

Regulamento de Trabajo de Fin de Mestrado Facultade  
de Ciencias da Saude Universidade da Coruña

---



FACULTADE DE CIENCIAS DA SAÚDE

**MESTRADO EN ASISTENCIA E INVESTIGACIÓN SANITARIA**

**ESPECIALIDADE: FUNDAMENTOS EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA**

Curso académico 2017-18

TRABALLO DE FIN DE MESTRADO

**Estudio del metabolismo de la glucosa en  
condrocitos humanos utilizando un modelo  
celular *in vitro***

**Olga María Sánchez Piñeiro**

**14/06/2018**

**ESTUDIO DEL METABOLISMO DE LA GLUCOSA EN CONDROCITOS  
HUMANOS UTILIZANDO UN MODELO CELULAR *IN VITRO***

**GLUCOSE METABOLISM STUDY USING HUMAN CHONDROCYTES  
IN A *IN VITRO* MODEL**

**ESTUDO DO METABOLISMO DA GLICOSA EN CONDROCITOS  
HUMANOS UTILIZANDO UN MODELO CELULAR *IN VITRO***

Dirigido por: Dra. María Eugenia Vázquez Mosquera

Dra. Mercedes Fernández Moreno

## RESUMEN

Los condrocitos, único tipo celular presente en el cartílago articular, son los encargados de mantener el equilibrio entre los procesos anabólicos y catabólicos del tejido, cuando este equilibrio se rompe a favor de los procesos destructivos comienza la degradación del mismo generando las lesiones características de la artrosis (OA). Por lo que el mantenimiento de los requerimientos energéticos de los condrocitos son claves para evitar este deterioro. Debido a la baja disponibilidad de oxígeno en el cartílago articular, el principal metabolismo de los condrocitos es la glucólisis anaerobia. Sin embargo, cuando esta vía se ve desbordada, los condrocitos utilizan la vía oxidativa, siendo ésta responsable de la producción de  $\cong 25\%$  del ATP total.

Para estudiar la importancia que tiene esta vía en el metabolismo del condrocito y en el proceso artrósico, en este trabajo se valora el uso del inhibidor del transportador de piruvato a la mitocondria (MCP), UK5099, en un modelo *in vitro* de condrocitos humanos, la línea celular T/C-28a2.

Se incubaron estas células con distintas concentraciones del inhibidor y se valoró su efecto en células expuestas a concentración baja y alta de glucosa en el medio. Se analizó la viabilidad celular tras la exposición a distintas concentraciones de UK5099, así como la producción de ROS mitocondriales y la expresión de genes relacionados con el metabolismo de la glucosa (*SLC2A1* y *HK2*) y aquellos relacionados con degradación de la matriz extracelular del cartílago (*MMP3* y *MMP13*) e inflamación (*IL1 $\beta$* ).

Los resultados mostraron que las concentraciones más elevadas de UK5099 descienden la viabilidad celular, seleccionando así para el desarrollo del trabajo 2, 5 y 10  $\mu\text{M}$ . Los niveles de anión superóxido ( $\text{O}_2^-$ ) disminuyen tras la exposición a 2 $\mu\text{M}$  del inhibidor, notándose un ligero aumento de esta especie reactiva ante las concentraciones más elevadas. A nivel de la expresión génica se observó mayor modulación tras la exposición a 2 $\mu\text{M}$ , mostrando un aumento de la expresión de *HK2*, así

como de los genes relacionados con la patología artrósica, *MMP13* e *IL1 $\beta$* . Estos resultados podrían ayudar a comprender la importancia de la vía glucolítica aerobia del condrocito en el mantenimiento del cartílago articular y por tanto en el proceso artrósico.

## ABSTRACT

The chondrocytes, the only cellular type present in the articular cartilage, are the responsible to maintain a balance between the anabolic and catabolic processes in the tissue, when this balance breaks in favour of the destructive processes, the osteoarthritis (OA) begins. The maintenance of chondrocytes energetic requirements is keys to avoid the tissue degeneration. The cartilage has several characteristic and one of then is the low availability of oxygen. In this environmental the main metabolism of the chondrocytes is the anaerobic glycolysis. However it is know that these cells can use the oxidative pathway, which is responsible of  $\cong 25\%$  of the total ATP.

To study the magnitude of glucose metabolism in the chondrocytes viability and in the process of OA, the aim of this work will be the check an inhibitor of mitochondrial pyruvate carrier (MPC), UK5099, using T/C-28a2 an *in vitro* model.

Cells were incubated with different UK5099 concentration and its effect was evaluated in presence of low and high glucose concentrations in the cellular culture medium. The cellular viability, mitochondrial ROS production and gene expression (*SLC2A1*, *HK2*, *MMP3*, *MMP13* and *IL1 $\beta$* ) were evaluated.

The results showed that higher UK5099 concentrations decreased the cellular viability, with these data, the low concentrations (2, 5 and 10  $\mu\text{M}$ ) were selected to analysis the parameter described before. The levels of mitochondrial superoxide anion ( $\text{O}_2^-$ ) were modulated after the additions of UK5099. The cells treated with UK5099 at 2  $\mu\text{M}$  showed a light increased compared with cells without treatment. The genetic level was modulated after the cell incubation with the MPC inhibitor at 2  $\mu\text{M}$ . Data showed an increase in the levels of *HK2* and the genes related with the pathology; *MMP13* and *IL1 $\beta$* .

Data obtained in this work help us to understand the importance of aerobic glycolysis in the chondrocyte for the maintenance of articular cartilage and therefore in the osteoarthritic process.

## RESUMO

Os condrocitos, único tipo celular presente no cartílago articular, son os encargados de manter o equilibrio entre os procesos anabólicos e catabólicos do tecido, cando este equilibrio rompe a favor dos procesos destrutivos comeza a degradación do mesmo xerando as lesións características da Artrose (OA). Polo que o mantemento dos requirimentos enerxéticos dos condrocitos son claves para evitar esta deterioración. Debido á baixa dispoñibilidade de osíxeno na cartilaxe articular, o principal metabolismo dos condrocitos é a glicólise anaerobia. Con todo, cando esta vía vese desbordada, os condrocitos utilizan a vía oxidativa, sendo esta responsable da produción de  $\cong 25\%$  do ATP total.

Para estudar a importancia que ten esta vía no metabolismo do condrocito e no proceso artrósico, neste traballo valórase o uso do inhibidor do transportador de piruvato á mitocondia (MCP), UK5099, nun modelo *in vitro* de condrocitos humanos, a liña celular T/C-28a2.

Incubáronse estas células con distintas concentracións do inhibidor e valorouse o seu efecto en células expostas a concentración baixa e alta de glicosa no medio. Analizouse a viabilidade celular tras a exposición a distintas concentracións de UK5099, así como a produción de ROS mitocondriais e a expresión de xenes relacionados co metabolismo da glicosa (*SLC2A1* e *HK2*) e aqueles relacionados coa degradación da matriz extracelular da cartilaxe (*MMP3* e *MMP13*) e inflamación (*IL1 $\beta$* ).

Os resultados mostraron que a concentracións máis elevadas de UK5099 descende a viabilidade celular, seleccionando así para o desenvolvemento do traballo 2, 5 e 10  $\mu\text{M}$ . Os niveis de anión superóxido ( $\text{O}_2^-$ ) diminúen tras a exposición a 2  $\mu\text{M}$  do inhibidor, notándose un lixeiro aumento desta especie reactiva ante as concentracións máis elevadas. A nivel da expresión génica observouse maior modulación tras a exposición a 2  $\mu\text{M}$ , mostrando un aumento da expresión de *HK2*, así como dos xenes relacionados coa patoloxía artrósica, *MMP13* e *IL1 $\beta$* . Estes resultados poderían axudar a comprender a importancia da vía glicolítica aerobia do

condrocito no mantemento da cartilaxe articular e por tanto no proceso artrósico.



## ÍNDICE DE FIGURAS

## ÍNDICE DE TABLAS

## ÍNDICE DE ABREVIATURAS

INTRODUCCIÓN .....	1
1. DEFINICIÓN DE ARTROSIS (OA) .....	1
2. ESTRUCTURA DEL TEJIDO ARTICULAR .....	2
2.1. Matriz extracelular (MEC) .....	2
2.2. Los condrocitos .....	3
3. METABOLISMO .....	4
OBJETIVOS .....	6
METODOLOGÍA .....	7
1. CULTIVO CELULAR .....	7
2. ENSAYO DE VIABILIDAD .....	7
3. ESTRÉS OXIDATIVO .....	9
4. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA .....	10
4.1. Extracción de ácido ribonucleico (ARN) .....	10
4.2. Retrotranscripción de ácido ribonucleico mensajero (ARNm) a ácido desoxirribonucleico complementario (ADNc) .....	11
4.3. Reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real (PCR-TR) ...	12
4.4. Análisis estadístico .....	14
RESULTADOS .....	15
1. ENSAYO DE VIABILIDAD CELULAR .....	15
2. EFECTOS DEL UK5099 EN EL ESTRÉS OXIDATIVO CELULAR ..	18
3. EXPRESIÓN DE GENES IMPLICADOS EN EL METABOLISMO ...	20
DISCUSIÓN .....	25
CONCLUSIONES .....	28
BIBLIOGRAFÍA .....	29

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Representación de una articulación .....	1
<b>Figura 2.</b> Estructura del cartílago articular .....	3
<b>Figura 3.</b> Representación de los posibles destinos del piruvato .....	5
<b>Figura 4.</b> Cuantificación de los efectos de concentraciones de UK5099 y DMSO sobre la viabilidad celular a las 3 horas (h) .....	15
<b>Figura 5.</b> Cuantificación de los efectos de concentraciones de UK5099 y DMSO sobre la viabilidad celular a las 24 h .....	16
<b>Figura 6.</b> Efecto de las concentraciones de UK5099 sobre la viabilidad celular tras 48 h. ....	16
<b>Figura 7.</b> Efecto de las concentraciones del UK5099 sobre la viabilidad celular durante un tiempo de incubación de 3 y 24h.....	17
<b>Figura 8.</b> Evaluación de la producción de $O_2^-$ tras incubar las células en medio DMEM de 1 g/l de glucosa. ....	19
<b>Figura 9.</b> Evaluación de la producción de $O_2^-$ tras incubar las células en medio DMEM con 4.5 g/l de glucosa. ....	19
<b>Figura 10.</b> Expresión génica del transportador de glucosa en la membrana de los condrocitos <i>SLC2A1</i> .....	21
<b>Figura 11.</b> Expresión génica de la <i>HK2</i> .....	22
<b>Figura 12.</b> Expresión génica de <i>MMP3</i> y <i>MMP 13</i> .....	23
<b>Figura 13.</b> Expresión génica de <i>IL1<math>\beta</math></i> .....	24

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla I.</b> Componentes de la mezcla de reacción para la PCR-TR. ....	13
<b>Tabla II.</b> Protocolo de amplificación utilizado en la PCR-TR. ....	13
<b>Tabla III.</b> Secuencias de cebadores para amplificación por PCR-TR .....	14

## ÍNDICE DE ABREVIATURAS

Abs	Absorbancia
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ATP	Adenosín trifosfato
CTE	Cadena de transporte de electrones
DE	Desviación estándar
DMEM	<i>Dubelcco's modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
g/l	Gramo/litro
h	Horas
<i>HK2</i>	Hexoquinasa 2
<i>IL1<math>\beta</math></i>	Interleuquina 1beta
MEC	Matriz extracelular
min	minutos
<i>MMP3</i>	Metaloproteasa 3
<i>MMP13</i>	Metaloproteasa 13
MPC	Transportador de piruvato a la mitocondria
MTS	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximeoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio
MW6	Placa multipocillo de 6 pocillos
MW96	Placa multipocillo de 96 pocillos
Nº	Número
nm	Nanómetro
O <sub>2</sub>	Oxígeno molecular
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Anión superóxido
OA	Artrosis
OARSI	<i>Osteoarthritis Research Society International</i>
OXPHOS	Fosforilación oxidativa
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa

PCR-TR	Reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real
ROS	Especies reactivas oxígeno ( <i>Reactive oxygen species</i> )
<i>SLC2A1</i>	Transportador de glucosa 1
SBF	Suero bovino fetal
UPL	<i>Universal Probe Library</i>

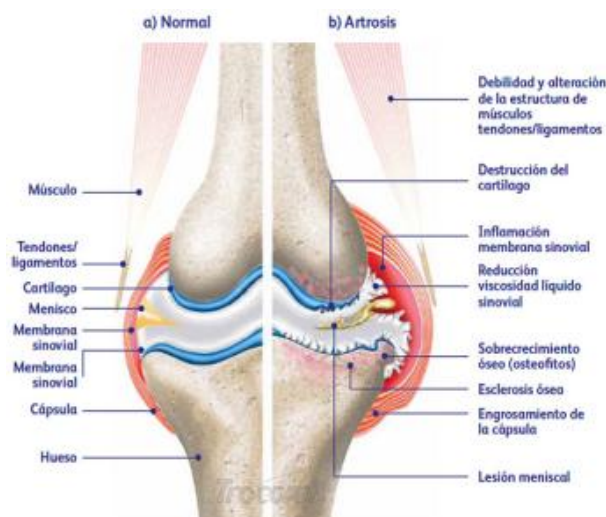
## INTRODUCCIÓN

### 1. DEFINICIÓN DE ARTROSIS (OA)

La OA según la *Osteoarthritis Research Society International* (OARSI) es un desorden que implica a las articulaciones móviles y está caracterizada por el estrés celular y la degradación de la matriz extracelular (MEC) iniciada por micro y macro-lesiones que activan las respuestas de reparación. La enfermedad se manifiesta primero como un trastorno molecular del metabolismo del tejido articular seguido de trastornos anatómicos y/o fisiológicos con degradación del cartílago, remodelación ósea, formación de osteofitos, inflamación articular y pérdida de función, que puede culminar en enfermedad <sup>1</sup> (**Figura 1**).

En la degradación de cartílago predominan los mecanismos catabólicos sobre los anabólicos<sup>2</sup>.

Los factores que afectan al desarrollo de la patología artrósica son: la edad, el sexo, el peso corporal, la dieta, el estrés oxidativo vinculado al envejecimiento y los procesos inflamatorios<sup>3</sup>.



**Figura 1.** Representación de una articulación (rodilla) sana frente a una con artrosis (Imagen tomada de <https://csmontequinto.wordpress.com/tag/cartilago>)

## 2. ESTRUCTURA DEL TEJIDO ARTICULAR

### 2.1. Matriz extracelular (MEC)

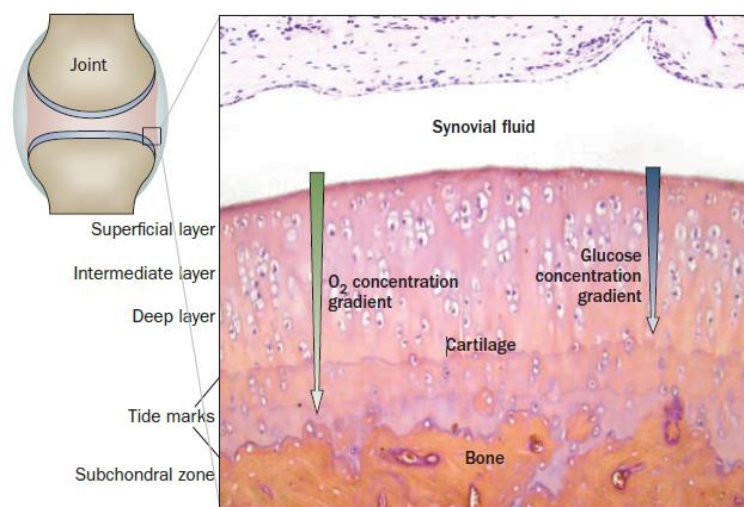
El cartílago articular es un tejido conectivo que envuelve al hueso en las articulaciones sinoviales y facilita la articulación de los mismos entre sí. Se trata de un tejido anóxico, avascular, aneural y alinfático formado por una MEC que alberga a los condrocitos<sup>4</sup>.

La MEC se compone de agua mayoritariamente y en menor porcentaje de colágeno, proteoglicanos y proteínas con una menor representación<sup>5</sup>.

El colágeno constituye una red de fibrillas proporcionando una estructura de base para organizar a condrocitos y proteoglicanos. Todo esto constituye un cartílago característico denominado hialino.

El cartílago hialino recibe el suministro de oxígeno y nutrientes mediante difusión desde el líquido sinovial, los tejidos adyacentes y el hueso subcondral.

La concentración de glucosa y la tensión de oxígeno ( $O_2$ ) se modulan a medida que se profundiza en el tejido dando lugar a una diferenciación zonal. La capa más superficial presenta una concentración elevada de glucosa y de oxígeno por el contacto directo con el líquido sinovial. La mayor concentración de condrocitos se presenta en la capa intermedia a pesar de existir menor concentración de glucosa y tensión de oxígeno. En la zona más profunda el número de células disminuye drásticamente, así como, la disponibilidad de  $O_2$  y nutrientes<sup>6</sup> (**Figura 2**).



**Figura 2.** Estructura del cartílago articular donde se aprecia la diferenciación en capas superficial, intermedia y profunda marcándose la disminución de  $O_2$  y glucosa a medida que se profundiza en ellas (Imagen captada de Nature Reviews Rheumatology, 2011; 7(3): 161-169)

## 2.2. Los condrocitos

Los condrocitos, único tipo celular presente en el tejido, tienen un papel primordial en la biosíntesis y degradación de la MEC. Cuando el equilibrio entre ambos procesos se rompe y priman los procesos catabólicos empieza el proceso de supresión de la síntesis de MEC, disminución del número de condrocitos y secreción de proteasas<sup>7</sup>.

La actividad de los condrocitos depende de un aporte mínimo de nutrientes y de oxígeno<sup>8</sup>. La energía que necesitan proviene mayoritariamente de la glucólisis por la vía de *Embden Meyerhof*, que apenas requiere  $O_2$ <sup>9</sup>, aunque el hecho de poseer mitocondrias y enzimas activas mitocondriales confirma la intervención de un metabolismo aerobio. La vía oxidativa (aerobia) tiene su máxima representación en la fosforilación oxidativa (OXPHOS) para generar hasta un 25% del adenosín trifosfato (ATP). La OXPHOS es comparativamente con la glucólisis, 18 veces más eficiente en



las capas superficial e intermedia del cartílago por no ser anóxicas<sup>10</sup>.

### 3. METABOLISMO

Como se ha descrito anteriormente el mantenimiento de la estructura de la MEC es consecuencia del equilibrio entre el anabolismo y el catabolismo mediado por el condrocito<sup>2</sup>.

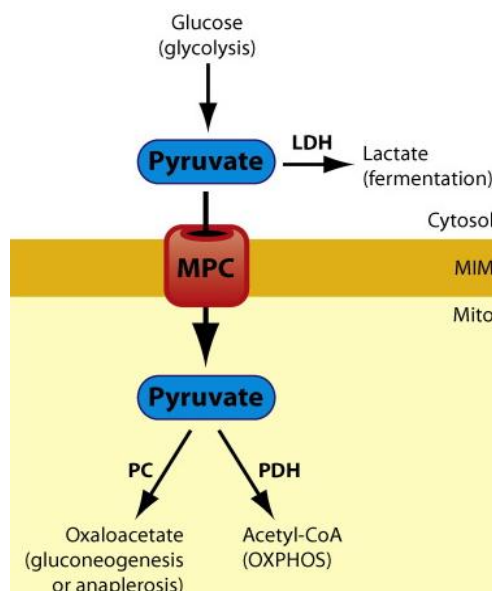
Se considera que este tipo celular tiene un metabolismo mayoritariamente glucolítico pero recurre a vías anaerobias para obtener energía en situaciones de baja disponibilidad de O<sub>2</sub>. Por ello y la naturaleza del tejido articular, la mitocondria no fue considerada una diana de estudio de la patología artrósica hasta hace relativamente pocos años, estableciéndose evidencias que reflejan que la mitocondria está involucrada en la patogénesis de la OA<sup>11</sup>.

El orgánulo que sintetiza la mayor cantidad de energía en forma de ATP en la célula es la mitocondria y lo consigue a través del acoplamiento entre la cadena de transporte de electrones (CTE) y la OXPHOS<sup>12</sup>. Los electrones que escapan en este proceso reducen el oxígeno dando lugar a especies reactivas de oxígeno (ROS)<sup>13</sup>.

La presencia de ROS a nivel celular en condiciones normales es común en procesos biológicos<sup>14</sup> pero su aumento se asocia con daño en el genoma mitocondrial y la maquinaria celular, con el consiguiente descenso de los niveles de expresión de enzimas detoxificadoras, produciendo finalmente un aumento del daño celular<sup>15</sup>. Este proceso de incremento de daño celular mediado por ROS se describió en condrocitos OA, los cuales presentan unos niveles elevados en comparación con los sanos<sup>15-16</sup>.

El incremento de la presencia de ROS origina una regulación de los procesos de apoptosis y muerte celular que culminan en la degradación del tejido articular y en el desarrollo de la OA<sup>17-18</sup>.

El piruvato es una molécula crítica para poner en funcionamiento el OXPHOS en la mitocondria, uniendo la glucólisis con el ciclo de Krebs en la mitocondria, jugando por tanto un papel clave en numerosos procesos celulares. El piruvato entra en la mitocondria a través de un transportador mitocondrial (*mitochondrial pyruvate carrier*, MPC) que se haya en la membrana interna de la mitocondria y transporta el piruvato procedente de la glucólisis anaerobia al interior de la mitocondria<sup>19</sup> (**Figura 3**).



**Figura 3.** Representación de los posibles destinos del piruvato. El piruvato es reducido en el citoplasma por la lactato deshidrogenasa (LDH) o bien se introduce en el interior de la matriz mitocondrial por el MPC (Imagen tomada de Elsevier, 2016; 1863(10):2436-2442)

El bloqueo de este transportador mediante el uso de UK5099 como inhibidor provoca la disminución del OXPHOS y un aumento de la glucólisis anaerobia<sup>20</sup> al reducir los niveles de ATP e incrementar los niveles de ADP y AMP<sup>21</sup>. Los bajos niveles de expresión de la proteína MPC están correlacionados con una baja supervivencia en diversos tipos de tumores<sup>22</sup>.

## OBJETIVOS

Teniendo en cuenta que los condrocitos utilizan mayoritariamente la vía glucolítica para obtener ATP y un 25% del total de ATP lo obtienen vía OXPHOS, y que entre las características del tejido está una baja disponibilidad de nutrientes, hemos planteado utilizar un modelo celular *in vitro* cultivado en alta y baja concentración de glucosa, para testar la respuesta celular al inhibir el MPC incubando las células con UK5099.

Para ello, en este trabajo se han planteado los siguientes objetivos:

1. Estudiar el efecto del inhibidor UK5099 sobre la viabilidad celular.
2. Analizar los niveles de producción del anión superóxido mitocondrial ( $O_2^-$ ) al inhibir la entrada de piruvato en la mitocondria.
3. Analizar los niveles de expresión génica de genes implicados en el metabolismo de la glucosa, así como, en el proceso artrósico, en presencia y ausencia del UK5099.

## METODOLOGÍA

### 1. CULTIVO CELULAR

Para el desarrollo del presente trabajo se utilizó la línea celular de condrocitos T/C-28a2, esta fue cedida a nuestro laboratorio por la Dra. Mary Goldring (*HSS Research Institute, USA*).

Estas células crecen en medio de cultivo *Dubelcco's modified Eagle's Medium (DMEM*, Thermo Fisher Scientific, USA) y los experimentos se llevaron a cabo en dos concentraciones diferentes de glucosa, una baja correspondiente a 1 gramo/litro (g/l) y otra alta a 4.5 g/l suplementados ambos al 10% con suero bovino fetal (*SBF; Gibco, España*) y al 1% de penicilina/estreptomina (*P/S Gibco life technologies, España*), se crecieron en estufa a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> y humedad a saturación.

Las células se sub-cultivaron al llegar a una confluencia aproximada del 80%.

### 2. ENSAYO DE VIABILIDAD

El ensayo de viabilidad sirve para conocer el número de células que sobreviven en unas condiciones específicas de cultivo.

Se llevó a cabo con el kit *CellTiter 96<sup>®</sup> AQueous NonRadiactive Cell Proliferation Assay (Promega, USA)* que es un método colorimétrico para determinar el número de células en proliferación.

Las células viables reducen el compuesto tetrazólico, 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio (MTS), junto con un reactivo de acoplamiento de electrones, la fenazina metosulfato (PMS), en un producto conocido como formazán que se mide por espectrofotometría a 490 nanómetros (nm) y que indicará el número de células viables en cultivo.

Para desarrollar este ensayo se sembraron  $6 \times 10^3$  células por pocillo en placas de 96 pocillos (MW96; *Corning, USA*) en DMEM, tanto a 1 g/l de glucosa como a 4.5 g/l de glucosa suplementados con SBF al 10%.

Tras 24 h en cultivo se deplecionó el SBF del medio de cultivo para lo cual se cambió el DMEM al 10% por DMEM suplementado al 0.5% de SBF. Las células se dejaron toda la noche en este medio. Transcurrido el tiempo se estimularon con el inhibidor UK5099 (*Sigma Aldrich, USA*) a diferentes concentración y tiempos de cultivo, en paralelo se testó la posible toxicidad del dimetilsulfóxido (DMSO), ya que, el UK5099 se resuspende en este compuesto.

El diseño de la placa incluyó una recta de calibrado para poder establecer la relación entre la absorbancia (abs) y el número de células, así como, un blanco (medio de cultivo sin células) para poder eliminar la abs debida al medio. El UK5099 se testó a las concentraciones de 2, 5, 10, 15, 20 y 40  $\mu\text{M}$  durante 3 h, 24 h y 48 h. Concluidos los tiempos de incubación a testar se añadió el reactivo y se incubó durante 3 h antes de su lectura a 490 nanómetros (nm) en el lector de placas *Infinite<sup>®</sup> 200 NanoQuant (Tecan, Suíza)*.

Cada condición y su medida se realizaron por triplicado. En las gráficas se representó el número de células viables en cada condición partiendo de las  $6 \times 10^3$  de la condición basal (0  $\mu\text{M}$ ). En los casos en los que fue necesario los resultados se expresaron en porcentaje de viabilidad relativa a la condición basal (0  $\mu\text{M}$ ), que se estableció en 100, se representa la media de 3 medidas por condición.

### 3. ESTRÉS OXIDATIVO

La producción de ROS nos permite estudiar el efecto que tiene el UK5099 sobre el estrés oxidativo celular. Se midió por citometría de flujo utilizando el fluoróforo *Mitosox<sup>TM</sup>Red* (*Thermo Fisher Scientific, USA*).

Este fluoróforo se dirige a la mitocondria de las células vivas y se oxida por efecto del anión superóxido y el producto oxidado es fluorescente y cuantificable por citometría de flujo.

Para llevar a cabo la cuantificación de ROS se emplearon placas de multipocillo de 6 (MW6) sembrando  $8 \times 10^4$  células/pocillo en DMEM al 10% SBF en medios con 1 g/l y de 4.5 g/l de glucosa y se incuban a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> con humedad a saturación durante 24 h.

Transcurrido el tiempo se depleciona el medio con SBF al 0.5% y se incubaron toda la noche. Transcurrido este tiempo se cambia el medio a 0% SBF y se estimula con UK5099 de 2 µM, 5 µM y 10 µM.

Después de 3 h de incubación se añade el fluoróforo *Mitosox<sup>MT</sup> Red* a 5 µM en *Hank's Buffered Salt Solution* (*Thermo Fisher Scientific, USA*) y las células se incuban a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> y humedad a saturación, en oscuridad. A los 30 minutos (min) se recogen las células por tripsinización. Finalmente se centrifugan y se resuspenden en solución salina, para proceder a su cuantificación por citometría de flujo.

La lectura de la emisión de fluorescencia se analiza en el canal FL-2 en un total de  $1 \times 10^4$  células por muestra y la intensidad de la fluorescencia observada se correlaciona directamente con los niveles de anión superóxido presente en las células. Los datos se analizan con el *software* BD CellQuest<sup>TM</sup> Pro (Becton Dickinson).

## 4. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA

Para valorar la importancia del UK5099 en el metabolismo de la glucosa y su posible efecto en el proceso artrósico se analizó la expresión de genes vinculados con el metabolismo, degradación de la MEC e inflamación celular.

Las células se sembraron en MW6 a razón de  $8 \times 10^4$  células/pocillo, en DMEM con 1 g/l y 4.5 g/l de glucosa suplementado con 10% SBF y se incubaron a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> y humedad a saturación 24 h.

Transcurrido este tiempo se deplecionó el medio con 0.5% SBF y las células se incubaron toda la noche. Tras este tiempo se cambió el medio a 0% SBF y se estimuló con UK5099 de 2 µM, 5 µM y 10 µM durante 24 h.

### 4.1. Extracción de ácido ribonucleico (ARN)

La extracción de ARN total se llevó a cabo con el reactivo *Trizol® Reagent* (*Thermo Fisher Scientific, USA*) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Este reactivo es una solución monofásica de fenol e isocianato de guanidina que provoca la lisis celular mientras protege la integridad del ARN. Cuando se añadió cloroformo al lisado celular se provocó la separación de una fase acuosa, en la que se encuentra el ARN, de una fase orgánica. La fase acuosa se recuperó y se provocó la precipitación del ARN mediante una incubación con isopropanol. Por último, el precipitado de ARN se lavó con etanol al 75% y se dejó secar para resuspenderlo posteriormente en agua libre de ARNasa.

Una vez obtenido el ARN se cuantificó por espectrofotometría en el *Nanodrop ND-1000* (*Thermo Fisher Scientific, USA*) a 260 nm. La pureza del ARN se determinó a partir del ratio entre la abs a 260 nm y 280 nm ( $A_{260/280}$ ), que debe de ser próximo a 2. Ratios menores son indicativos de contaminación del ARN con proteínas, compuestos

fenólicos u otros contaminantes que absorben a 280 nm. Un segundo indicador de pureza del ARN lo constituye el ratio  $A_{260/230}$ , que debe de ser ligeramente superior al anterior (2.0-2.2), considerándose los ratios por debajo de estos valores indicativos de contaminación por compuestos que absorben a 230 nm, típicamente fenoles u otros compuestos orgánicos provenientes de la extracción.

#### **4.2. Retrotranscripción de ARN mensajero (ARNm) a ADN complementario (ADNc)**

Se utilizó el kit *NZY First-Strand cDNA Synthesis Kit* (NZYtech, Portugal) para la síntesis de ADNc partiendo de muestras de ARN.

Los cebadores *oligo(dT)* y los *random hexamers* están incluidos en la *NZYRT 2x Master Mix*, la cual además contiene los desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTPs), el Cloruro de Magnesio ( $MgCl_2$ ), así como el *Buffer* específico de la retrotranscriptasa (*NZY Reverse Transcriptase, Rnase H minus*). El mix de enzimas del kit incluye además un inhibidor de ribonucleasa para proteger al ARN de la degradación.

Siguiendo las recomendaciones del fabricante se hizo la mezcla de *NZYRT 2x Master Mix*, *NZYRT Enzyme Mix*, el volúmen correspondiente a 250 ng de ARN, completando la mezcla hasta un volúmen final de 10  $\mu$ l. La mezcla se incubó a 25 °C durante 10 min, 50 °C 30 min y 85 °C durante 5 min en el termociclador. Tras la retrotranscripción, se incubó la mezcla con 1  $\mu$ l de *NZY RNase H* a 37°C durante 20 min para eliminar restos de ARN no retrotranscrito que pueda interferir en la posterior amplificación del ADNc.



#### 4.3. Reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real (PCR-TR)

Partiendo del ADNc que se obtuvo de cada muestra se estudió la expresión génica realizando una PCR-TR.

La PCR-TR permite detectar y amplificar al mismo tiempo, correlacionando el producto de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de cada ciclo con una señal de intensidad de fluorescencia. La reacción se llevó a cabo con sondas *Taqman® Universal Probe Library (UPL)* (Roche Diagnostics, Suíza). Están constituidas por oligonucleótidos de unas 20 bases específicas para la secuencia del gen de interés y marcadas con 2 fluoróforos, un apagador unido al extremo 3' y un donador en el extremo 5'. La distancia entre los fluoróforos corresponde con la longitud de la sonda. Debido al fenómeno conocido como *Fluorescence Resonance Energy Transfer*, el aceptor apaga la fluorescencia del reportero. Los nucleótidos de la sonda son cortados por la actividad exonucleasa de la ADN polimerasa durante la amplificación, de este modo, se separan los fluoróforos y se puede detectar la señal de fluorescencia debido a que el apagador no inhibe al reportero, es decir, la hidrólisis de la sonda provoca un incremento en la señal del reportero y ésta aumenta proporcionalmente al incremento del amplicón.

Tanto la amplificación como la detección de fluorescencia se realizaron en el *LightCycler®480II* (Roche Diagnostics, Suíza).

Para su reacción se añadió la muestra de ADNc (2.5 µl) y la mezcla de reacción según se describe en la **Tabla I**, completando con agua hasta un volumen final de reacción de 10 µl.

**Tabla I.** Componentes de la mezcla de reacción para la PCR-TR.

	Concentración final
<i>LightCycler®480 Probes Master 2x</i> (ADN polimerasa FastStart Taq.+ solución tampón de reacción + dNTPs + MgCl <sub>2</sub> )	1x
<i>Cebador sentido 20 μM</i>	700 nM
<i>Cebador antisentido 20 μM</i>	700 nM
<i>Sonda Taqman® UPL 10 μM</i>	100 nM

Posteriormente, se realizó la PCR-TR según el protocolo de amplificación, común para los 5 genes analizados (**Tabla II**).

**Tabla II.** Protocolo de amplificación utilizado en la PCR-TR.

	Ciclos	Temperatura	Tiempo
Pre-incubación	1	95°C	10 minutos
Amplificación	45	95°C (desnaturalización)	10 segundos
		60°C (anillamiento)	30 segundos
		72°C (extensión)	1 segundo
Enfriamiento	1	40°C	30 segundos

La relación de genes analizados aparecen reflejados en la **Tabla III**, así como, sus cebadores y sondas UPL respectivas. Para la elección del gen de referencia óptimo, se analizaron tres posibles candidatos de los cuales se realizó la amplificación en cada una de las muestras para realizar un posterior análisis.

De inició se realizó un análisis para la elección del gen de referencia idóneo para todas las condiciones utilizadas en el ensayo. Para ello se amplificaron en cada una de las muestras los siguientes genes como posibles candidatos: proteína ribosómica L13a (*RPL13a*), hipoxantina guanina fosforribosil transferasa (*HPRT*) y la β-microglobulina (*B2M*). Los resultados se analizaron con el algoritmo *GeNorm*, incluido en el paquete *qBase+* (*Biogazelle*, Bélgica).

Cada muestra se amplificó por duplicado y cada condición se realizó por triplicado expresando los resultados finales como ratio de incremento respecto a la condición basal (normalizado a 1).

**Tabla III.** Secuencias de los cebadores empleados para la amplificación por PCR-TR de los genes de interés *SLC2A1*, *HK2*, *MMP3*, *MMP13* e *IL1 $\beta$* , así como, los 3 genes de referencia utilizados. También se reflejan las sondas UPL correspondientes.

Función	Gen	Proteína	C.SENTIDO (5' - 3') C. ANTISENIDO (5' - 3')	SONDA UPL
Metabolismo	<i>SLC2A1</i>	<i>Transportador de glucosa 1</i>	GGGTGTGGTTAATACTATCTTCACTG	≠ 81
			TCATATGCAGAGTCCTTCTTCCT	
	<i>HK2</i>	<i>Hexoquinasa 2</i>	AGAAGCTCCCACCTGGGTTTT	≠ 87
			CATGAGACCAGGAACTCTCG	
Degradación de MEC	<i>MMP3</i>	<i>Metaloproteasa de matriz 3</i>	CAAAACATATTTCTTTGTAGAGGACAA	≠ 36
			TTCAGCTATTTGCTTGGGAAA	
	<i>MMP13</i>	<i>Metaloproteasa de matriz 13</i>	CCAGTCTCCGAGGAGAAACA	≠ 73
			AAAAACAGCTCCGCATCAAC	
Inflamación	<i>IL1<math>\beta</math></i>	<i>Interleuquina 1</i>	TACCTGTCTGCGTGTTGAA	≠ 78
			TCTTTGGGTAATTTTGGGATCT	
Genes de Referencia	<i>B2M</i>	<i><math>\beta</math>-Microglobulina</i>	TTCTGGCCTGGAGGCTATC	≠ 42
			TCAGGAAATTTGACTTTCCATTC	
	<i>RPL13A</i>	<i>Proteína Ribosómica L13a</i>	CAAGCGGATGAACACCAAC	≠ 28
			TGTGGGGCAGCATACCTC	
	<i>HPRT</i>	<i>Hipoxantina guanina fosforribosil transferasa</i>	TGACCTTGATTTATTTGCATACC	≠ 22
			CGAGCAAGACGTTCACTCCT	

#### 4.4. Análisis estadístico

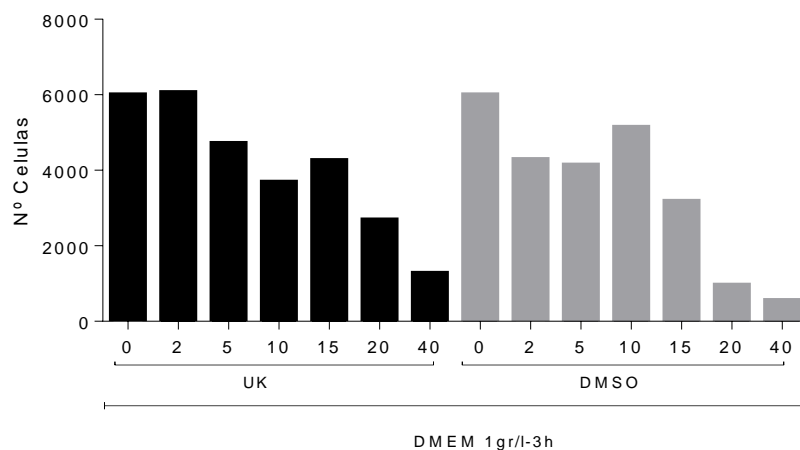
El análisis estadístico entre los grupos se llevó a cabo con el test no paramétrico de Mann-Whitney utilizando el programa GraphPad Prism v6 (GraphPad, La Jolla California USA, [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com)). Los resultados se expresan como la media  $\pm$  desviación estándar (DE) y los valores de  $p \leq 0.05$  fueron considerados estadísticamente significativos.

## RESULTADOS

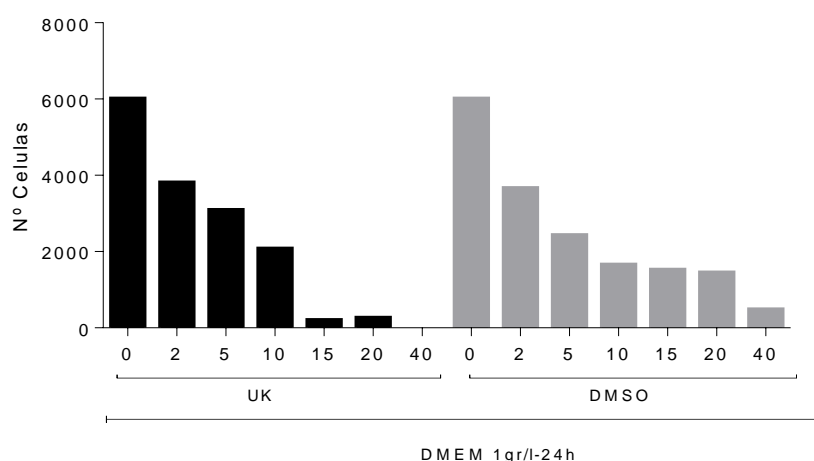
### 1. ENSAYO DE VIABILIDAD CELULAR

Los efectos de las diferentes concentraciones del inhibidor UK5099 sobre la línea celular de condrocitos T/C-28a2 fueron evaluados con el kit *CellTiter 96® Aqueous Non-Radiactive Cell Proliferation Assay*.

Para determinar si el vehículo del UK5099 (DMSO) afectaba o no a la viabilidad celular, en primer lugar testamos su efecto sobre las células en paralelo con el UK5099 durante 3, 24 y 48 h. El análisis de los datos nos permitió determinar que el DMSO no afecta de manera significativa a la viabilidad celular ni a las 3h (**Figura 4**) ni a las 24h (**Figura 5**).

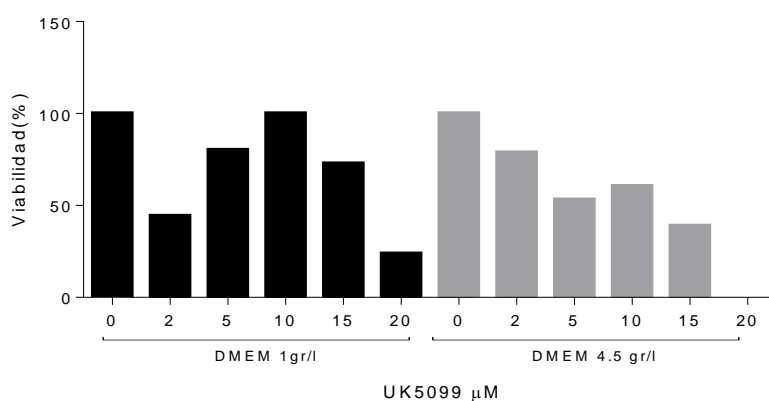


**Figura 4.** Cuantificación de los efectos de concentraciones de UK5099 y DMSO sobre la viabilidad celular a las 3 h expresado en número (Nº) de células. Los valores se expresan con relación a la condición basal (0  $\mu$ M). Se representa una media de 3 medidas por condición.



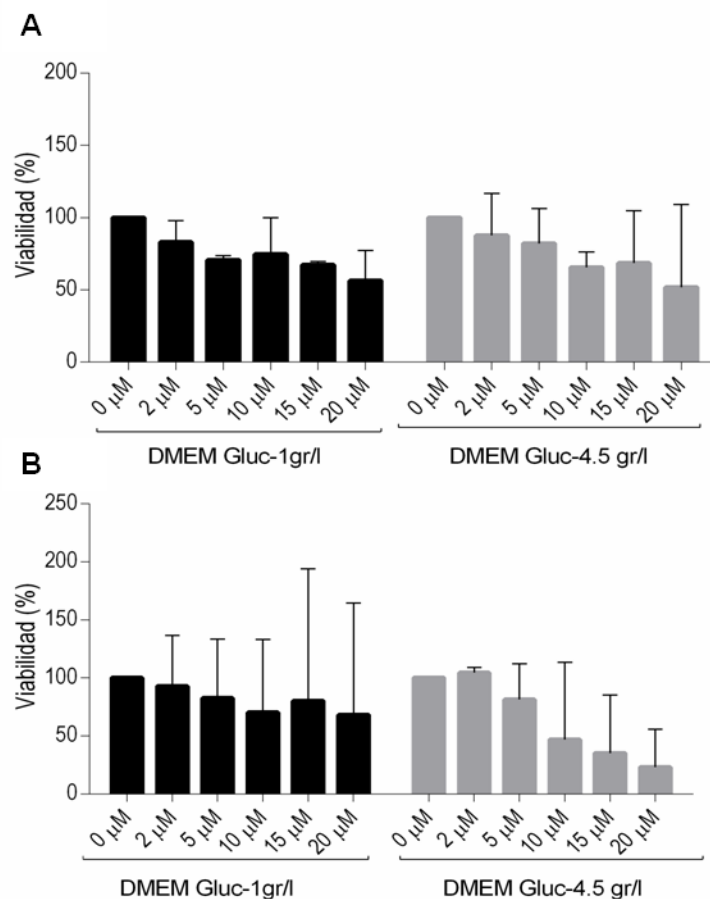
**Figura 5.** Cuantificación de los efectos de concentraciones de UK5099 y DMSO sobre la viabilidad celular a las 24 h expresado en número (Nº) de células. Los valores se expresan con relación a la condición basal (0 µM). Se representa una media de 3 medidas por condición.

Como se describe en el apartado de material y métodos, se testó la viabilidad de las células tras incubarlo a diferentes concentraciones de UK5099 a tres tiempos de incubación (3, 24 y 48h). El análisis de los datos obtenidos a las 48h muestran que hay una gran disminución de la viabilidad, frente a la respuesta al UK5099, por lo que este tiempo de incubación se descartó para los siguientes experimentos (**Figura 6**).



**Figura 6.** Efectos de las concentraciones de UK5099 (5, 10, 15 y 20 µM) sobre la viabilidad en medio DMEM de 1 g/l y 4.5 g/l de glucosa tras 48 h. Se representan los datos como un porcentaje (%) de viabilidad frente a las células sin tratar (0 µM), se muestra una media de 3 medidas por condición.

El análisis de la viabilidad de las T/C-28a2 tras la incubación en presencia de UK5099 a las 5 concentraciones testadas (2, 5, 10, 15 y 20  $\mu\text{M}$ ) reflejó que las concentraciones inferiores a 10  $\mu\text{M}$  fueron las que mostraron una mayor viabilidad a las 3h (**Figura 7A**) y a las 24h (**Figura 7B**) tanto en las células crecidas en DMEM con 1 g/l de glucosa como con 4.5 g/l de glucosa. La viabilidad celular a concentración de 10  $\mu\text{M}$  tras 24h de incubación mostró un descenso frente a la condición basal (0  $\mu\text{M}$ ) más drástico al realizar el experimento en medio estándar de cultivo (4.5 g/l) (**Figura 7B**).



**Figura 7.** Efecto de las concentraciones del UK5099 sobre la viabilidad celular de las T/C-28a2, crecidas en medio de cultivo (DMEM) suplementado con glucosa a 1 g/l (barras negras) o a 4.5 g/l (barras grises) durante un tiempo de incubación de 3 h (**A**) y de 24h (**B**). Se representan los valores en % de viabilidad frente a la condición basal (0 $\mu\text{M}$ ). Se muestra una media de 2 experimentos realizados por triplicado  $\pm$  DE.

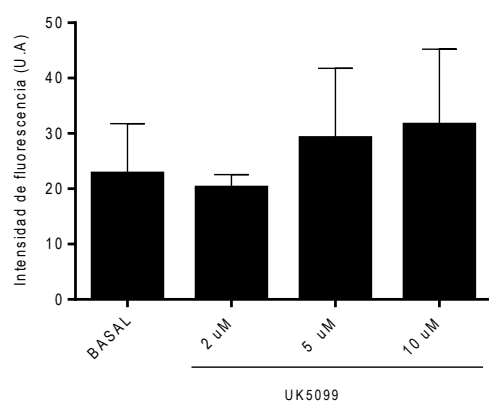
En base a los datos obtenidos decidimos realizar los experimentos a 2  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$  y 10  $\mu\text{M}$  ya que estas concentraciones mostraron una viabilidad similar en ambos medios de cultivo y tiempos analizados.

## 2. EFECTOS DEL UK5099 SOBRE EL ESTRÉS OXIDATIVO CELULAR

La producción de ROS se evaluó cuantificando los niveles de producción de  $\text{O}_2^-$  mitocondrial por citometría de flujo utilizando el fluoróforo *Mitosox<sup>TM</sup> Red*.

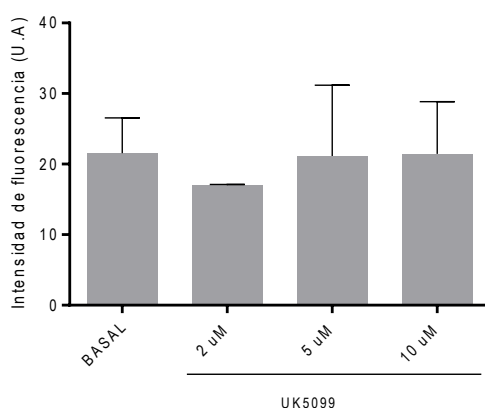
Para evaluar los niveles de  $\text{O}_2^-$  se usaron las concentraciones que mostraron los menores efectos sobre la viabilidad celular (2, 5 y 10  $\mu\text{M}$ ), incubando las células en su presencia durante 3h.

El análisis de los niveles de producción de  $\text{O}_2^-$  tras crecer las células en DMEM con 1 g/l mostró una ligera disminución al incubar las células con UK5099 a 2 $\mu\text{M}$  (20.17 $\pm$ 2.37) al compararlo con las células sin inhibidor (Basal; 22.71 $\pm$ 9.07) en DMEM con 1 g/l de glucosa. A medida que se aumentó la concentración del inhibidor del transportador de piruvato mitocondrial se observó un aumento en los niveles de producción del anión superóxido, sin ser significativo en ningún caso [5  $\mu\text{M}$  (29.139 $\pm$ 12.617), 10  $\mu\text{M}$  (31.55 $\pm$ 13.678)] (**Figura 8**).



**Figura 8.** Evaluación de la producción de  $O_2^-$  tras incubar las células durante 3 h en presencia de UK5099 (2  $\mu$ M, 5  $\mu$ M y 10  $\mu$ M) en medio DMEM de 1 g/l de glucosa. Basal; células sin inhibidor. Se representa la media de 3 experimentos realizados por duplicado  $\pm$  DE de la intensidad de fluorescencia.

Los experimentos llevados a cabo creciendo las células en DMEM con 4.5 g/l de glucosa al incubar con 2  $\mu$ M de UK5099 muestran un descenso en los niveles de producción de ROS. Del mismo modo, al incubar las células a concentraciones de 5  $\mu$ M (21.145 $\pm$ 10.043) y 10  $\mu$ M (21.46 $\pm$ 7.39) la producción de  $O_2^-$  se incrementa ligeramente mostrando valores muy similares a la condición basal (células sin tratar)(**Figura 9**).



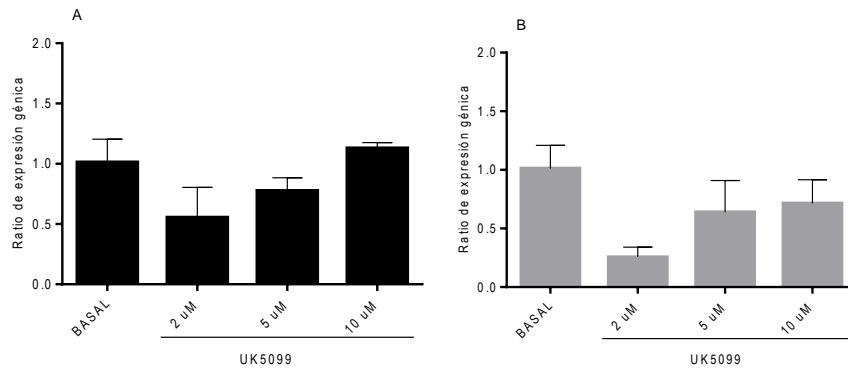
**Figura 9.** Evaluación de la producción de  $O_2^-$  tras incubar las células durante 3 h en presencia de UK5099 (2  $\mu$ M, 5  $\mu$ M y 10  $\mu$ M) en medio DMEM con 4.5 g/l de glucosa. Basal: células sin inhibidor. Se representa la media de 3 experimentos realizados por duplicado  $\pm$  DE de la intensidad de fluorescencia.



### 3. EXPRESIÓN DE GENES IMPLICADOS EN EL METABOLISMO DE LA GLUCOSA Y DE LA ARTROSIS

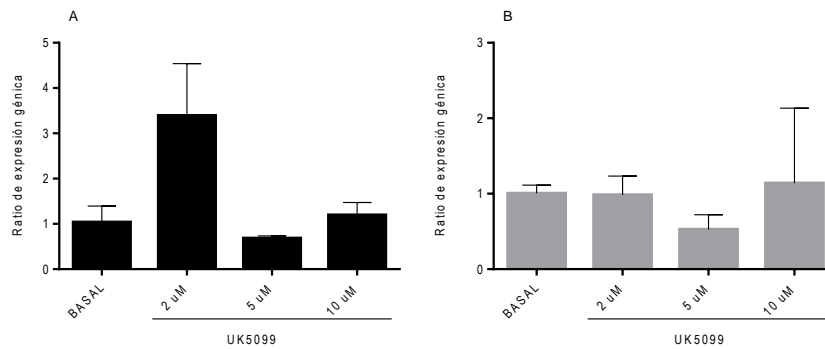
Para determinar el papel que juega la inhibición de la oxidación mitocondrial de la glucosa en el condrocito, se analizó la expresión de genes relacionados tanto con el metabolismo de la glucosa (*SLC2A1* y *HK2*) como con el proceso artrósico (*MMP3*, *MMP13*, *IL1 $\beta$* ). Tras incubar durante 24 h con las distintas concentraciones de UK5099, se recogieron las células para la extracción de ARN, y posterior obtención y amplificación del ADNc por PCR cuantitativa.

Los resultados de expresión génica de *SLC2A1*, uno de los principales transportadores de glucosa en la membrana de los condrocitos, se muestran en la **Figura 10**. En el caso de los condrocitos incubados con 1 g/l de glucosa, se observó una disminución de la expresión de este gen tanto tras el estímulo a una concentración de 2  $\mu$ M ( $0.55\pm 0.25$ ) como a 5  $\mu$ M ( $0.78\pm 0.11$ ) de UK5099, sin ser estas diferencias estadísticamente significativas (**Figura 10A**). La misma tendencia sin significación estadística se observó en los condrocitos incubados con 4.5 g/l de glucosa, siendo esta disminución más notable para la concentración de 2  $\mu$ M ( $0.26\pm 0.08$ ) que en la caso de 5  $\mu$ M ( $0.64\pm 0.27$ ) y 10  $\mu$ M ( $0.71\pm 0.20$ ) (**Figura 10B**).



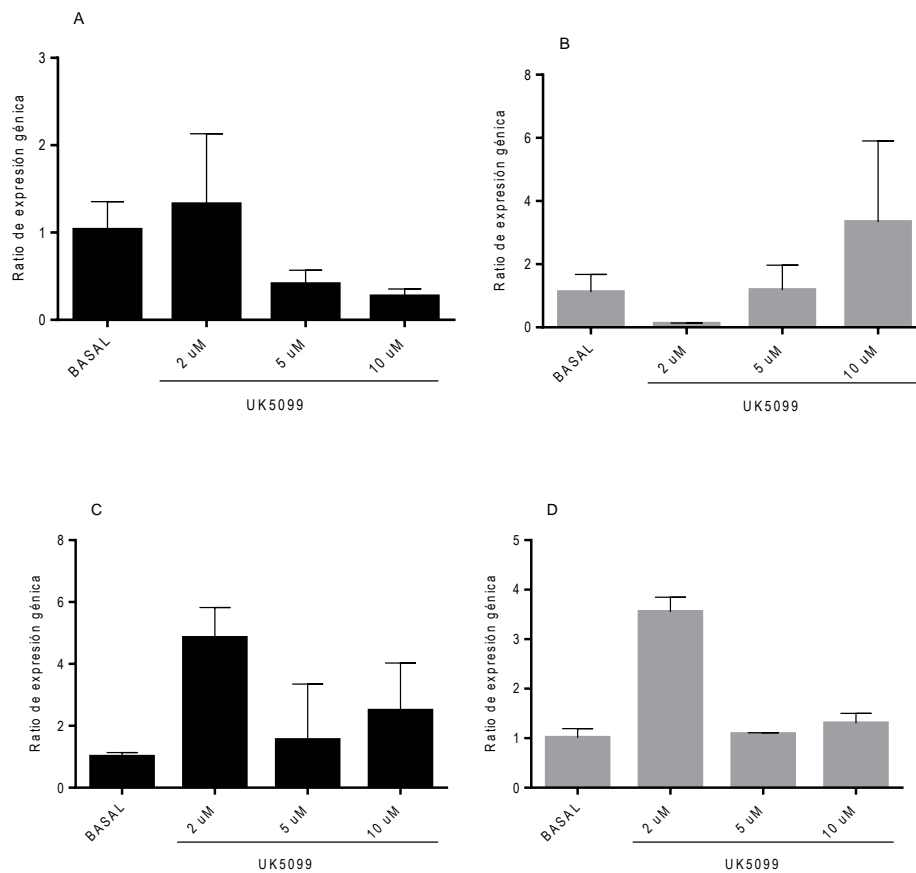
**Figura 10.** Expresión génica del transportador de glucosa en la membrana de los condrocitos *SLC2A1* en los condrocitos incubados con DMEM con 1 g/l de glucosa **(A)** y 4.5 g/l **(B)**, tras estimular con distintas concentraciones del inhibidor UK5099. Los resultados se expresan en ratio en relación a la condición basal. Los datos se representan como la media  $\pm$  DE.

La *HK2* es la primera enzima que actúa en la vía glucolítica, fosforilando la glucosa evitando así que vuelva a difundir fuera de la célula y pueda así la glucosa ser metabolizada. Los resultados mostraron tendencias distintas dependiendo del contenido en glucosa del medio de incubación de los condrocitos. Así en los incubados con niveles más bajos de glucosa, tras el estímulo de 2  $\mu$ M de UK5099 se produjo un aumento de la expresión de *HK2* ( $3.39 \pm 1.15$ ), aunque no estadísticamente significativo, sin encontrar diferencias en las demás concentraciones testadas (**Figura 11A**). En los condrocitos incubados con niveles mayores de glucosa no se encontraron diferencias en la expresión génica de esta proteína en relación a la condición basal (**Figura 11B**).



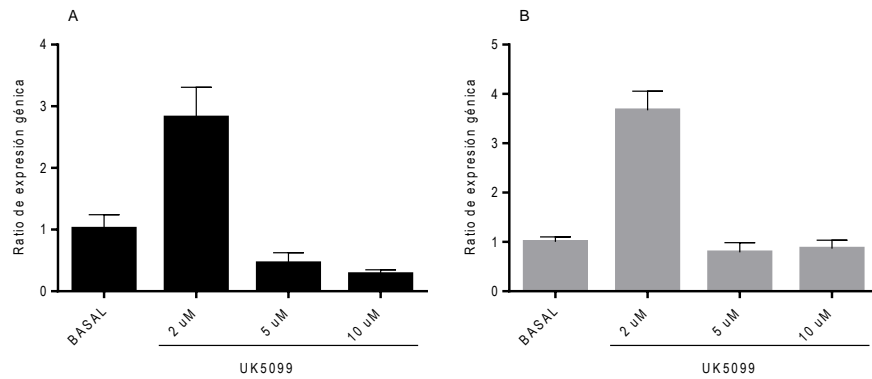
**Figura 11.** Expresión génica de la *HK2* en los condrocitos incubados con DMEM con 1 g/l de glucosa **(A)** y 4.5 g/l **(B)**, tras estimular con distintas concentraciones del inhibidor UK5099. Los resultados se expresan en ratio en relación a la condición basal. Los datos se representan como la media  $\pm$  DE.

Para estudiar si el bloqueo de esta vía metabólica podría influir en el proceso artrósico, se estudió la expresión génica de dos metaloproteasas, *MMP3*, capaz de degradar casi cualquier componente de la MEC, y la *MMP13* implicada en la degradación de colágeno I, II y III **(Figura 12)**. Los resultados mostraron que la *MMP3* sufre incluso disminución de la expresión, aunque no significativa, sobre todo tras el estímulo con 5  $\mu$ M ( $0.41 \pm 0.16$ ) y 10  $\mu$ M ( $0.27 \pm 0.09$ ) de UK5099 cuando los condrocitos se incuban en medio con 1 g/l de glucosa **(Figura 12A)**. Observando este mismo efecto pero cuando los condrocitos se estimularon con 2  $\mu$ M ( $0.12 \pm 0.02$ ) cuando la incubación fue en medio con 4.5 g/l de glucosa **(Figura 12B)**. En el caso de la *MMP13*, se observó una sobreexpresión de esta enzima únicamente tras el estímulo con 2  $\mu$ M de UK5099 tanto si los condrocitos eran incubados con niveles de 1g/l de glucosa ( $4.84 \pm 0.98$ ) **(Figura 12C)** como si se incubaban con niveles de 4.5 g/l ( $2.55 \pm 0.30$ ) **(Figura 12D)**, diferencias que no alcanzaron la significación estadística.



**Figura 12.** Expresión génica de *MMP3* (A, B) y *MMP13* (C,D) en los condrocitos incubados con DMEM con 1 g/l de glucosa (A y C) y 4.5 g/l (B,D), tras estimular con distintas concentraciones del inhibidor UK5099. Los resultados se expresan en ratio en relación a la condición basal. Los datos se expresan como la media  $\pm$  DE.

Otro de los procesos importantes en el desarrollo de la artrosis, es la inflamación. Por ello en el presente trabajo se analizó la expresión génica de la *IL1 $\beta$* , una de las citoquinas secretadas por el condrocito e implicada en la degradación del cartílago articular. Los resultados mostrados en la **Figura 13**, indican un aumento, aunque no estadísticamente significativo, de la expresión de esta citoquina tras el estímulo con 2  $\mu$ M de UK5099 tanto para los condrocitos incubados con niveles de glucosa de 1 g/l ( $2.82 \pm 0.49$ ) (**Figura 13A**) como los incubados con 4.5 g/l ( $3.67 \pm 0.39$ ) (**Figura 13B**).



**Figura 13.** Expresión génica de *IL1β* en los condrocitos incubados con DMEM con 1 g/l de glucosa **(A)** y 4.5 g/l **(B)**, tras estimular con distintas concentraciones del inhibidor UK5099. Los resultados se expresan en ratio en relación a la condición basal. Los datos se representan como la media  $\pm$  DE.

## DISCUSIÓN

La OA es una enfermedad degenerativa, caracterizada por el estrés oxidativo celular y la degradación de la MEC del cartílago articular<sup>1</sup>. Los condrocitos, único tipo celular de este tejido, viven en un ambiente hipóxico con lo que su vía metabólica principal es la glucólisis anaerobia<sup>9</sup>. Pero se ha comprobado que ante situaciones de estrés estas células recurren a la vía oxidativa mitocondrial donde acoplan la CTE y la OXPHOS para conseguir hasta un 25% del ATP total<sup>12</sup>.

En este estudio se investigó cuales podían ser los efectos del bloqueo de la vía aerobia en un modelo celular *in vitro* de condrocitos humanos, la línea celular T/C-28a2. Para ello, se utilizó UK5099, un inhibidor del MPC y se valoraron sus efectos sobre los condrocitos.

Como primer objetivo, se estudió el efecto del inhibidor UK5099 sobre la viabilidad celular con el objetivo de escoger la concentración y el tiempo más adecuado para realizar los experimentos. Tras la revisión bibliográfica se observó que el rango utilizado de concentración de UK5099 en otros estudios, es muy amplio, utilizando concentraciones hasta 150  $\mu\text{M}$ <sup>23</sup>. En el presente trabajo, se observó como la viabilidad descendía a concentraciones de UK5099 elevadas y los tiempos más largos de incubación, por lo que se escogieron las concentraciones más bajas con viabilidad similar a la condición basal, que concuerda con la utilizada en otros estudios también en modelo celular *in vitro* de células renales cancerígenas<sup>24</sup>.

Una de las características observadas tras el bloqueo de MPC en estudios realizados en otros tipos celulares, es el aumento de la producción de ROS<sup>25,26</sup>. Teniendo en cuenta que el estrés oxidativo es otro de los mecanismos moleculares que participan en el proceso artrósico<sup>27,28</sup>, en este estudio se midió la producción de  $\text{O}_2^-$  mitocondrial.

Los resultados obtenidos mostraron que la exposición a una baja concentración de UK5099 no incrementa la producción de  $\text{O}_2^-$  pero al aumentar su concentración si se observa un ligero incremento de ROS,

sin ser significativo. Estos resultados mostraron la misma tendencia tanto en los condrocitos incubados en niveles más bajos de glucosa (1 g/l) como en niveles mayores (4.5 g/l). Los estudios revisados en los que miden la producción de ROS tras el bloqueo de MPC, sí muestran un aumento significativo de estas especies reactivas<sup>25,26</sup>. La explicación a esta discrepancia podemos encontrarla en que en este trabajo se mide el  $O_2^-$  mitocondrial mientras que en los otros autores miden ROS con 2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato (DCFH-DA), con el que se miden ROS citoplasmáticos, además de la posible influencia de los tiempos de incubación utilizados en cada caso.

Por otro lado, en estos estudios, el aumento de la producción de ROS se asocia con el aumento de la glucólisis anaerobia tras la inhibición de la glucólisis aerobia mitocondrial. En el presente trabajo se quiso hacer una medida indirecta de este efecto analizando la expresión génica de uno de los principales transportadores de glucosa (*SLC2A1*) en la membrana del condrocito y de una de las principales enzimas reguladoras de la glucólisis anaerobia, *HK2*. En los condrocitos incubados con niveles fisiológicos de glucosa (1 g/l) se muestra un claro aumento de la expresión de *HK2* que podría indicar el intento de compensar el déficit de ATP tras la inhibición de la oxidación mitocondrial de la glucosa, aumentando su degradación citoplasmática, vía menos energéticamente eficiente. Para corroborar esta hipótesis convendría hacer una medida de la producción de ácido láctico celular, producto final de la transformación del piruvato, tal y como afirman en los trabajos anteriormente referenciados<sup>25,26</sup>.

En relación al posible efecto de la inhibición de la oxidación mitocondrial de la glucosa sobre la patología artrósica, se observó que tras la incubación de los condrocitos con el inhibidor, no se aprecian diferencias para ninguna de las dos concentraciones de glucosa, en la expresión de *MMP3*, enzima no detectada en cartílagos sanos y capaz de degradar casi cualquier componente de la MEC<sup>27</sup>. Sin embargo, sí se observó en ambas condiciones de azúcar, un aumento de la expresión tras el

estímulo con 2  $\mu$ M de UK5099, de *MMP13*, capaz de degradar el colágeno mayoritario en la MEC del cartílago articular, el colágeno II, así como los colágenos I y III<sup>27</sup>. Otro de los procesos altamente implicados en la patología artrósica es la inflamación, y por lo observado en los resultados de este estudio, para cualquiera de las dos condiciones de glucosa utilizadas para la incubación, se vió que tras la inhibición con 2  $\mu$ M de UK5099, se produjo un aumento de la expresión de *IL1 $\beta$* , una de las principales citoquinas implicadas en el proceso artrósico<sup>7</sup>.

En el análisis global de este trabajo, se encuentran ciertas limitaciones a tener en cuenta para futuros estudios en esta línea. La más importante y la que puede explicar las diferencias en relación a los estudios realizados en otros tipos celulares es que en nuestro trabajo el DMEM utilizado para la incubación de los condrocitos contiene 1 mM de piruvato sódico, que puede ser el motivo de que no se observasen las diferencias esperadas de forma significativa.



## CONCLUSIONES

1. La incubación de la línea celular T/C-28a2 crecida en DMEM con 1 g/l como en 4.5 g/l de glucosa, a niveles crecientes del inhibidor UK5099 disminuye la viabilidad celular (%). Seleccionando las concentraciones de 2  $\mu$ M, 5  $\mu$ M y 10  $\mu$ M para utilizar en experimentos posteriores.
2. La incubación de las células en medios con diferentes concentraciones de glucosa y estimulando con UK5099 (a 2  $\mu$ M) se observa un descenso en los niveles de  $O_2^-$ , pero a medida que elevamos su concentración (5  $\mu$ M y 10  $\mu$ M), los niveles de ROS se incrementan o se restauran a los niveles basales en el caso de 4.5 g/l de glucosa.
3. Los niveles de expresión de los genes *SLC2A1* y *MMP3* disminuyen ante un estímulo con UK5099 mientras que los genes *MMP13* e *IL1 $\beta$*  se incrementan. El gen *HK2* sufre un aumento de expresión cuando el medio de cultivo contiene baja concentración de glucosa y se mantiene constante cuando el medio contiene 4.5 g/l de glucosa.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Kraus, V. B., Blanco, F. J., Englund, M., Karsdal, M. A. & Lohmander, L. S. Call for standardized definitions of osteoarthritis and risk stratification for clinical trials and clinical use. *Osteoarthritis and Cartilage* (2015). doi:10.1016/j.joca.2015.03.036
2. Aigner, T., Söder, S., Gebhard, P. M., McAlinden, A. & Haag, J. Mechanisms of Disease: Role of chondrocytes in the pathogenesis of osteoarthritis - Structure, chaos and senescence. *Nature Clinical Practice Rheumatology* **3**, 391–399 (2007).
3. Blanco, F. J. & Rego-Pérez, I. Editorial: Is it time for epigenetics in osteoarthritis? *Arthritis Rheumatol. (Hoboken, N.J.)* **66**, 2324–7 (2014).
4. Poole, A. R. *et al.* Composition and structure of articular cartilage: a template for tissue repair. *Clin. Orthop. Relat. Res.* S26-33 (2001).
5. Dijkgraaf, L. C., de Bont, L. G., Boering, G. & Liem, R. S. The structure, biochemistry, and metabolism of osteoarthritic cartilage: a review of the literature. *J. Oral Maxillofac. Surg.* **53**, 1182–92 (1995).
6. Goldring SR GM. Biology of the normal joint. In: Firestein GS B, RC, Harris ED Jr., McInnes IB, Ruddy S SJK, editors. *Textbook of Rheumatology*. 8 Ed. Elsevier; 2008. p. 1–22.
7. Blanco Garcia, F. J. Catabolic events in osteoarthritic cartilage. *Osteoarthr. Cartil.* **7**, 308–309 (1999).
8. Blanco, F. J., López-Armada, M. J. & Maneiro, E. Mitochondrial dysfunction in osteoarthritis. *Mitochondrion* **4**, 715–728 (2004).
9. Sampson, H. W. & Cannon, M. S. Zonal analysis of metabolic profiles of articular-epiphyseal cartilage chondrocytes: a histochemical study. *Histochem. J.* **18**, 233–8 (1986).
10. Mueller, E. E. *et al.* Functional differences between mitochondrial haplogroup T and haplogroup H in HEK293 cybrid cells. *PLoS One* **7**, e52367 (2012).

11. Murphy, M. P. How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem. J.* **417**, 1–13 (2009).
12. Gavriilidis, C., Miwa, S., Von Zglinicki, T., Taylor, R. W. & Young, D. A. Mitochondrial dysfunction in osteoarthritis is associated with down-regulation of superoxide dismutase 2. *Arthritis Rheum.* **65**, 378–387 (2013).
13. Reed, K. N., Wilson, G., Pearsall, A. & Grishko, V. I. The role of mitochondrial reactive oxygen species in cartilage matrix destruction. *Mol. Cell. Biochem.* **397**, 195–201 (2014).
14. Blanco, F. J., Rego, I. & Ruiz-Romero, C. The role of mitochondria in osteoarthritis. *Nature Reviews Rheumatology* **7**, 161–169 (2011).
15. Soto-Hermida, A. *et al.* mtDNA haplogroups and osteoarthritis in different geographic populations. *Mitochondrion* **15**, 18–23 (2014).
16. López de Figueroa, P., Lotz, M. K., Blanco, F. J. & Caramés, B. Autophagy activation and protection from mitochondrial dysfunction in human chondrocytes. *Arthritis Rheumatol. (Hoboken, N.J.)* **67**, 966–76 (2015).
17. Malik, D. *et al.* Human retinal transmitochondrial cybrids with J or H mtDNA haplogroups respond differently to ultraviolet radiation: implications for retinal diseases. *PLoS One* **9**, e99003 (2014).
18. Merriwether, D. A. *et al.* The structure of human mitochondrial DNA variation. *J. Mol. Evol.* **33**, 543–55 (1991).
19. Li, Y. *et al.* Mitochondrial pyruvate carrier function is negatively linked to Warburg phenotype in vitro and malignant features in esophageal squamous cell carcinomas. *Oncotarget* **8**, 1058–1073 (2017).
20. Patterson, J. N. *et al.* Mitochondrial metabolism of pyruvate is essential for regulating glucose-stimulated insulin secretion. *J. Biol. Chem.* **289**, 13335–46 (2014).
21. Vacanti, N. M. *et al.* Regulation of Substrate Utilization by the Mitochondrial Pyruvate Carrier. *Mol. Cell* **56**, 425–435 (2014).

22. Yang, C. *et al.* Glutamine oxidation maintains the TCA cycle and cell survival during impaired mitochondrial pyruvate transport. *Mol. Cell* **56**, 414–24 (2014).
23. Patterson, J. N. *et al.* Mitochondrial metabolism of pyruvate is essential for regulating glucose-stimulated insulin secretion. *J. Biol. Chem.* **289**, 13335–46 (2014).
24. Koh, E., Kim, Y. K., Shin, D. & Kim, K.-S. MPC1 is essential for PGC-1 $\alpha$ -induced mitochondrial respiration and biogenesis. *Biochem. J.* **475**, 1687–1699 (2018).
25. Zhong, Y. *et al.* Application of mitochondrial pyruvate carrier blocker UK5099 creates metabolic reprogram and greater stem-like properties in LnCap prostate cancer cells &lt;i>in vitro</i>. *Oncotarget* **6**, 37758–69 (2015).
26. Li, X. *et al.* Mitochondrial pyruvate carrier function determines cell stemness and metabolic reprogramming in cancer cells. *Oncotarget* **8**, 46363–46380 (2017).
27. Murphy, G. *et al.* Matrix metalloproteinases in arthritic disease. *Arthritis Res.* **4 Suppl 3**, S39-49 (2002).