

Traballo de Fin de Mestrado
Facultade de Ciencias da Saúde
Universidade da Coruña



UNIVERSIDADE DA CORUÑA
FACULTADE DE CIENCIAS DA SAÚDE

MÁSTER EN: ASISTENCIA E INVESTIGACIÓN SANITARIA
ESPECIALIDAD: FUNDAMENTOS DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA

Curso académico 2021 – 2022

TRABAJO DE FIN DE MÁSTER

Uso de Nutraceuticos como Tratamiento en la Artrosis

Dana Martínez Núñez

20 de julio de 2022

Las Dras. **M^a del Carmen de Andrés González** y **Beatriz Caramés Pérez**,
investigadoras del Instituto de Investigación Biomédica de A Coruña
(INIBIC),

CERTIFICAN QUE:

La memoria del Trabajo de Fin de Máster titulado “**Uso de Nutracéuticos como Tratamiento en la Artrosis**”, presentada por Dana Martínez Núñez bajo nuestra dirección en el INIBIC, fue revisada y está en disposición de ser presentada.

En A Coruña, a 20 de julio de 2022

INDICE

INDICE FIGURAS.....	I
INDICE TABLAS	II
ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS.....	III
RESUMEN	1
RESUMO	2
ABSTRACT	3
1. INTRODUCCIÓN	4
1.1. Artrosis (<i>Osteoarthritis</i> , OA).....	4
1.2. Tejido cartilaginoso articular	5
1.2.1. TC28A2.....	7
1.3. Dieta mediterránea.....	8
1.3.1. Ácidos grasos omega-3.....	9
2. OBJETIVOS.....	11
2.1. Objetivo principal.....	11
2.2. Objetivos secundarios	11
3. MATERIAL Y MÉTODOS	12
3.1. Cultivo celular y diseño experimental.....	12
3.2. Extracción de ADN y ARN.....	14
3.3. Retrotranscripción.....	16
3.4. q-PCR.....	17
3.5. Análisis de proteínas mediante la técnica de <i>Western Blot</i> ...20	
3.6. Inmunocitoquímica	24
3.7. Análisis estadístico de los resultados.....	26
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	27
4.1. Efecto del tratamiento con DHA en la viabilidad y morfología de la línea celular TC28A2.....	27
4.2. Análisis de la expresión génica mediante q-PCR para analizar el efecto protector del tratamiento con DHA	28
4.3. Análisis de proteínas mediante <i>Western Blot</i> para del efecto del tratamiento con DHA en la línea TC28A2	29

4.4. Detección mediante inmunocitoquímica de COX-2 en la línea celular TC28A2 tras el tratamiento con DHA.....	32
5. LIMITACIONES DEL ESTUDIO	35
6. CONCLUSIONES	35
7. BIBLIOGRAFÍA	36
ANEXO I	40

INDICE FIGURAS

Figura 1: Destrucción del cartílago articular humano en el proceso artrósico	4
Figura 2: Zonas del cartílago articular y disposición de las células en el mismo	6
Figura 3: Dieta mediterránea	8
Figura 4: Ruta de bioconversión de los ácidos omega-6 y omega-3.	10
Figura 5: Esquema de los estímulos y concentraciones empleadas para llevar a cabo las diferentes técnicas experimentales.	13
Figura 6: Programa seguido para la retrotranscripción	17
Figura 7: Funcionamiento de la PCR con sondas TaqMan.....	19
Figura 8: Reacción del método colorimétrico basado en el BCA.	21
Figura 9: Electroforesis unidimensional SDS-PAGE.....	22
Figura 10: Tinción con Ponceau S.	23
Figura 11: Reacción del DAB con el anticuerpo secundario	26
Figura 12: Células vistas al microscopio transcurridas 24 h tras la estimulación con DHA. Control negativo (a), IL-1 β +OSM (b), DHA 10 μ M (c), DHA 50 μ M (d), IL-1 β +OSM+DHA 10 μ M (e), IL-1 β +OSM+DHA 50 μ M (f). Aumento objetivo microscopio: 10x.	27

Figura 13: Cuantificación de la expresión génica de *IL1B* y *IL8* mediante q-PCR tras el tratamiento con DHA en condrocitos de la línea celular “TC28A2”. (a) *IL1B*, (b) *IL8* 28

Figura 14: Cuantificación de proteínas proinflamatorias y efecto del tratamiento con DHA en condrocitos de la línea celular “TC28A2”. (a) COX-2, (b) iNOS, (c) MMP-13, (d) IL-8..... 30

Figura 15: Inmunocitoquímica para COX-2 en células estimuladas y tratadas durante 24h. Control negativo (a), IL-1 β +OSM (b), DHA 10 μ M (c), DHA 50 μ M (d), IL-1 β +OSM+DHA 10 μ M (e), IL-1 β +OSM+DHA 50 μ M (f). Aumento microscopio: 20x..... 33

INDICE TABLAS

Tabla I: Cantidades (μ L) de los reactivos para realizar la retrotranscripción con el kit Taqman Reverse Transcription Reagents. 17

Tabla II: Reactivos y cantidades en μ L a añadir en la mezcla para la PCR.20

Tabla III: Dilución empleada para cada anticuerpo primario..... 24

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

36B4: Gen de la fosfoproteína ribosomal ácida P0

ACTB: Beta-actina

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ARN: Ácido ribonucleico

BCA: Ácido bicinconínico

BSA: Albúmina de suero bovino

COX – 2: Ciclooxygenasa-2

DAB: Diaminobencidina

DHA: Ácido docosahexaenoico

DMEM: *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*

DMSO: Dimetilsulfóxido

dNTP: Desoxirribonucleótido trifosfato

EPA: Ácido eicosapentaenoico

GAPDH: Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa

IL-1 β : Interleucina 1 β

IL-8: Interleucina 8

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

ITS: *Insulin-Transferin-Selenium*

MEC: Matriz extracelular

MMP-13: Metaloproteinasa-13

OA: Artrosis, *Osteoarthritis*

OSM: Oncostatina-M

PBS: Tampón fosfato salino

PIB: Producto interior bruto

q-PCR: Reacción cuantitativa en cadena de la polimerasa

SBF: Suero bovino fetal

SDS: Dodecilsulfato sódico

RESUMEN

La artrosis (*osteoarthritis*, OA) es una enfermedad crónica sin tratamiento efectivo, cuya prevalencia es cada vez mayor, siendo la principal causa de disfunción en personas de edad avanzada. Se ha demostrado en numerosos estudios que la dieta es un factor muy importante a la hora de reducir la inflamación producida durante la OA, más concretamente la dieta mediterránea, en la que el ácido docosahexaenoico (DHA) ha demostrado tener un papel beneficioso. Por ello, se decidió llevar a cabo un estudio con una línea celular de condrocitos inmortalizada, "TC28A2", en la cual se analizó la expresión de mediadores catabólicos inducida por interleucina-1 β (IL-1 β) y oncostatina-M (OSM), a nivel de proteína y ácido ribonucleico mensajero (ARNm) y, se estudió el efecto del DHA a diferentes concentraciones (10 μ M y 50 μ M). Para ello, se llevaron a cabo tres técnicas experimentales: reacción cuantitativa en cadena de la polimerasa (q-PCR) para la medida de expresión de diferentes genes, cuantificación de proteínas mediante *western blot* y, detección de la producción de la ciclooxigenasa-2 (COX-2) mediante inmunocitoquímica. Los resultados obtenidos no muestran un efecto protector significativo del DHA en la reducción de la reacción inflamatoria inducida en la línea celular condrocítica. Además, la concentración de DHA 50 μ M provocó un efecto negativo en la viabilidad y comportamiento de las células.

Palabras clave: artrosis, DHA, dieta mediterránea, citocinas

RESUMO

A artrose (*osteoarthritis*, OA) é unha enfermidade crónica sen tratamento efectivo, cuxa prevalencia é cada vez maior, sendo a principal causa de disfunción en persoas de idade avanzada. Demostrouse en numerosos estudos que a dieta é un factor moi importante á hora de reducir a inflamación producida durante a OA, mais concretamente a dieta mediterránea, na que o ácido docosahexaenoico (DHA) demostrou ter un papel beneficioso. Por iso, decidiuse levar a cabo un estudio cunha liña celular de condrocitos inmortalizada, "TC28A2", na cal analizouse a expresión de mediadores catabólicos inducida por interleucina-1 β (IL-1 β) e oncostatina-M (OSM), a nivel de proteína e ácido ribonucleico mensaxeiro (ARNm) e, se estudou o efecto do DHA a diferentes concentracións (10 μ M y 50 μ M). Para iso, leváronse a cabo tres técnicas experimentais: reacción cuantitativa en cadena da polimerasa (q-PCR) para a medida de expresión de diferentes xenes, cuantificación de proteínas mediante *western blot* e, detección da produción da ciclooxigenasa-2 (COX-2) mediante inmunocitoquímica. Os resultados obtidos non mostraron un efecto protector significativo do DHA na redución da reacción inflamatoria inducida na liña celular condrocítica. Ademais, a concentración de DHA 50 μ M provocou un efecto negativo na viabilidade e comportamento das células.

Palabras clave: artrose, DHA, dieta mediterránea, citocinas

ABSTRACT

Osteoarthritis (OA) is a chronic disease without an effective treatment, whose prevalence is increasing, being the main cause of dysfunction in elderly people. Numerous studies have shown that diet is a very important factor to reduce the inflammation produced during OA, more specifically the mediterranean diet, in which docosahexaenoic acid (DHA) has been shown to play a beneficial role. Therefore, it was decided to carry out a study with an immortalized chondrocytic cell line, "TC28A2", where the expression of catabolic mediators induced by interleukin-1 β (IL-1 β) and oncostatin-M (OSM) was analysed, at protein and messenger ribonucleic acid (mRNA) levels and, the effect of DHA at different concentrations (10 μ M and 50 μ M) was studied. To do this, three experimental techniques were carried out: quantitative polymerase chain reaction (q-PCR) for the measurement of expression of different genes, quantification of proteins by western blot and, the detection of cyclooxygenase-2 (COX-2) production by immunocytochemistry. The results obtained did not show a significant protective effect of DHA in reducing the inflammatory reaction induced in the chondrocytic cell line. In addition, the concentration of DHA 50 μ M caused a negative effect on cell viability and behavior.

Key words: osteoarthritis, DHA, mediterranean diet, citokines

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Artrosis.

La artrosis, también conocida como osteoartritis (OA), es una enfermedad crónica que, hoy en día, sigue siendo la causa más frecuente de deformidad, dolor y disfunción en personas de edades avanzadas (Cross *et al.*, 2014). Cuenta con una prevalencia cada vez mayor. Tan solo en España, se estima que la prevalencia de OA, la cual fue estudiada en cinco localizaciones (rodilla, cadera, zona lumbar, columna cervical y manos), es de un 29,35%, siendo la OA de columna lumbar la más prevalente con un 15,52%, seguida por la OA de rodilla con un 13,83% (Blanco *et al.*, 2021). La OA aparece de manera tardía en la articulación y se caracteriza por el deterioro progresivo del tejido cartilaginoso, afectando a su vez a otras estructuras como son el hueso subcondral, el tejido sinovial o incluso a la aparición de osteofitos, también conocido como espolón óseo (Cooper *et al.*, 2000), tal y como se muestra en la **Figura 1**.

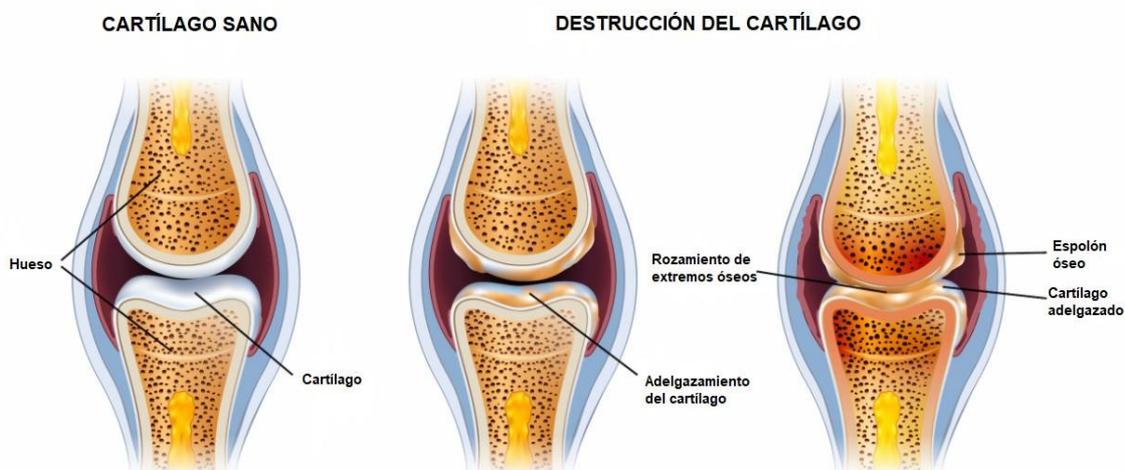


Figura 1: Destrucción del cartílago articular humano en el proceso artrósico. Imagen extraída y modificada de [New Ways to Grow Cartilage | Osteoarthritis Research \(curearthritis.org\)](https://www.curearthritis.org/)

Las causas exactas de esta enfermedad todavía son sujeto de estudio por su desconocimiento. Existen una serie de factores que pueden iniciar el progreso de la enfermedad entre las que se incluyen las lesiones, la

obesidad, la carga articular debido a la actividad física, la dieta e incluso factores hereditarios (Cooper *et al.*, 2000).

Hoy en día no existe cura para la OA, ni tratamientos efectivos que frenen el deterioro. Los tratamientos actuales solamente pueden eliminar o disminuir el dolor asociado. Las soluciones para dicha enfermedad serían los reemplazos articulares que son muy dolorosos, de alto coste y no son definitivos.

Además, cabe destacar que esta enfermedad conlleva un alto impacto socio-económico. En España, se calcula que el coste asociado a la OA de cadera y de rodilla representa el 0,5 % del producto interior bruto (PIB), siendo la mayor parte de los costes directos los debidos a las cirugías de reemplazo articular (Mayoral Rojals, 2021).

1.2. Tejido cartilaginoso articular.

El cartílago articular es un tipo de tejido conectivo encargado de proporcionar una superficie lisa y lubricada a la articulación, así como de facilitar la transmisión de cargas aportando un bajo coeficiente de fricción. El cartílago articular se compone de una matriz extracelular (MEC) extensa que contiene células dispersas, altamente especializadas, llamadas condrocitos y está desprovisto de vasos sanguíneos y nervios, por lo que su capacidad de reparación intrínseca se ve limitada (Sophia Fox *et al.*, 2009). La MEC está compuesta principalmente por colágeno tipo II (80 %) y, proteoglicanos y agreganos (20 %), ocupando un 95-98 % del total del cartílago. El 3-5 % restante es la proporción ocupada por los condrocitos (Eduardo Wainstein, 2014).

El cartílago articular está organizado en diferentes zonas (López *et al.*, 2019) (**Figura 2**):

- Superficial o tangencial: contiene células en forma de disco. Es la región del tejido más expuesta a las fuerzas de tensión, compresión y cizallamiento. Las fibras de colágeno son más finas y se encuentran

paralelas entre sí y a la superficie articular. Abundan las glucoproteínas pequeñas que están asociadas a las fibras de colágeno.

- Zona media o transicional: contiene células esféricas, rodeadas de MEC.

- Zona profunda o basal: contiene la concentración más baja de células, que se encuentran formando columnas. Por el contrario, esta zona tiene la concentración más alta de glucoproteínas. La densidad celular disminuye desde la zona superficial a la profunda, representando esta región un tercio de las células de la capa superficial.

- Zona calcificada: se encuentra adyacente a la zona profunda y está definida por un borde llamado “*tide mark*” que puede ser observado en secciones histológicas mediante tinciones de hematoxilina y eosina. Esta zona se forma como resultado de la osificación endocondral y, aunque el cartílago calcificado es reabsorbido y reemplazado por hueso maduro, esta región persiste y actúa como un factor mecánico importante situándose entre la zona no calcificada del cartílago articular y el hueso subcondral.

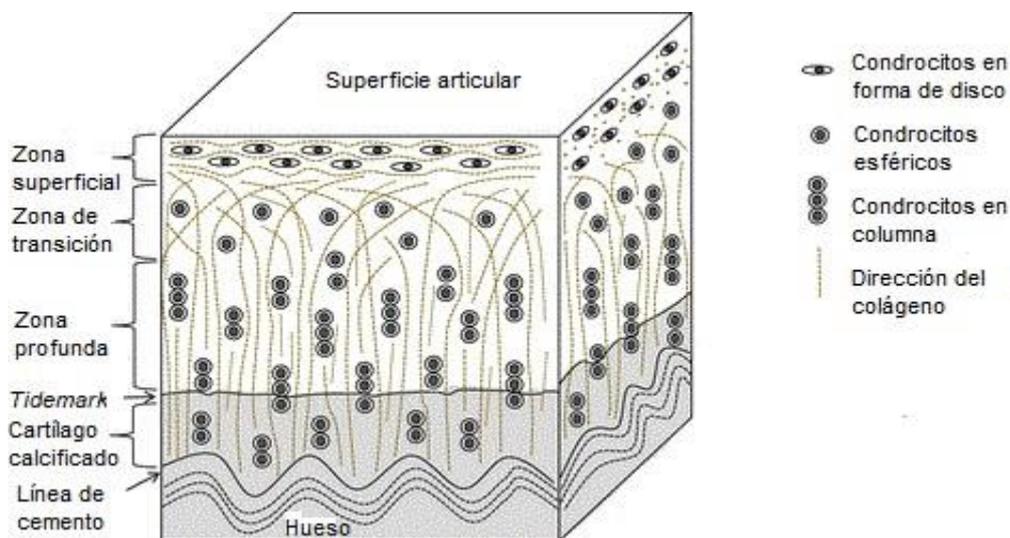


Figura 2: Zonas del cartílago articular y disposición de las células en el mismo. Imagen extraída y modificada de rsif20180611f01.gif (500x266) (royalsocietypublishing.org).

La resistencia a la compresión del cartílago está dada principalmente por la red de colágeno y la elasticidad viene dada por los agregados de agreganos y proteoglicanos, los cuales están fuertemente unidos al agua.

De esta forma, durante la compresión, el agua sale del cartílago y la red de colágeno hace de malla de resistencia. Posteriormente, gana agua nuevamente manteniendo su elasticidad debido a la propiedad hidrofílica de la malla de agreganos y proteoglicanos (Wainstein, 2014).

En el cartílago de pacientes artrósicos se detectaron altos niveles de enzimas proteinasas, las metaloproteinasas, en especial la metaloproteinasa-13 (MMP13), que degradan la MEC. La presencia en el líquido sinovial de fragmentos de MEC, enzimas proteolíticas y citocinas, representan marcadores biológicos de la enfermedad (López *et al.*, 2019).

1.2.1. TC28A2.

Los estudios que utilizan cultivos primarios de condrocitos articulares humanos para examinar, tanto la fisiología celular normal como los mecanismos de destrucción articular degenerativa, son limitados (Finger *et al.*, 2003). Una vez los condrocitos son aislados de su entorno natural, éstos apenas muestran actividad proliferativa y, si lo hacen, es indicativo de la pérdida de un fenotipo diferenciado, lo que implica no sólo un cambio en la morfología, sino también un cambio significativo en el patrón de expresión génica. Estas razones limitan la obtención de condrocitos articulares primarios en adultos. Para contrarrestar estos problemas, se han establecido líneas celulares inmortalizadas de condrocitos y poder llevar a cabo investigaciones de manera ampliamente ilimitada y estandarizada (Finger *et al.*, 2003).

La línea celular “TC28A2” es una de las primeras líneas celulares inmortalizadas. Ésta fue establecida mediante una transfección mediada con retrovirus de condrocitos primarios de costillas con el antígeno T del virus Simian 49. Estas células retienen la morfología condrocítica y, mantienen una proliferación continua en cultivos celulares (Goldring *et al.*, 1994).

1.3. Dieta mediterránea.

Como bien se mencionó previamente, la OA es una enfermedad multifactorial y se ha demostrado en numerosos estudios que la nutrición puede influir en el estado inflamatorio, mostrando así un papel beneficioso en esta patología (Thomas *et al.*, 2018). En los últimos años, la dieta mediterránea ha cobrado gran importancia como objeto de estudio entre la comunidad científica. Ello es debido a que numerosos estudios básico-clínicos y epidemiológicos han llevado a considerarla como un factor protector en el desarrollo de múltiples procesos como las enfermedades cardiovasculares, distintos tipos de cáncer, enfermedades neurodegenerativas e incluso el envejecimiento (Dinu *et al.*, 2017).

Aunque existen varios patrones de dieta mediterránea según la localización, todas tienen

algo en común: alta ingesta de grasas monoinsaturadas, presentes en el aceite de oliva; baja ingesta de grasas saturadas procedentes de productos lácteos o derivados y carnes rojas; consumo moderado de ácidos poliinsaturados procedentes del pescado y



Figura 3: Dieta mediterránea. Imagen extraída de [Dieta mediterránea, modelo de dieta de proximidad y sostenible | Diari de Tarragona](#)

frutos secos y, un alto consumo de fibra y antioxidantes provenientes de la verdura, la fruta o las legumbres (Urquiaga *et al.*, 2017). En la **Figura 3** se muestra un ejemplo de los alimentos característicos de esta dieta.

Diversos investigadores han demostrado que puede tener un efecto protector por sus propiedades antiinflamatorias, por su capacidad antioxidante y por su efecto sobre la obesidad y el síndrome metabólico (Knott *et al.*, 2011). La dieta mediterránea rica en polifenoles previene la inflamación, la destrucción del cartílago y produce una disminución de los ácidos grasos omega-6, los cuales inducen inflamación sinovial y deterioro

del cartílago articular, mientras que es rica en ácidos grasos omega-3, cuyos componentes derivados disminuyen la expresión génica de las proteinasas que se encuentran en el cartílago articular lesionado y de las citocinas inflamatorias (Knott *et al.*, 2011).

Por ello, este estudio se centra en el ácido docosahexaenoico DHA, un ácido graso poliinsaturado de la familia de los ácidos grasos omega-3 cuya principal fuente es el pescado azul.

Diferentes estudios demuestran que el uso de DHA como tratamiento celular puede reducir drásticamente la cantidad de proteínas proinflamatorias que son liberadas por las células cuando se produce un estado inflamatorio a su alrededor (Meiss *et al.*, 2020; Phitak *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2016).

1.3.1. Ácidos grasos omega-3.

Los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga son componentes de la dieta de participan en diversos procesos fisiológicos, cumpliendo un rol estructural en los fosfolípidos de las membranas celulares y siendo sustratos para la síntesis de diversos mediadores fisiológicos. Encontramos dos grupos principales: los ácidos grasos omega-3 y omega-6, los cuales son ácidos grasos esenciales para el ser humano y carecemos de un sistema enzimático necesario para biosintetizarlos (Burr & Burr, 1930).

La dieta de nuestros ancestros era inferior en grasas totales y grasas saturadas que la dieta actual. Se cree que la proporción de la cantidad ingerida de omega-6 y omega-3 era 1:1 o 1:2, respectivamente (Simopoulos, 1999). Con la llegada de la revolución industrial, hubo un aumento en la ingesta de omega-6 y una reducción en omega-3 debido al uso indiscriminado de aceites vegetales y una reducción del consumo de productos marinos, obteniéndose una proporción 12:1 en la dieta occidental. Esto ha llevado a incrementar el riesgo de sufrir enfermedades cardiovasculares y otros padecimientos de orden común (Simopoulos, 2000). El ácido araquidónico se forma en la vía de metabolización de los

omega-6 y es un precursor de mediadores proinflamatorios, mientras que el DHA que se forma en la vía de metabolización de los omega-3 se comporta como un potente agente antiinflamatorio y es determinante para la integridad de las membranas celulares (Pawlosky *et al.*, 2001).

En la **Figura 4** se muestra como es la ruta de bioconversión de los ácidos derivados del omega-6 y del omega-3. El DHA se obtendría a partir del ácido eicosapentaenoico (EPA). El ácido araquidónico es liberado desde los fosfolípidos por la activación de la enzima fosfolipasa A₂ durante las primeras etapas del proceso inflamatorio. Posteriormente, las enzimas lipooxigenasas y ciclooxigenasas metabolizan este ácido generando eicosanoides bioactivos, entre los que se encuentran las prostaglandinas, leucotrienos y tromboxanos (Calder *et al.*, 2002).



Figura 4: Ruta de bioconversión de los ácidos omega-6 y omega-3. Imagen extraída y modificada de (Calder *et al.*, 2002).

2. OBJETIVOS

Ante la falta de tratamientos efectivos en la OA y, como cada vez existen más evidencias de que una dieta rica en omega-3, concretamente el DHA, podría ayudar a prevenir la OA, se decidió llevar a cabo este estudio.

2.1. Objetivo principal.

Investigar el efecto terapéutico del nutraceutico DHA sobre los procesos catabólicos inducidos en condrocitos de la línea celular "TC28A2".

2.2. Objetivos secundarios.

- Evaluación del efecto del DHA sobre la expresión de genes catabólicos (*IL1B* y *IL8*) inducida por IL-1 β y OSM a nivel del ARNm en condrocitos de la línea celular "TC28A2".
- Evaluación del efecto del DHA sobre la expresión de proteínas proinflamatorias (COX-2, iNOS, MMP-13, IL-8) en condrocitos de la línea celular "TC28A2".

3. MATERIAL Y MÉTODOS

Para poder llevar a cabo los objetivos planteados se hizo uso de la línea celular inmortalizada "TC28A2". Estas células se prepararon, estimularon y trataron con diferentes concentraciones de DHA, tal y como se muestra a continuación, para la realización de tres técnicas experimentales: medida de la expresión génica mediante la reacción cuantitativa en cadena de la polimerasa (q-PCR) con sondas Taqman®, análisis de proteínas mediante la técnica *western blot* y detección de producción de la ciclooxigenasa-2 (COX-2) en las células a través de inmunocitoquímica. Cada una de las técnicas se llevó a cabo por triplicado.

3.1. Cultivo celular y diseño experimental.

➤ Descongelación y cultivo celular

Las células se almacenaron en crioviales a -80 °C con un medio crioprotector formado con suero bovino fetal (SBF) (Gibco™) y un 10 % de dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma-Aldrich).

Primero se añadió medio de cultivo *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) (Gibco™), previamente preparado con un 5 % de SBF, un 1 % de penicilina/estreptomicina (Lonza), un 1% de *Insulin-Transferrin-Selenium* (ITS) (Sigma-Aldrich) y un 0,2 % de ácido ascórbico (Sigma-Aldrich), al criovial. A continuación, se sembraron en frascos de cultivo Falcon® T-175 con más medio de cultivo. Los frascos de cultivo se mantuvieron durante todo el crecimiento celular en una estufa a 37 °C y con un 5 % de CO₂.

➤ Levantamiento celular y contaje

Una vez las células alcanzaron una confluencia de más del 80 %, se tripsinizaron y contaron para, posteriormente, poder sembrarlas en las placas correspondientes. En primer lugar, se retiró el medio de cultivo y se lavó el frasco con 8 mL de suero salino (Gibco™) por si quedasen restos del mismo. Una vez retirado el suero, se añadieron 2 mL de tripsina 2X (Gibco™) y se dejó 2 min en la estufa a 37 °C. Cuando se observó al

microscopio que todas las células habían cambiado su morfología (forma redonda) y estaban libres en vez de adheridas al frasco, se inactivó la tripsina con medio de cultivo y se centrifugó el contenido para conseguir un precipitado únicamente celular. Se decantó el sobrenadante y las células se resuspendieron en 10 mL de medio de cultivo para poder contarlas con una cámara de Neubauer.

Tras haber terminado el contaje celular se pudieron sembrar las células en las diferentes placas siguiendo el siguiente diseño experimental:

➤ Siembra de las células en placas y estimulación

Tanto para la extracción del ácido desoxirribonucleico (ADN) y el ácido ribonucleico (ARN), como para la extracción de proteínas, se usaron placas de 6 pocillos, de acuerdo a lo mostrado en la **Figura 5**. Para ambos experimentos se sembraron 400.000 células por pocillo. Para la inmunocitoquímica se sembraron 75.000 células por pocillo en un portaobjetos con cámara de cultivo celular para microscopio. Posteriormente, las células fueron estimuladas con una mezcla de interleucina 1 β (IL-1 β) (Merck) y Oncostatina M (OSM) (Merck), siendo éste el control positivo. El tratamiento empleado fue el DHA (Merck) en dos concentraciones diferentes, 10 μ M y 50 μ M. En la **Figura 5** se muestran las concentraciones que se añadieron en cada pocillo. La estimulación en los tres experimentos se realizó a 6h y a 24h. Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

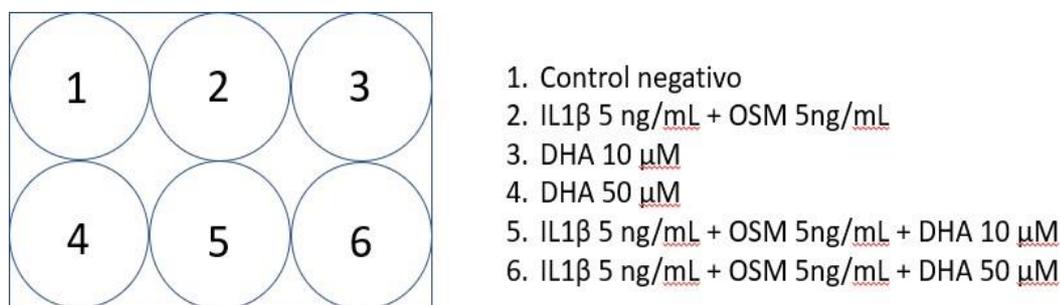


Figura 5: Esquema de los estímulos y concentraciones empleadas para llevar a cabo las diferentes técnicas experimentales.

➤ **Recogida de muestras**

- Placas para la extracción de ADN y ARN

Se retiró el sobrenadante y se lavaron los pocillos con suero salino. Se añadieron 350 μ L de *Buffer RLT Plus* del Kit *AllPrep DNA/RNA/miRNA Universal Kit* (Quiagen) por pocillo y, tras expandirlo bien por cada superficie, se barrió con la punta de una pipeta con filtro y se recogió cada muestra a un eppendorf. Se almacenaron a -20 °C.

- Placas para la extracción de proteínas

Se retiró el sobrenadante y se lavaron los pocillos con suero salino. Se añadieron 150 μ L de un tampón de lisis preparado previamente (urea 6 M (Sigma-Aldrich), 2% de dodecil sulfato sódico (Sigma-Aldrich) y agua destilada hasta 25 mL), por pocillo. Se recogió cada muestra a un eppendorf. Se lisaron las proteínas de cada muestra con una jeringuilla y agujas de insulina y se almacenaron a -20 °C.

- Portaobjetos con cámara de cultivo celular para microscopía

Se retiró el sobrenadante de cada pocillo y se lavó con tampón fosfato salino (PBS) (Sigma-Aldrich). Se añadieron 200 μ L de paraformaldehído (Sigma-Aldrich) al 4% por pocillo y se incubó 10 minutos a 37 °C. Se retiró el fijador y se lavó dos veces con PBS, dejándolo finalmente en este medio para almacenarlo a 4 °C.

3.2. Extracción de ADN y ARN.

El ADN y ARN total se extrajo con el Kit *AllPrep DNA/RNA/miRNA Universal Kit* de Quiagen, siguiendo las indicaciones del fabricante, con alguna modificación.

Procedimiento

Se descongelaron las muestras lisadas que permanecían almacenadas a – 20 °C, se vortearon y centrifugaron 15 s a 8.000 g. Se trasvasaron a las columnas de extracción de ADN genómico. Se centrifugaron 30 s a 8.000 g. Las columnas, en las que se quedó retenido el ADN, se pasó a un nuevo tubo colector.

➤ Extracción ARN

El eluyente se pasó a un nuevo tubo para llevar a cabo la extracción de ARN. Se añadieron 50 µL de Proteinasa K y 200 µL de etanol 100%. Se mezcló vigorosamente. Se incubó 10 minutos a temperatura ambiente y, a continuación, se añadieron 400 µL de etanol 100%, mezclando vigorosamente de nuevo. Se transfirió todo el eluyente a los tubos *RNeasy mini spin*, se centrifugó 15 segundos a 8.000 g y se descartó el eluyente. Se añadieron 500 µL de *Buffer RPE*, se centrifugó 15 segundos a 8.000 g y se descartó el eluyente. Se añadieron a cada muestra 10 µL de *DNasa* y 70 µL de *Buffer RDD* y se dejó 15 minutos a temperatura ambiente. Se añadieron 500 µL de *Buffer FRN*, se centrifugó 15 segundos a 8.000 g y se transfirió la columna a tubos nuevos. El eluyente retirado en la última centrifugación se volvió a pasar por la columna y se centrifugó 15 segundos a 8.000 g. Se descartó el eluyente. Se añadieron 500 µL de *Buffer RPE*, se centrifugó 15 segundos a 8.000 g y se descartó el eluyente. Se añadieron 500 µL de etanol y se centrifugó 2 minutos a 8.000 g dos veces. La columna se colocó en un nuevo tubo de 1,5 mL y se descartaron el eluyente y el tubo anterior. Se añadieron 50 µL de agua pura libre de *RNasa* a la columna. Se incubó 1 minuto a temperatura ambiente y se centrifugó 1 minuto a 8.000 g. Se recogió el eluyente donde se encontraba el ARN extraído, se volvió a pasar por la columna y se repitió la centrifugación. Se almacenó rápidamente en hielo para su posterior cuantificación.

➤ Extracción ADN

A las columnas previamente almacenadas en la nevera a 4°C, se le añadieron 350 µL de *Buffer AW1*, se centrifugaron 15 segundos a 8.000 g

y se descartó el eluyente. Se añadieron a cada columna 20 µL de *Proteinasa K* y 60 µL de *Buffer AW1* y se dejó incubar 5 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se añadieron 350 µL de *Buffer AW1*, se centrifugó 15 segundos a 8.000 g y se descartó el eluyente. Se añadieron 250 µL de *Buffer AW2* y 250 µL de etanol 100%, se centrifugó 2 minutos a máxima velocidad y se descartó el eluyente. Se volvió a centrifugar y a descartar el eluyente para eliminar los restos de etanol que hubieran podido quedar en la columna. Se pasó la columna a tubos nuevos de 1,5 mL y se añadieron 50 µL de *Buffer EB*. Se dejó incubar 1 minuto a temperatura ambiente y se centrifugó 1 minuto a 8.000 g. El eluyente se pipeteó de nuevo sobre la columna y se volvió a centrifugar.

Cuantificación

Tras realizar la extracción, se cuantificaron las muestras con el espectrofotómetro *ND-1000* (Nanodrop) a 260 nm. Para ello se añadieron 1,5 µL de cada muestra en el equipo, realizando previamente un blanco de procedimiento con el eluyente que correspondía (*Buffer EB* para las muestras de ADN y agua pura libre de *RNasa* para las muestras de ARN). Además de cuantificar la cantidad de ADN y ARN presentes en las muestras, el espectrofotómetro también nos proporciona la integridad de los mismos con los valores de los ratios, 260/280 y 260/230, en los que se muestra si existe contaminación con proteína y fenoles, respectivamente. Una vez realizada la cuantificación, el ADN se almacenó a -20 °C y el ARN a -80 °C.

3.3. Retrotranscripción.

El fundamento de la retrotranscripción se basa en generar ADN de doble cadena denominado ADN complementario a partir de ARN de cadena simple. El kit usado para llevar a cabo la retrotranscripción fue *Taqman Reverse Transcription Reagents* (Applied Biosystems).

Procedimiento

Para realizar la retrotranscripción se agregaron 500 ng de ARN. Para ello, previamente, cuando se realizó la extracción de ARN y se cuantificó con el Nanodrop, pudimos conocer la concentración de ARN en la muestra y de esta manera saber cuántos μL pipetear para obtener 500 ng. El volumen total de mezcla es de 20 μL , siendo 7,7 μL los formados por los 500 ng de ARN y el resto de agua pura libre de ribonucleasa (Invitrogen). La cantidad de cada reactivo que conformó la mezcla, y que posteriormente se añadió a cada muestra, se refleja en la **Tabla I**.

Tabla I: Cantidades (μL) de los reactivos para realizar la retrotranscripción con el kit Taqman Reverse Transcription Reagents.

Reactivo	10x Taqman RT Buffer	Magnesium chloride 25mM	Deoxys NTPs mixture	Random Hexamer	Rnase Inhibitor	Multiscribe Reverse Transcriptase
Cantidad (μL)/ muestra	2	4,4	4	1	0,4	0,5

Se centrifugó 10 segundos y se introdujeron los tubos en el termociclador *Veriti 96 Well Thermal Cycler* (Applied Biosystems). Los ciclos llevados a cabo por el programa escogido se muestran en la **Figura 6**.

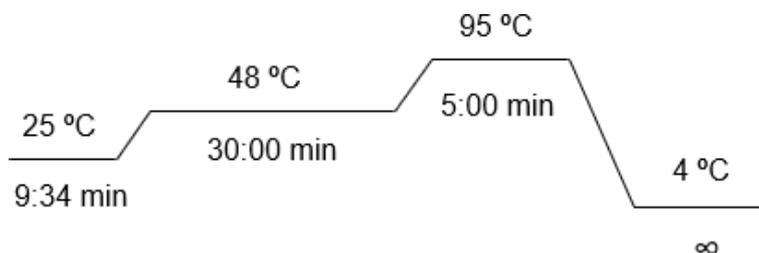


Figura 6: Programa seguido para la retrotranscripción.

3.4. q-PCR.

Se quiso analizar la expresión de determinados genes según los estímulos y tratamientos empleados tras el sembrado celular. Se midió la expresión

de dos interleucinas proinflamatorias, *IL1B* y *IL8*. Como gen de referencia (*housekeeping*) se analizaron tres genes [gen de la fosfoproteína ribosomal ácida P0 (*36B4*), beta-actina (*ACTB*) y gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (*GAPDH*)], escogiéndose finalmente el *GAPDH* por ser el más estable frente a las muestras tras realizar un análisis con el software *qBase*.

Para realizar la q-PCR se utilizó la tecnología de sondas Taqman. Esta nueva variante de PCR logra óptimos resultados en cuanto a una mejor estandarización, cuantificación, automatización y miniaturización del método con una reducción de tiempo y coste en el diagnóstico (Arruga Laviña *et al.*, 2006).

Al igual que en una PCR convencional, hacen falta cebadores o *primers* (*Forward* y *Reverse*), un tampón de trabajo con los cofactores necesarios y desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTPs) en exceso, una *Taq* ADN polimerasa y, generalmente, una sonda específica que es la que aporta el componente fluorescente. Las sondas Taqman específicas son pequeños oligonucleótidos complementarios a la secuencia comprendida entre los dos *primers* (amplicón), y que llevan unidos dos moléculas químicas. Cada una, en uno de sus dos extremos. En el extremo 5' se sitúa un fluoróforo, R, y, en el extremo 3' de la misma sonda, un inhibidor de la fluorescencia, Q. Cuando la hebra está intacta el inhibidor apaga la fluorescencia del fluoróforo pero, cuando la sonda está rota por acción de la exonucleasa de la polimerasa, se separan y el fluoróforo emite fluorescencia (Donoso, 2019). Así, los pasos principales de la PCR con sondas TaqMan (representados en la **Figura 7**) serían:

- 1) Desnaturalización del ADN complementario.
- 2) Anillamiento de los cebadores y la sonda intacta que no emite fluorescencia
- 3) Etapa de elongación, en la cual la *Taq* polimerasa se une al extremo 3' del cebador unido a la hebra de ADN complementario y elonga una nueva hebra complementaria, hasta que se encuentra con la sonda TaqMan también unida al ADN complementario molde. Como

la Taq polimerasa también tiene la función de 5' exonucleasa, degrada la sonda y libera el fluoróforo produciendo la fluorescencia.

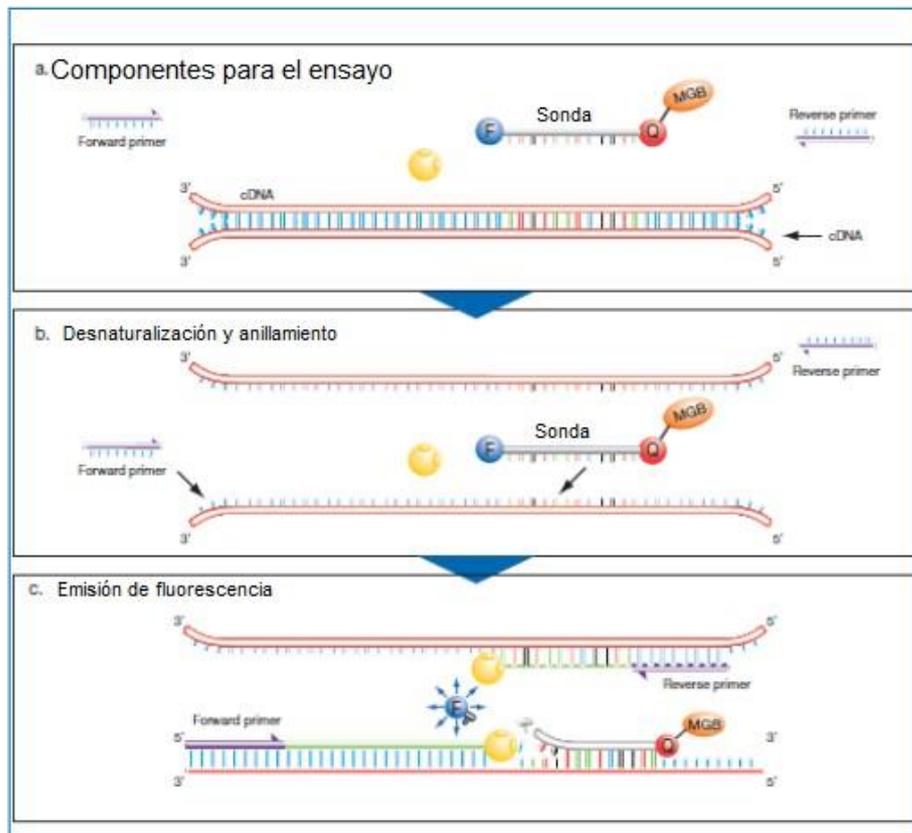


Figura 7: Funcionamiento de la PCR con sondas TaqMan. Imagen extraída y modificada de (Donoso, 2019).

Procedimiento

Tras realizar la retrotranscripción y haber obtenido el ADN complementario, se realizó una dilución 1:10 de cada muestra. Así, si inicialmente teníamos 500 ng en 20 μ L de disolución, obtuvimos 50 ng.

En primer lugar, se prepararon dos mezclas con los reactivos para llevar a cabo la PCR con sondas TaqMan siguiendo las cantidades mostradas en la **Tabla II**, una mezcla por cada gen de interés. En este caso sería una mezcla para el gen *IL1B* y otra para el gen *IL8*.

Tabla II: Reactivos y cantidades en μL a añadir en la mezcla para la PCR.

Reactivos	Agua pura	Solución F+R	Probe GAPDH	Gen de interés TaqMan	Mix TaqMan
Cantidad (μL)/muestra	3,28	0,2	0,02	0,5	5

Se vorteo bien la mezcla y se añadieron 19,8 μL a cada tubo de 0,2 mL (Bio-Rad), uno por muestra y por gen. A cada tubo se añadieron también 2,2 μL de muestra. A continuación, se añadieron 10 μL de cada tubo, por duplicado, en una placa de 96 pocillos *Hard-Shell 480 PCR Plates 96-Well, CLR/WHT, BC* (Bio-Rad). Finalmente, se centrifugó la placa.

Cuantificación

Para llevar a cabo la q-PCR se usó el equipo *LightCycler 480 II* (Roche).

3.5. Análisis de proteínas mediante la técnica de *Western Blot*.

Tras la extracción de la proteína en la parte de cultivos celulares, se cuantificó y se realizó una electroforesis, tras la que se incubaron cuatro anticuerpos diferentes: óxido nítrico sintasa (iNOS) (Abcam), COX-2 (Abcam), MMP-13 (Abcam) y IL-8 (Abcam), además del control de carga, el GAPDH (Abcam), para poder cuantificarlos.

Procedimiento

- Curva de la albúmina de suero bovino (BSA)

Para cuantificar la proteína extraída se hizo uso del método colorimétrico basado en ácido bicinconínico (BCA) (Thermo Fisher Scientific).

Su fundamento consiste en que, en condiciones alcalinas, los enlaces peptídicos de las proteínas reducen los iones Cu^{+2} a Cu^{+1} reaccionando dos moléculas de BCA con un ión cuproso (Cu^{+1}), lo que provoca un cambio de color de la solución a púrpura que absorbe a 562 nm, tal y como se muestra

en la **Figura 8**. La absorbancia es directamente proporcional a la cantidad de proteína y se estima comparándola con una curva patrón de una proteína conocida, la BSA.

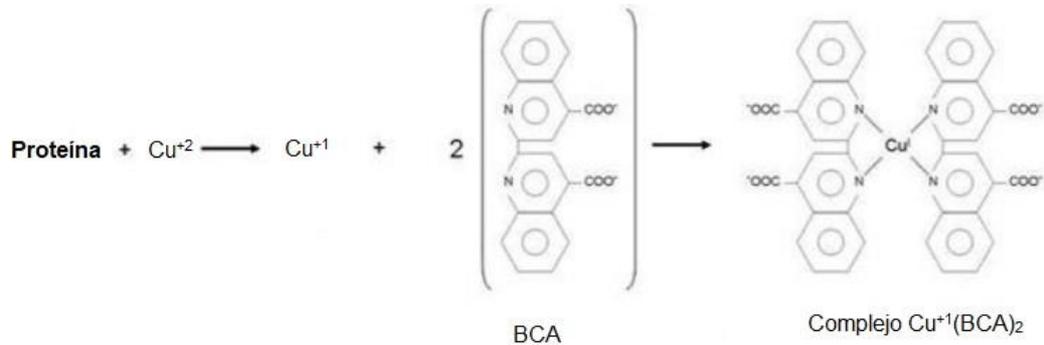


Figura 8: Reacción del método colorimétrico basado en el BCA. Imagen extraída y modificada de [RA03-gPROTEIN.pdf \(pb-l.com.ar\)](#).

Para realizar la curva se hizo uso del kit *Pierce BCA Protein Assay* (Thermo Fisher Scientific) y se siguió el protocolo del fabricante.

En la primera columna de una placa de 96 pocillos (Corning) se realizó la curva patrón de BSA en un rango comprendido entre 0 µg/µL y 6x10⁻² µg/µL. En el resto de pocillos se añadieron 2 µL de muestra proteica en cada uno, por duplicado. A continuación, se preparó la mezcla A:B con los reactivos A y B que vienen incluidos en el kit, en proporción 50:1. A cada pocillo, tanto los que contienen BSA como los que contienen muestra proteica, se les añadió 200 µL de la mezcla A:B y se incubó durante 30 minutos a 37 °C, protegiendo la placa de la luz. Por último, se midió la absorbancia a una longitud de onda de 570 nm con el espectrofotómetro *NanoQuant Infinite M200* (Tecan). A partir de la curva estándar del BSA, en la cual se representa la absorbancia frente a la concentración, se obtuvo la ecuación de la recta para interpolar la concentración proteica de cada muestra (µg/µL).

➤ **Desnaturalización de las proteínas**

Una vez cuantificada la proteína que hay en cada muestra, se llevó a cabo el proceso de desnaturalización, en el cual la conformación terciaria de las proteínas pasó a adquirir una estructura primaria. Para ello se tomaron 20

μg de proteína por cada muestra y se agregó el tampón de carga, formado por 90 μL del tampón 4x *Laemmli Sample buffer solution* (Bio-Rad) y por 10 μL del agente reductor β -mercaptoetanol (Sigma-Aldrich). Se le dio un choque térmico a 95 °C durante 5 minutos, quedando así listas para la electroforesis.

➤ Electroforesis

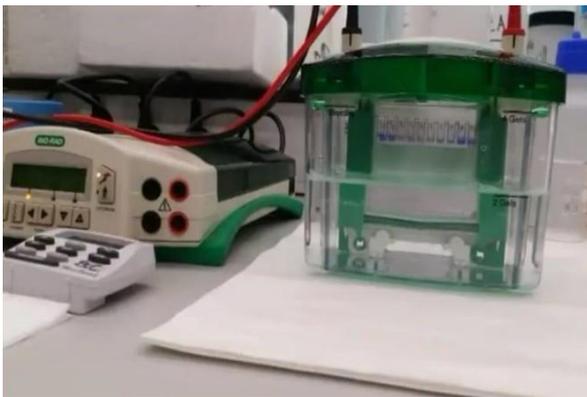


Figura 9: Electroforesis unidimensional SDS-PAGE.

Para separar los extractos proteicos en función del peso molecular se usó el método de electroforesis unidimensional en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS), también conocido como SDS-PAGE. Las proteínas se separaron en geles del 4-20% SDS-PAGE (Bio-Rad) utilizando

el método de electroforesis unidimensional. En el primer carril se cargaron 15 μL del tampón de carga, para asegurarse que la carga de proteína es uniforme a lo largo de los pocillos, en el segundo carril se cargaron 5 μL del marcador de pesos moleculares (Bio-Rad) y, en el resto de carriles, se cargó cada mezcla de 20 μg de proteína preparada en el paso anterior de desnaturalización. La cubeta de electroforesis se llenó con tampón de electroforesis 1x, preparado a partir de tampón de electroforesis 10x (30,3 g de tris-Base (Sigma-Aldrich), 144 g de glicina (Sigma-Aldrich) y 10 g de SDS (Sigma-Aldrich) para preparar 1L). Finalmente, se aplicó una corriente eléctrica de 80 V durante 20 minutos y de 120 V durante 1 hora.

➤ Transferencia

Transcurrida la electroforesis, las proteínas se transfirieron por campo eléctrico desde el gel a una membrana de polivinilideno de difluorido (Bio-Rad) que, previamente, debe ser activada de manera secuencial en

metanol, agua y tampón de transferencia 1x. El tampón de transferencia se preparó a partir del tampón 10x (30,3 g de Tris-base (Sigma-Aldrich) y 144,1 g de glicina (Sigma-Aldrich) para preparar 1L). Se usó el sistema de transferencia *Mini Trans-Blot* (Bio-Rad) mediante el cual se creó un *sándwich* con el casete, almohadillas, papel de filtro, el gel y la membrana. El casete se incorporó a la cubeta y se añadió el tampón de transferencia 1x hasta cubrir por completo. Se aplicó una corriente eléctrica de 0,20 A durante 1 hora y 20 minutos.

➤ Inmunodetección

Una vez realizada la transferencia, se comprobó que las proteínas migraran correctamente. Para ello se hizo una tinción con Ponceau S, tal y como se muestra en la **Figura 10**. Al comprobar que todo el proceso de electroforesis y transferencia fue el correcto, se eliminó la tinción con agua destilada y tampón de lavado 1x, el cual se preparó a partir del 10x (12,1 g de Tris-base, 58 g de NaCl y 10 mL de Tween-20, a pH 7,4, para preparar 1L).

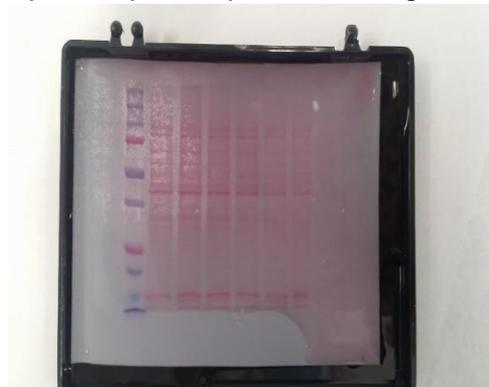


Figura 10: Tinción con Ponceau S.

A continuación, los lugares de unión que quedaron libres en las proteínas se bloquearon con la solución de bloqueo recomendada por el fabricante durante 1 hora a temperatura ambiente. La solución de bloqueo está constituida por 2,5 g de BSA y 50 mL de tampón de lavado 1x. Tras el bloqueo, se incubó toda la noche en la noria, a 4°C, con el anticuerpo primario, el cual fue diluido en disolución de bloqueo siguiendo las recomendaciones del fabricante. Las diluciones seguidas se muestran en la **Tabla III**. El anti-GAPDH (Abcam) se usa como control de carga para la posterior cuantificación de las proteínas.

Tabla III: Dilución empleada para cada anticuerpo primario.

Anticuerpo primario	Anti-iNOS (Abcam)	Anti-COX-2 (Abcam)	Anti-MMP13 (Abcam)	Anti-IL8 (Abcam)	Anti-GAPDH (Abcam)
Proporción anticuerpo:disolución de boqueo	1:1000	1:1000	1:3000	1:1000	1:1000

Tras 12 h, se retiró el anticuerpo primario y se lavó 3 veces durante 5 minutos con tampón de lavado 1x en agitación y, se incubó con el anticuerpo secundario diluido en solución de bloqueo durante 1 hora a temperatura ambiente. Para todos los anticuerpos primarios usados se empleó un anticuerpo secundario *anti-rabbit* (Abcam) en proporción 1:2000. Al finalizar el tiempo de incubación se volvió a lavar la membrana 3 veces durante 5 minutos con tampón de lavado 1x.

Cuantificación

Las proteínas se detectaron con el kit de revelado de quimiolumiscencia *Amersham ECLTM Western Blotting Analysis System* (GE Healthcare Life Sciences, Illinois, USA), por un método enzimático en el cual el anticuerpo secundario está marcado con la enzima peroxidasa (HRP) que cataliza la transformación del sustrato luminol en 3-aminofalato, producto enzimático que genera luz y se lee a una longitud de onda de 428 nm captada por la cámara de revelado *AmershamTM Imager 600* (GE Healthcare, Illinois, USA).

Para cuantificar la expresión proteica se utilizó el programa informático *Image J* (National Institute of Health, USA).

3.6. Inmunocitoquímica.

Procedimiento

En las células previamente fijadas en los portaobjetos con cámara de cultivo celular para microscopía (ver sección 3.1), se quiso detectar la

expresión de la proteína COX-2. Para ello se llevó a cabo una inmunocitoquímica, siguiendo el siguiente protocolo:

Se le añadió a cada pocillo 100 μ L de Tritón 100x (ITW Reagents) al 0,5 % durante 7 minutos, a temperatura ambiente. Una vez transcurrido el tiempo, se hizo un lavado de arrastre añadiendo PBS por encima del portaobjetos. A continuación, se realizaron 3 lavados de 5 minutos cada uno con PBS, añadiendo 150 μ L por pocillo. A continuación, se inhibió la peroxidasa endógena durante 10 minutos, añadiendo 100 μ L por sección del inhibidor. Se retiró y se añadieron 150 μ L de PBS durante 10 minutos. Se retiraron y se incubó cada pocillo con el anticuerpo primario anti-COX-2, exceptuando el control negativo. Se añadieron 100 μ L por sección de una dilución 1:200 del anticuerpo primario en PBS y se dejó incubando 24h a 4 °C. Tras 24 h, se retiró el anticuerpo primario y se realizaron 3 lavados de 10 minutos cada uno con PBS, añadiendo 150 μ L por sección. Se incubaron todos los pocillos con 100 μ L del anticuerpo secundario (Abcam) durante 1 hora. Al finalizar el tiempo de incubación, se realizaron 3 lavados con 150 μ L por sección, de 10 minutos cada uno, con PBS. Se preparó el cromóforo, cromógeno + substrato, en proporción 1:50. Se retiró el PBS y se añadieron 50 μ L de diaminobencidina (DAB) (Dako) en cada sección y se dejó incubar entre 1 y 5 minutos. En cuanto las células empezaron a tomar una tonalidad marrón, se quitaron las paredes de los pocillos. Se decantó rápidamente el DAB y se frenó la reacción con agua destilada.

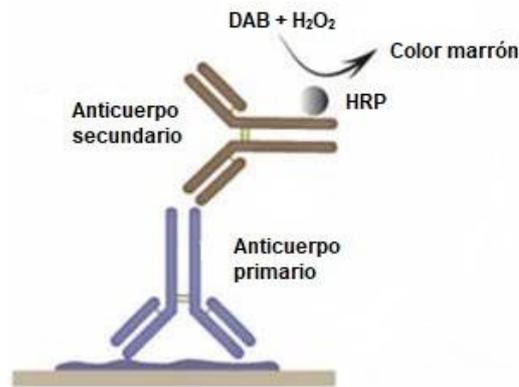


Figura 11: Reacción del DAB con el anticuerpo secundario. Imagen extraída y modificada de *Immunohistochemistry (sigmaaldrich.com)*.

Se contratiñó con hematoxilina de Gill (ITW Reagents) durante 3 minutos. Por último, se llevó a cabo la deshidratación y montaje de los portaobjetos. Para ello se realizaron varios pases de manera secuencial en: alcohol 96° (ITW Reagents), etanol absoluto (ITW Reagents) y xilol (ITW Reagents). Se montó el portaobjetos con el cubreobjetos y pegamento de montaje DPX (Dako).

Para detectar la positividad de COX-2 en las células según el estímulo añadido, se hizo uso del microscopio óptico *Olympus DP71* (INIBIC).

3.7. Análisis estadístico de los resultados.

Las diferencias significativas entre dos grupos fueron determinadas por la t-Student, mientras que las diferencias entre múltiples grupos se determinaron mediante un análisis de varianza (ANOVA) junto con el test de comparaciones múltiples Tukey. Los datos de los análisis y la inferencia estadística se interpretaron con el software Prism 9.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). Los resultados se representaron según la media \pm SEM. Los p valores menores de 0,05 fueron considerados significativos.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Efecto del tratamiento con DHA en la viabilidad y morfología de la línea celular TC28A2.

Transcurridas 6 h tras la estimulación de las células, y siguiendo el proceso previamente descrito (ver sección 3.1), no se observaron cambios en la morfología celular a través del microscopio. Sin embargo, a las 24 h los cambios fueron más notables, tal y como se muestra en la **Figura 12**.

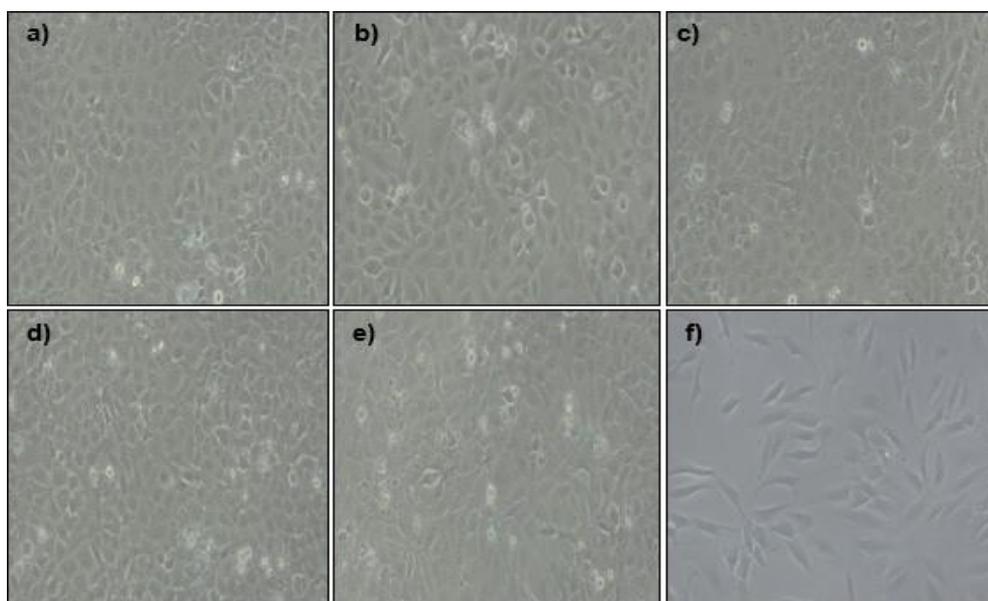


Figura 12: Células vistas al microscopio transcurridas 24 h tras la estimulación con DHA. Control negativo (a), IL-1 β +OSM (b), DHA 10 μ M (c), DHA 50 μ M (d), IL-1 β +OSM+DHA 10 μ M (e), IL-1 β +OSM+DHA 50 μ M (f). Aumento objetivo microscopio: 10x.

No se observaron cambios morfológicos en las células pertenecientes al control negativo (**Fig. 12a**), aquellas que fueron estimuladas con IL-1 β y OSM (**Fig. 12b**), las que fueron estimuladas únicamente con DHA 10 μ M (**Fig. 12c**) y DHA 50 μ M (**Fig. 12d**) y aquellas estimuladas con IL-1 β , OSM y DHA 10 μ M (**Fig. 12e**). Sin embargo, cuando se empleó la combinación de IL-1 β , OSM y DHA 50 μ M (**Fig. 12f**), se observó una disminución drástica en la viabilidad de las células. A la vista de los resultados, la concentración de DHA 50 μ M resulta tóxica para las células. Futuros experimentos

deberían explorar concentraciones intermedias y llevar a cabo una curva de dosis-respuesta.

4.2. Análisis de la expresión génica mediante q-PCR para analizar el efecto protector del tratamiento con DHA.

Como se describió anteriormente (ver sección 3.4), se quiso medir la expresión de cuatro genes pro-inflamatorios (*IL1B*, *IL8*, *iNOS* y *MMP13*) en las células estimuladas con diferentes concentraciones de DHA mediante la técnica de q-PCR. Basándonos en la bibliografía, donde los efectos del DHA sobre los condrocitos son más efectivos a las 24 h, se decidió medir la expresión de los genes en las células estimuladas a dicho tiempo. Los genes *iNOS* y *MMP13* no se detectaron en las muestras estudiadas. En la **Figura 13** se muestran los resultados obtenidos para el gen *IL1B* (**Figura 13a**) y el gen *IL-8* (**Figura 13b**).

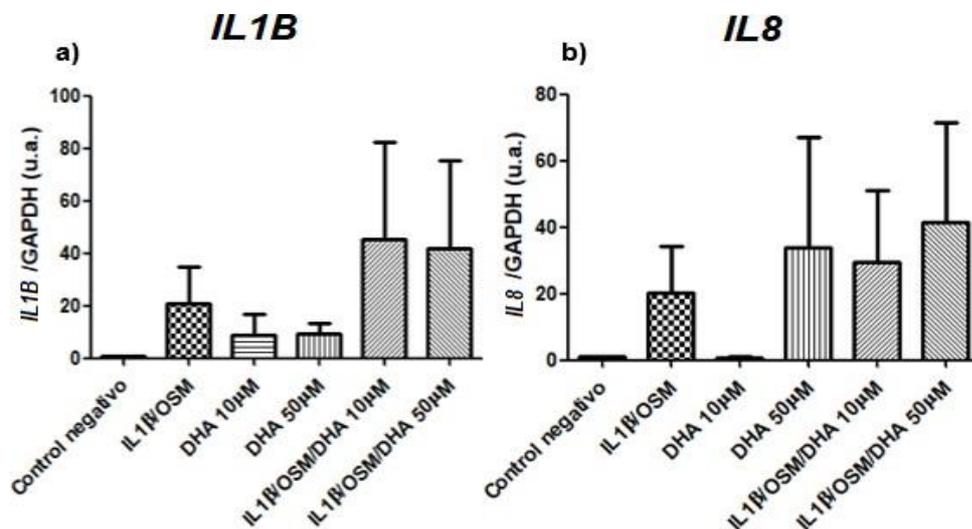


Figura 13: Cuantificación de la expresión génica de *IL1B* y *IL8* mediante q-PCR tras el tratamiento con DHA en condrocitos de la línea celular "TC28A2". (a) *IL1B*, (b) *IL8*.

De forma contraria a lo esperado, para ambos genes, el valor relativo en la expresión del control positivo es menor ($20,62 \pm 15,68$ para *IL1B* y $20,11 \pm 13,69$ para *IL8*) que el producido cuando se estimularon las células con IL-

1 β , OSM y DHA 10 μ M (45,41 \pm 36,39 para *IL1B* y 29,52 \pm 21,08 para *IL8*) y IL-1 β , OSM y DHA 50 μ M (41,97 \pm 33,83 para *IL1B* y 41,54 \pm 71,8 para *IL8*). En el caso de *IL1B*, los datos obtenidos al estimular las células únicamente con DHA 10 μ M (8,67 \pm 9,13) y DHA 50 μ M (9,51 \pm 13,3) son relativamente bajos. Sin embargo, el valor de expresión relativa de *IL8* al estimular con DHA 50 (33,96 \pm 35,04) fue considerablemente elevado. Por otra parte, en todos los casos se observó una gran variación entre los tres experimentos realizados. Tras analizar los datos mediante ANOVA se concluye que los datos no muestran variaciones significativas. El DHA no mostró un comportamiento protector ante la estimulación con citocinas proinflamatorias, tal y como está descrito en la bibliografía (Meiss *et al.*, 2020; Buddhachat *et al.*, 2017; Zainal *et al.*, 2009), donde el tratamiento con DHA mostró un claro efecto protector ya que los genes inflamatorios disminuyeron de forma significativa. Además de no cumplirse este patrón, en el caso del gen *IL8*, se volvió a observar un efecto negativo al emplear la concentración de DHA 50 μ M.

4.3. Análisis de proteínas mediante *Western Blot* del efecto del tratamiento con DHA en la línea TC28A2.

Los resultados obtenidos tras la cuantificación de proteínas son mostrados en la **Figura 14**.

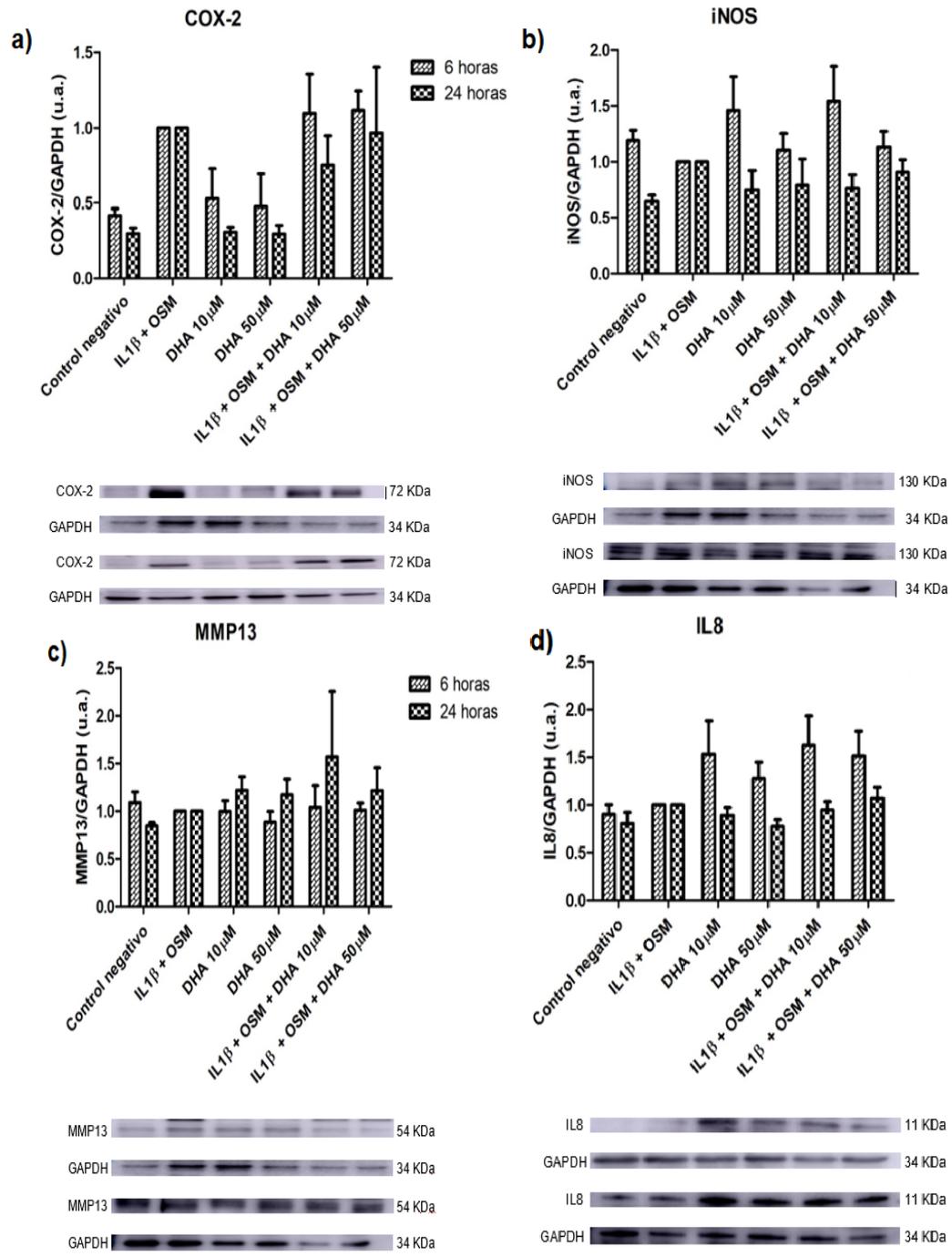


Figura 14: Cuantificación de proteínas proinflamatorias y efecto del tratamiento con DHA en condrocitos de la línea celular "TC28A2". (a) COX-2, (b) iNOS, (c) MMP-13, (d) IL-8.

En el caso de la COX-2 (**Fig. 14a**), a las 6 h se observó una sobreexpresión de dicha proteína cuando las células fueron estimuladas con IL-1 β , OSM y DHA 10 μ M ($1,10 \pm 0,25$) y con IL-1 β , OSM y DHA 50 μ M ($1,12 \pm 0,11$). En

cambio, los valores más altos de expresión a las 24h se detectaron en el control positivo (IL-1 β y OSM), al cual se le dio el valor de la unidad, y estos se vieron reducidos al estimular con DHA 10 μ M ($0,75 \pm 0,18$). En ambos casos, el valor más bajo de expresión de la proteína se observó cuando se usó únicamente DHA 50 μ M ($0,47 \pm 0,21$ y $0,29 \pm 0,06$).

En la **Fig. 14b** se muestra la expresión de iNOS. A las 6 h, los valores más altos se detectaron cuando las células fueron estimuladas con IL-1 β , OSM y DHA 10 μ M ($1,54 \pm 0,32$) y, cuando únicamente se estimularon con DHA 10 μ M ($1,46 \pm 0,31$), respectivamente, mostrando así un aumento frente al control positivo. En el caso de la expresión de iNOS, a las 24 h, el valor más alto de expresión se correspondió con el control positivo, reduciéndose más tras estimular con IL-1 β , OSM y DHA 10 μ M ($0,76 \pm 0,12$) que con IL-1 β , OSM y DHA 50 μ M ($0,91 \pm 0,11$). En el resto de los casos, la cantidad de iNOS se mostró prácticamente constante, sin ninguna variación significativa.

En el caso de la proteína MMP-13 (**Fig. 14c**) se detectó una tendencia prácticamente lineal tanto a las 6 h como a las 24 h. A las 6 h prácticamente no se detectaron cambios entre los diferentes estímulos y, a las 24 h, se observó un aumento entre el control positivo y los estímulos IL-1 β , OSM y DHA 10 μ M ($1,57 \pm 0,69$) y, también entre el control positivo y los estímulos IL-1 β , OSM y DHA 50 μ M ($1,21 \pm 0,25$). Cuando se estimuló únicamente con DHA 10 μ M o DHA 50 μ M, la expresión también fue mayor que el control positivo ($1,21 \pm 0,16$ y $1,17 \pm 0,17$, respectivamente).

Por último, en la **Fig. 14d** se muestran los valores de expresión de la proteína IL-8. A las 6 h, se observaron unos valores considerablemente altos tras estimular las células únicamente con DHA 10 μ M ($1,53 \pm 0,34$) o DHA 50 μ M ($1,27 \pm 0,16$), los cuales fueron muy similares a los observados cuando se estimuló con IL-1 β , OSM y DHA 10 μ M ($1,63 \pm 0,28$) y, cuando se estimularon con IL-1 β , OSM y DHA 50 μ M ($1,51 \pm 0,26$). A las 24 h, se observó una tendencia más lineal y sin ninguna variación notable entre los diferentes estímulos.

Al contrario de lo observado en los trabajos de Phitak y colaboradores (Phitak *et al.*, 2017) y Wang y colaboradores (Wang *et al.*, 2016), no se observó una reducción significativa en la expresión de citocinas proinflamatorias tras el tratamiento con DHA. En ambos estudios, la cantidad de citocinas tras el tratamiento se ve reducida y se muestra el papel protector de este ácido graso, mejorando así el ambiente inflamatorio que rodea a las células en la OA.

A pesar de todo lo descrito hasta el momento, en el caso de la COX-2 se observa una tendencia positiva a las 24 h. De este modo, los valores de proteína proinflamatoria, al estimular las células únicamente con DHA, fueron inferiores a los detectados tras la estimulación con IL-1 β y OSM; mientras que al estimular con IL-1 β , OSM y diferentes concentraciones de DHA, la proteína aumentó, pero sin sobrepasar el control positivo. Además, se detectó una vez más, un efecto negativo a la hora de emplear la concentración más alta de DHA (50 μ M). También se pudo observar que 6 h fueron insuficientes en la estimulación de la línea celular C28A2 a la hora de ver cambios más notables en la expresión de proteínas.

4.4. Detección mediante inmunocitoquímica de COX-2 en la línea celular TC28A2 tras el tratamiento con DHA.

Como la proteína COX-2 mostró resultados prometedores a las 24 h mediante *western blot*, decidimos estudiar su positividad en las células mediante inmunocitoquímica. Los resultados se muestran en la **Figura 15**.

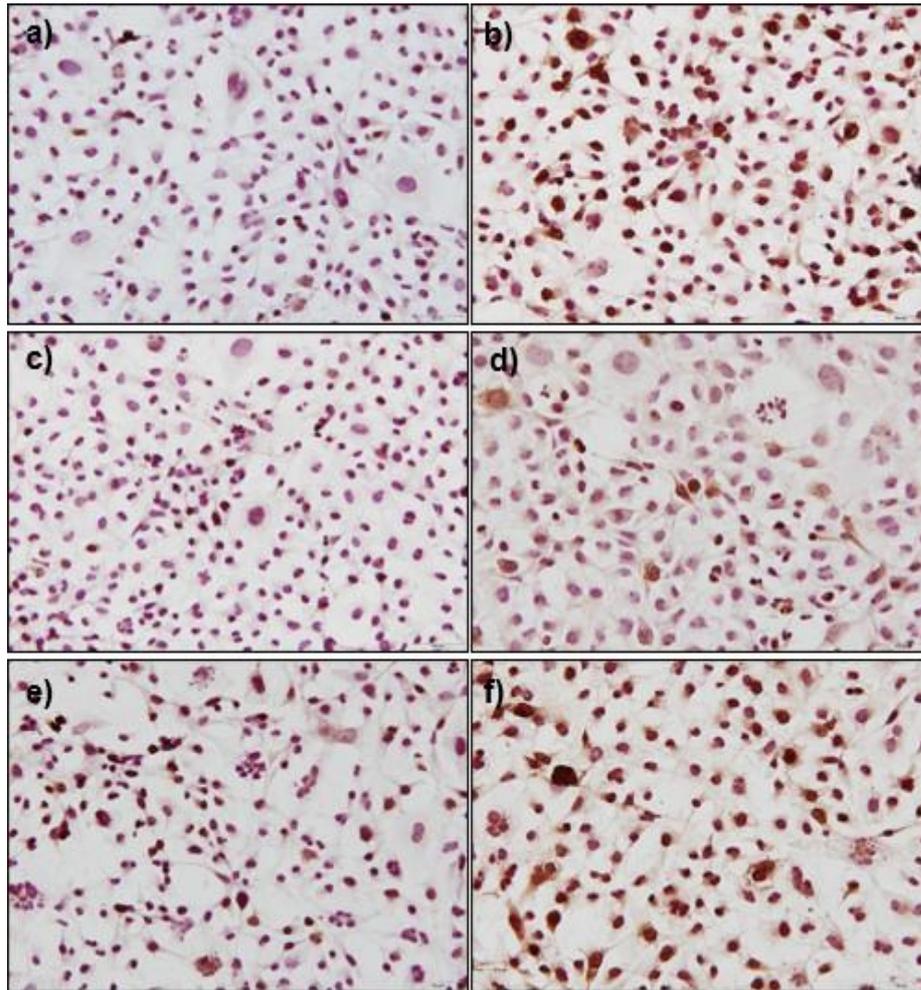


Figura 15: Inmunocitoquímica para COX-2 en células estimuladas y tratadas durante 24 h. Control negativo (a), IL-1 β +OSM (b), DHA 10 μ M (c), DHA 50 μ M (d), IL-1 β +OSM+DHA 10 μ M (e), IL-1 β +OSM+DHA 50 μ M (f). Aumento microscopio: 20x.

Los resultados mostraron la falta de positividad para COX-2 en el control negativo (**Fig. 15a**), mientras que las células estimuladas con IL-1 β y OSM liberaron la proteína proinflamatoria mostrando una alta positividad para la misma (**Fig. 15b**). Así mismo, cuando las células fueron estimuladas únicamente con DHA 10 μ M, no se detectó positividad de igual forma que con el control negativo (**Fig. 15c**). Sin embargo, tras el tratamiento con DHA 50 μ M la positividad de las células fue de un 50 % (**Fig. 15d**). Tras la estimulación con IL-1 β , OSM y DHA, con DHA 10 μ M se observó una alta proporción de células positivas sin llegar a superar el control positivo (**Fig.**

15e), mientras que con DHA 50 μ M (**Fig. 15f**), se volvió a confirmar que el tratamiento a concentraciones altas tiene un efecto negativo, liberando así más COX-2 por parte de las células que las tratadas únicamente con IL-1 β y OSM. Estos resultados van en la línea de lo observado para COX-2 a las 24h mediante western blot (**Fig. 13a**).

5. LIMITACIONES DEL ESTUDIO

Los resultados obtenidos en el presente estudio no siguieron la tendencia esperada, ni van en la línea de las publicaciones de la bibliografía. Todo esto podría explicarse en parte por las diferentes limitaciones del estudio: la línea celular "TC28A2" proviene de cartílago costal y no de cartílago articular, como las células empleadas en los estudios publicados; las células empleadas tenían más de 20 pases, el número de experimentos realizados fue reducido ($n = 3$) y, por último, las concentraciones empleadas parecen ser insuficiente ($10 \mu\text{M}$) y excesiva ($50 \mu\text{M}$), respectivamente.

6. CONCLUSIONES

Tras llevar a cabo el estudio y, a la vista de los resultados obtenidos, se puede concluir que:

1. El tratamiento con DHA $50 \mu\text{M}$ tiene un efecto negativo en la viabilidad de las células.
2. El tratamiento con DHA no redujo la expresión de genes proinflamatorios inducidos en respuesta a IL-1 β y OSM.
3. El tratamiento con DHA no redujo la expresión de proteínas inflamatorias inducidas en respuesta a IL-1 β y OSM, aunque se observa una tendencia positiva en la reducción de la expresión de COX-2 tras el tratamiento con DHA $10 \mu\text{M}$ a las 24h.
4. En general, no se observó un efecto protector por parte del DHA en respuesta a IL-1 β y OSM en las células de la línea condrocítica TC28A2.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Arruga Laviña, M., García, C., & Llambí, S. (2006). Una nueva era para el diagnóstico genético en salud y producción animal. *Albéitar: Publicación Veterinaria Independiente*, 93, 32–35.
- Blanco, F. J., Silva-Díaz, M., Quevedo Vila, V., Seoane-Mato, D., Pérez Ruiz, F., Juan-Mas, A., Pego-Reigosa, J. M., Narváez, J., Quilis, N., Cortés, R., Romero Pérez, A., Fábregas Canales, D., Font Gayá, T., Bordoy Ferrer, C., Sánchez-Piedra, C., Díaz-González, F., & Bustabad-Reyes, S. (2021). Prevalencia de artrosis sintomática en España: Estudio EPISER2016. *Reumatología Clínica*, 17(8), 461–470.
- Buddhachat, K., Siengdee, P., Chomdej, S., Soontornvipart, K., & Nganvongpanit, K. (2017). Effects of different omega-3 sources, fish oil, krill oil, and green-lipped mussel against cytokine-mediated canine cartilage degradation. *In Vitro Cellular & Developmental Biology. Animal*, 53(5), 448–457.
- Burr, G. O., & Burr, M. M. (1930). On the nature and rôle of the fatty acids essential in nutrition. *Journal of Biological Chemistry*, 86(2), 587–621.
- Calder, P. C., Yaqoob, P., Thies, F., Wallace, F. A., & Miles, E. A. (2002). Fatty acids and lymphocyte functions. *British Journal of Nutrition*, 87(S1), S31–S48.
- Cooper, C., Snow, S., McAlindon, T. E., Kellingray, S., Stuart, B., Coggon, D., Dieppe, P. A., & McAlindon, T. E. (2000). Risk factors for the incidence and progression of radiographic knee osteoarthritis. *Arthritis & Rheumatism*, 43(5), 995–1000.
- Cross, M., Smith, E., Hoy, D., Nolte, S., Ackerman, I., Fransen, M., Bridgett, L., Williams, S., Guillemin, F., Hill, C. L., Laslett, L. L., Jones, G., Cicuttini, F., Osborne, R., Vos, T., Buchbinder, R., Woolf, A., & March, L. (2014). The global burden of hip and knee osteoarthritis: estimates from the Global Burden of Disease 2010 study. *Annals of the*

Rheumatic Diseases, 73(7), 1323 LP – 1330.

Dinu, M., Pagliai, G., Casini, A., & Sofi, F. (2017). Mediterranean diet and multiple health outcomes: an umbrella review of meta-analyses of observational studies and randomised trials. *European Journal of Clinical Nutrition* 2018 72:1, 72(1), 30–43.

Donoso, R. A. (2019). *Diseño experimental y análisis de datos en la técnica de la qRT-PCR*. 15. [https://www.ucm.es/data/cont/docs/261-2019-03-22-práctica_4_diseño_experimental_y_análisis_de_datos_en_la_técnica_de_la_RT_qPCR_\(1\).pdf](https://www.ucm.es/data/cont/docs/261-2019-03-22-práctica_4_diseño_experimental_y_análisis_de_datos_en_la_técnica_de_la_RT_qPCR_(1).pdf)

Eduardo Wainstein, G. (2014). Patogénesis de la artrosis. *Revista Médica Clínica Las Condes*, 25(5), 723–727.

Finger, F., Schörle, C., Zien, A., Gebhard, P., Goldring, M. B., & Aigner, T. (2003). Molecular Phenotyping of Human Chondrocyte Cell Lines T/C-28a2, T/C-28a4, and C-28/I2. *Arthritis and Rheumatism*, 48(12), 3395–3403.

Goldring, M. B., Birkhead, J. R., Suen, L., Yamin, R., Mizuno, S., Glowacki, J., Arbiser, J. L., & Apperleyll, J. F. (1994). Human Chondrocytes. *Society*, 94(December), 2307–2316.

Knott, L., Avery, N. C., Hollander, A. P., & Tarlton, J. F. (2011). Regulation of osteoarthritis by omega-3 (n-3) polyunsaturated fatty acids in a naturally occurring model of disease. *Osteoarthritis and Cartilage*, 19(9), 1150–1157.

López, C. A. A., Rodrigo, L., & Véjar, F. (2019). *Cartílago y gonartrosis* *Cartilage and knee osteoarthritis*. 23(6), 802–813.

Mayoral Rojals, V. (2021). Epidemiología, repercusión clínica y objetivos terapéuticos. *Revista de La Sociedad Española Del Dolor*, 28, 4–10.

Meiss, M., Sanchez-Hidalgo, M., Gonzalez-Benjumea, A., Fernandez-Bola, J., Alarcón-de-la-Lastra, C., Oreffo, R., & de Andrés, M. (2020). Ligstroside aglycone as a novel nutraceutical in treatment of

osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage*, 28, S477.

- Pawlosky, R. J., Hibbeln, J. R., Novotny, J. A., & Salem, N. (2001). Physiological compartmental analysis of α -linolenic acid metabolism in adult humans. *Journal of Lipid Research*, 42(8), 1257–1265.
- Phitak, T., Boonmaleerat, K., Pothacharoen, P., Pruksakorn, D., & Kongtawelert, P. (2017). Leptin alone and in combination with interleukin-1-beta induced cartilage degradation potentially inhibited by EPA and DHA.
- Simopoulos, A. P. (1999). Essential fatty acids in health and chronic disease. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 70(3), 560s-569s.
- Simopoulos, A., & Simopoulos, A. P. (n.d.). *Human Requirement for N-3 Polyunsaturated Fatty Acids symposium: role of poultry products in enriching the human diet with n-3 pufa human requirement for n-3 Polyunsaturated Fatty Acids*.
- Sophia Fox, A. J., Bedi, A., & Rodeo, S. A. (2009). The basic science of articular cartilage: Structure, composition, and function. *Sports Health*, 1(6), 461–468.
- Thomas, S., Browne, H., Mobasher, A., & Rayman, M. P. (2018). What is the evidence for a role for diet and nutrition in osteoarthritis? *Rheumatology (United Kingdom)*, 57, iv61–iv74.
- Urquiaga, I., Echeverría, G., Dussillant, C., & Rigotti, A. (2017). Origen, componentes y posibles mecanismos de acción de la dieta mediterránea. *Revista Médica de Chile*, 145(1), 85–95.
- Wang, Z., Guo, A., Ma, L., Yu, H., Zhang, L., Meng, H., Cui, Y., Yu, F., & Yang, B. (2016). Docosahexenoic acid treatment ameliorates cartilage degeneration via a p38 MAPK-dependent mechanism. *International Journal of Molecular Medicine*, 37(6), 1542–1550.
- Zainal, Z., Longman, A. J., Hurst, S., Duggan, K., Caterson, B., Hughes, C. E., & Harwood, J. L. (2009). Relative efficacies of omega-3 polyunsaturated fatty acids

in reducing expression of key proteins in a model system for studying osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage*, 17(7), 896–905.

Páginas Web

-[New Ways to Grow Cartilage | Osteoarthritis Research \(curearthritis.org\)](https://www.curearthritis.org)

[Fecha acceso: 20/05/2022].

-[rsif20180611f01.gif \(500x266\) \(royalsocietypublishing.org\)](#) [Fecha acceso:

24/04/2022].

ANEXO I

RESULTADOS PREVIOS QUE AVALAN LA VIABILIDAD DEL PROYECTO

Nuestros datos preliminares con un polifenol del aceite de oliva virgen extra (AOVE), el ligustrósido de aglicón, muestran el potencial terapéutico de los nutraceuticos de la Dieta Mediterránea en la prevención y tratamiento de la artrosis. Estos resultados fueron publicados en la revista *Journal of Tissue Engineering* (de Andrés *et al.* Osteoarthritis treatment with a novel nutraceutical acetylated ligstroside aglycone, a chemically modified extra-virgin olive oil polyphenol. *J Tissue Eng.* 2020;11:2041731420922701).

Los resultados de este Trabajo de Fin de Máster han sido financiados por el Proyecto de Investigación en Salud, AES 2019 concedido a la Dra. M^a del Carmen de Andrés González para estudiar el papel terapéutico de modificadores epigenéticos y nutraceuticos en la artrosis.