EMC - Apar Locomot. enero de 2008;41(4):1-6.
11. Dragoslav R, Mitrovic MQ. Osteoartrosis. Biología, fisiología clínica y tratamiento. España: Editorial Médica Panamericana; 2010. 413 p.
12. Runhaar J, Zhang Y. Can we prevent OA? Epidemiology and public health insights and implications. Rheumatology. 1 de mayo de 2018;57(suppl\_4):iv3-9.
13. Deveza LA, Loeser RF. Is osteoarthritis one disease or a collection of many? Rheumatology. 1 de mayo de 2018;57(suppl\_4):iv34-42.



14. Tratamiento de la Artrosis [Internet]. PortalCLÍNICO. [citado 22 de junio de 2019]. Disponible en: <https://portal.hospitalclinic.org/enfermedades/artrosis/tratamiento>
15. Blanco FJ. La artrosis y la aterosclerosis de la articulación. *Reumatol Clínica*. septiembre de 2018;14(5):251-3.
16. Kong L, Zheng L-Z, Qin L, Ho KKW. Role of mesenchymal stem cells in osteoarthritis treatment. *J Orthop Transl*. abril de 2017;9:89-103.
17. Shen J, Abu-Amer Y, O'Keefe RJ, McAlinden A. Inflammation and epigenetic regulation in osteoarthritis. *Connect Tissue Res*. 2 de enero de 2017;58(1):49-63.
18. Whitney KE, Liebowitz A, Bolia IK, Chahla J, Ravuri S, Evans TA, et al. Current perspectives on biological approaches for osteoarthritis: Biological approaches for osteoarthritis. *Ann N Y Acad Sci*. diciembre de 2017;1410(1):26-43.
19. Vela-Anero Á, Hermida-Gómez T, Gato-Calvo L, Vaamonde-García C, Díaz-Prado S, Meijide-Faílde R, et al. Long-term effects of hydrogen sulfide on the anabolic-catabolic balance of articular cartilage in vitro. *Nitric Oxide*. noviembre de 2017;70:42-50.
20. Fitzpatrick F. Cyclooxygenase Enzymes: Regulation and Function. *Curr Pharm Des*. 1 de febrero de 2004;10(6):577-88.
21. Simon LS. Role and regulation of cyclooxygenase-2 during inflammation. *Am J Med*. mayo de 1999;106(5):37S-42S.
22. Valcárcel-Ares MN, Riveiro-Naveira RR, Vaamonde-García C, Loureiro J, Hermida-Carballo L, Blanco FJ, et al. Mitochondrial dysfunction promotes and aggravates the inflammatory response in normal human synoviocytes. *Rheumatol Oxf Engl*. julio de 2014;53(7):1332-43.
23. Smallwood MJ, Nissim A, Knight AR, Whiteman M, Haigh R, Winyard PG. Oxidative stress in autoimmune rheumatic diseases. *Free Radic Biol Med*. septiembre de 2018;125:3-14.
24. Matsuo Y, Saito T, Yamamoto A, Kohsaka H. Origins of fibroblasts in rheumatoid synovial tissues: Implications from organ fibrotic models. *Mod Rheumatol*. 4 de julio de 2018;28(4):579-82.
25. Bustamante MF, Garcia-Carbonell R, Whisenant KD, Guma M. Fibroblast-like synoviocyte metabolism in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* [Internet]. diciembre de 2017 [citado 5 de junio de 2019];19(1).

26. Zhu Z, Li J, Ruan G, Wang G, Huang C, Ding C. Investigational drugs for the treatment of osteoarthritis, an update on recent developments. *Expert Opin Investig Drugs*. 2 de noviembre de 2018;27(11):881-900.
27. Li B, Jiang T, Liu H, Miao Z, Fang D, Zheng L, et al. Andrographolide protects chondrocytes from oxidative stress injury by activation of the Keap1-Nrf2-Are signaling pathway: LI ET AL. *J Cell Physiol*. enero de 2019;234(1):561-71.
28. Yang Y, Ye Y, Qiu Q, Xiao Y, Huang M, Shi M, et al. Triptolide inhibits the migration and invasion of rheumatoid fibroblast-like synoviocytes by blocking the activation of the JNK MAPK pathway. *Int Immunopharmacol*. diciembre de 2016;41:8-16.
29. Li N, Gong Z, Li X, Ma Q, Wu M, Liu D, et al. Betulinic acid inhibits the migration and invasion of fibroblast-like synoviocytes from patients with rheumatoid arthritis. *Int Immunopharmacol*. febrero de 2019;67:186-93.
30. Pan D, Li N, Liu Y, Xu Q, Liu Q, You Y, et al. Kaempferol inhibits the migration and invasion of rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes by blocking activation of the MAPK pathway. *Int Immunopharmacol*. febrero de 2018;55:174-82.
31. Liang J, Chang B, Huang M, Huang W, Ma W, Liu Y, et al. Oxymatrine prevents synovial inflammation and migration via blocking NF- $\kappa$ B activation in rheumatoid fibroblast-like synoviocytes. *Int Immunopharmacol*. febrero de 2018;55:105-11.
32. Riveiro-Naveira RR, Valcárcel-Ares MN, Almonte-Becerril M, Vaamonde-García C, Loureiro J, Hermida-Carballo L, et al. Resveratrol lowers synovial hyperplasia, inflammatory markers and oxidative damage in an acute antigen-induced arthritis model. *Rheumatol Oxf Engl*. 2016;55(10):1889-900.
33. Ananthi S, Gayathri V, Malarvizhi R, Bhardwaj M, Vasanthi HR. Anti-arthritic potential of marine macroalgae *Turbinaria ornata* in Complete Freund's Adjuvant induced rats. *Exp Toxicol Pathol*. octubre de 2017;69(8):672-80.
34. Sudirman S, Ong A, Chang H-W, Kong Z-L. Effect of Fucoïdan on Anterior Cruciate Ligament Transection and Medial Meniscectomy Induced Osteoarthritis in High-Fat Diet-Induced Obese Rats. *Nutrients*. 28 de mayo de 2018;10(6):686.
35. Wang K, Xu J, Hunter DJ, Ding C. Investigational drugs for the treatment of osteoarthritis. *Expert Opin Investig Drugs*. 2 de diciembre de 2015;24(12):1539-56.

36. Fletcher HR, Biller P, Ross AB, Adams JMM. The seasonal variation of fucoïdan within three species of brown macroalgae. *Algal Res.* marzo de 2017;22:79-86.
37. Catarino M, Silva A, Cardoso S. Phycochemical Constituents and Biological Activities of *Fucus* spp. *Mar Drugs.* 27 de julio de 2018;16(8):249.
38. Klettner A. Fucoïdan as a Potential Therapeutic for Major Blinding Diseases—A Hypothesis. *Mar Drugs.* 3 de febrero de 2016;14(2):31.
39. Wang Y, Xing M, Cao Q, Ji A, Liang H, Song S. Biological Activities of Fucoïdan and the Factors Mediating Its Therapeutic Effects: A Review of Recent Studies. *Mar Drugs.* 20 de marzo de 2019;17(3):183.
40. Patel S. Therapeutic importance of sulfated polysaccharides from seaweeds: updating the recent findings. *3 Biotech.* septiembre de 2012;2(3):171-85.
41. Chomczynski P, Sacchi N. The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on. *Nat Protoc.* 2006;1(2):581-5.
42. Rittié L. Method for Picosirius Red-Polarization Detection of Collagen Fibers in Tissue Sections. En: Rittié L, editor. *Fibrosis* [Internet]. New York, NY: Springer New York; 2017 [citado 15 de junio de 2019]. p. 395-407. Disponible en: [http://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-7113-8\\_26](http://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-7113-8_26)
43. Reference GH. PLOD2 gene [Internet]. Genetics Home Reference. [citado 22 de junio de 2019]. Disponible en: <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/PLOD2>
44. Zhang W, Oda T, Yu Q, Jin J-O. Fucoïdan from *Macrocystis pyrifera* Has Powerful Immune-Modulatory Effects Compared to Three Other Fucoïdans. *Mar Drugs.* 19 de febrero de 2015;13(3):1084-104.
45. Phull A-R, Majid M, Haq I, Khan MR, Kim SJ. In vitro and in vivo evaluation of antiarthritic, antioxidant efficacy of fucoïdan from *Undaria pinnatifida* (Harvey) Suringar. *Int J Biol Macromol.* abril de 2017;97:468-80.
46. Park J, Cha J-D, Choi K-M, Lee K-Y, Han KM, Jang Y-S. Fucoïdan inhibits LPS-induced inflammation in vitro and during the acute response in vivo. *Int Immunopharmacol.* febrero de 2017;43:91-8.
47. Khan NM, Ahmad I, Haqqi TM. Nrf2/ARE pathway attenuates oxidative and apoptotic response in human osteoarthritis chondrocytes by activating ERK1/2/ELK1-P70S6K-P90RSK signaling axis. *Free Radic Biol Med.* febrero de 2018;116:159-71.

48. Ryu MJ, Chung HS. Fucoïdan reduces oxidative stress by regulating the gene expression of HO-1 and SOD-1 through the Nrf2/ERK signaling pathway in HaCaT cells. *Mol Med Rep.* octubre de 2016;14(4):3255-60.
49. Ferrándiz ML, Nacher-Juan J, Alcaraz MJ. Nrf2 as a therapeutic target for rheumatic diseases. *Biochem Pharmacol.* junio de 2018;152:338-46.
50. Sánchez C, Rodeiro I, Garrido G, Delgado R. Hemo-Oxigenasa 1: Un Promisorio Blanco Terapéutico. *Acta Farm Bonaer.* 2005;24:8.
51. Guillén M, Megías J, Gomar F, Alcaraz M. Haem oxygenase-1 regulates catabolic and anabolic processes in osteoarthritic chondrocytes. *J Pathol.* 17 de diciembre de 2007;214(4):515-22.
52. Trujillo MCB. Oxido nítrico: implicaciones fisiopatológicas. 2008. :8.
53. Koike A, Minamiguchi I, Fujimori K, Amano F. Nitric Oxide Is an Important Regulator of Heme Oxygenase-1 Expression in the Lipopolysaccharide and Interferon- $\gamma$ -Treated Murine Macrophage-Like Cell Line J774.1/JA-4. *Biol Pharm Bull.* 2015;38(1):7-16.
54. Remst DFG, Blaney Davidson EN, van der Kraan PM. Unravelling osteoarthritis-related synovial fibrosis: a step closer to solving joint stiffness. *Rheumatology.* noviembre de 2015;54(11):1954-63.
55. Chen S, Liu J, Yang M, Lai W, Ye L, Chen J, et al. Fn14, a Downstream Target of the TGF- $\beta$  Signaling Pathway, Regulates Fibroblast Activation. Kumar A, editor. *PLOS ONE.* 1 de diciembre de 2015;10(12):e0143802.
56. Kim TH, Lee EK, Lee MJ, Kim JH, Yang WS. Fucoïdan inhibits activation and receptor binding of transforming growth factor- $\beta$ 1. *Biochem Biophys Res Commun.* marzo de 2013;432(1):163-8.
57. Hlawaty H, Suffee N, Sutton A, Oudar O, Haddad O, Ollivier V, et al. Low molecular weight fucoïdan prevents intimal hyperplasia in rat injured thoracic aorta through the modulation of matrix metalloproteinase-2 expression. *Biochem Pharmacol.* enero de 2011;81(2):233-43.

## **AGRADECEMENTOS**

Ó meu titor, o Dr. Carlos Vaamonde García, pola súa inmensa paciencia e por todos os consellos que me deu para mellorar como futuro investigador. Agradezo tamén a todo o persoal do INIBIC, especialmente ó Grupo de Terapia Celular e Medicina Rexenerativa. Tamén ós docentes que impartiron as diferentes asignaturas do Mestrado. Por último, pero non menos importante, ós meus compañeiros Alba, Alex, Lidia, Marina e María Lourdes.

**ANEXO I: COPIA DO MODELO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO  
PARA O DOENTE (versión castelán)**



**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 10 ml 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.