



Trabajo de Fin de Máster



Máster en Biología Molecular, Celular y Genética

PAPEL PROTECTOR DEL SULFURO DE HIDRÓGENO EN LA ARTROSIS ASOCIADA A LA DIABETES

THE PROTECTIVE ROLE OF HYDROGEN SULPHIDE IN DIABETES-ASSOCIATED
OSTEOARTHRITIS

PAPEL PROTECTOR DO SULFURO DE HIDRÓXENO NA ARTROSE ASOCIADA A
DIABETES

Marta Molinero García

Director:

Carlos Vaamonde García

Codirectora:

Rosa Meijide Failde

Tutor:

Francisco Javier Blanco García

A Coruña, junio 2020



El Dr. Carlos Vaamonde García, investigador del Instituto de Investigación Biomédica de A Coruña (INIBIC) del grupo de Reumatología y la Dra. Rosa Meijide Failde, Catedrática de Hidrología Médica de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad de la Coruña,

CERTIFICAN QUE

El presente Trabajo de Fin de Máster titulado "Papel protector del sulfuro de hidrógeno en la artrosis asociada a la diabetes" presentado por Marta Molinero García, ha sido realizado bajo su dirección y autorizan su presentación para que pueda ser juzgado por el tribunal correspondiente.

Y para que así conste, expiden y firman el presente informe en A Coruña, a 22 de junio de 2020.

VAAMOND
E GARCIA
CARLOS -
46911149
G

Firmado digitalmente por VAAMONDE GARCIA CARLOS - 46911149G
Fecha: 2020.06.22 12:58:32 +02'00'

Fdo: Carlos Vaamonde García

MEIJIDE
FAILDE ROSA
MARIA - DNI
76805335D

Firmado digitalmente por MEIJIDE FAILDE ROSA MARIA - DNI 76805335D
Fecha: 2020.06.22 13:10:32 +02'00'

Fdo: Rosa Meijide Failde

Fdo alumna: Marta Molinero García

ÍNDICE

RESUMEN /ABSTRACT / RESUMO	1
ANTECEDENTES.....	4
1. Diartrrosis o articulación sinovial.....	4
1.1. Membrana sinovial.....	4
1.2. Cartílago articular.....	5
2. Artrosis.....	6
2.1. Fisiopatología de la artrosis.....	6
2.2. Artrosis asociada a la diabetes mellitus tipo 2.....	8
3. Sulfuro de hidrógeno.....	9
3.1. Síntesis de H ₂ S.....	10
3.2. Funciones fisiológicas del H ₂ S.....	11
3.3. Señalización del H ₂ S.....	12
3.3.1. Eje Nrf-2/HO-1.....	12
3.3.2. NF-κB.....	13
3.4. Importancia del H ₂ S en la patogénesis de la artrosis y la diabetes.....	14
ESTADO ACTUAL DE LA CUESTIÓN.....	15
HIPÓTESIS	16
OBJETIVOS.....	16
METODOLOGÍA	17
1. Obtención de las muestras.....	17
2. Cuantificación de los niveles de H ₂ S en sangre.....	17
3. Cultivo celular.....	17
3.1. Aislamiento y cultivo primario de condrocitos.....	17
3.2. Línea celular de condrocitos.....	18
3.3. Estimulación celular.....	18
4. Detección de ERO mediante citometría de flujo.....	19
5. Silenciamiento génico por transfección de ARN pequeño de interferencia (ARNip).....	19
6. Análisis de la expresión génica.....	20
6.1. Extracción de ARN.....	20
6.2. Tratamiento con ADNasa y retrotranscripción.....	21
6.3. Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR).....	22
7. Análisis de la expresión proteica.....	22
7.1. Extracción de proteínas.....	22
7.2. Western blot.....	23
7.2.1. Electroforesis.....	23
7.2.2. Transferencia.....	24

7.2.3. Inmunodetección	25
8. Tag-switch.....	26
9. Ensayo de ELISA de PGE ₂ , IL-8 e IL-6.....	26
10. Inmunofluorescencia.....	27
11. Análisis estadístico.....	27
PLAN DE TRABAJO	27
CUESTIONES ÉTICAS.....	28
APLICABILIDAD	29
PLAN PARA LA DIFUSIÓN DE LOS RESULTADOS	30
RECURSOS NECESARIOS.....	30
1. Recursos disponibles, infraestructura y/o equipo singular.....	30
2. Presupuesto.....	31
2.1. Gastos de Personal.....	31
2.2. Gastos de Ejecución.....	32
2.2.1. Viajes y dietas.....	32
2.2.2. Otros gastos.....	32
2.2.3. Adquisición de inventariable.....	32
2.2.4. Fungibles y similares.....	33
2.3. Resumen del presupuesto (Costes Marginales).....	34
BIBLIOGRAFÍA.....	34
ANEXOS.....	39
ANEXO I. INFORMACIÓN PARA EL PACIENTE.....	39
ANEXO II - CONSENTIMIENTO INFORMADO DEL PACIENTE.....	42

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

ABS: Albúmina de suero bovino.

ADNasa: Desoxirribonucleasa.

ADNc: Ácido desoxirribonucleico complementario.

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

APS: Persulfato de amonio.

ARE: Elementos de respuesta antioxidante (*Antioxidant Response Elements*).

ARN: Ácido ribonucleico.

ARNip: ARN pequeño de interferencia.

CAT: cisteína aminotransferasa.

CBS: cistationina β -sintasa.

CN-Biotina: biotina conjugada con cianoacetato.

CSE: cistationina γ -liasa.

CO: Monóxido de carbono.

COX-2: ciclooxigenasa 2.

Cys: L-cisteína.

DCF-DA: diacetato de diclorodihidrofluoresceína.

DFC: diclorofluoresceína.

DM2: Diabetes mellitus tipo 2.

DMEM: *Dulbecco's Modified Eagle Medium*.

dNTPs: Desoxirribonucleótidos trifosfatos.

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético.

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

ERO: Especies radicales de oxígeno.

FITC: Isotiocianato de fluoresceína.

HO-1: Homoxigenasa-1.

H₂S: Sulfuro de hidrógeno.

IGF: Factor de crecimiento insulínico (*insulin-like growth factors*).

IL-1 β : Interleuquina 1 beta.

Keap1: *Kelch-like ECH-associated protein 1*.

MEC: Matriz extracelular densa.

MMP: Metaloproteínasa.

MSBT Metilsulfonil benzotiazol.

MST: 3-mercaptopiruvato sulfurtransferasa.

NADPH: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato.

NADH: Nicotinamida adenina dinucleótido.

NF- κ B: *Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*.

NO: Óxido nítrico.

Nrf-2: *Nuclear factor-erythroid 2 related factor*.

OA: Artrosis (osteoartritis).

OA-DM2: Artrosis asociada a la diabetes tipo 2.

OARSI: Sociedad Internacional de Investigaciones sobre Osteoartritis (*Osteoarthritis Research Society International*).

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

PGA: Productos de la glicación avanzada.

PGE₂: Prostaglandina E₂.

qPCR: Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa.

TEMED: Tetrametiletilendiamina.

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

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

SBF: Suero Bovino Fetal.

SDS: Dodecilsulfato sódico.

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

SER: Sociedad Española de Reumatología.

PDE Fosfodiesterasas.

PLP Piridoxal fosfato.

PMSF: Fluoruro de fenilmetilsulfonilo.

PVDF: Fluoruro de polivinilideno.

RESUMEN

La artrosis es el trastorno articular más frecuente y una de las principales causas de discapacidad en el mundo. Esta enfermedad ha sido considerada clásicamente como una consecuencia del envejecimiento y del estrés mecánico del cartílago, no obstante, avances recientes en el conocimiento de la artrosis han revelado que se trata de una enfermedad articular multifactorial compleja, en la cual la inflamación juega un papel muy importante. Uno de los factores de riesgo asociados a la artrosis es el síndrome metabólico, dentro del cual está incluida la diabetes mellitus tipo 2. Estudios recientes sugieren que la diabetes tipo 2 favorece el aumento de la respuesta inflamatoria en el cartílago de la articulación, debido principalmente a la hiperglucemia y a la resistencia a la insulina, con el consiguiente aumento del dolor articular. Sin embargo, no existe actualmente una cura para estas enfermedades y los tratamientos existentes se focalizan en aliviar su sintomatología y atenuar su progresión.

El sulfuro de hidrógeno (H_2S) es un gasotransmisor involucrado en multitud de procesos fisiológicos y patológicos que promueve una respuesta antioxidante y antiinflamatoria tanto en la artrosis como en la diabetes por separado. No obstante, no hay estudios que aborden la relación del H_2S en la artrosis asociada a la diabetes. En este sentido, diferentes hallazgos indican que los niveles de H_2S están reducidos en condrocitos artrósicos, y especialmente en las complicaciones asociadas a diabetes, sugiriendo que la administración exógena de H_2S podría tener efectos beneficiosos en este fenotipo de artrosis. Una de las vías moleculares por las cuales el H_2S podría estar ejerciendo sus efectos protectores es la vía de señalización antioxidante Nrf-2/HO-1, la cual está regulada positivamente por el gas. Asimismo, otra vía de actuación clave en el proceso inflamatorio que puede ser modulada por el H_2S según ha sido descrito es la de NF- κ B.

Así, a través de este proyecto se quiere estudiar el papel que juega el H_2S en la artrosis asociada a la diabetes así como su modo de actuación, con la intención de esclarecer determinados mecanismos no descritos. Además, se pretende que los hallazgos obtenidos en este estudio puedan ser aplicables para promover el desarrollo de tratamientos alternativos de la enfermedad basados en la aplicación exógena de H_2S .

ABSTRACT

Osteoarthritis is the most common joint disorder and one of the leading causes of disability in the world. This disease has classically been considered a consequence of aging and mechanical stress on the cartilage. However, recent advances in the understanding of osteoarthritis have revealed that it is a complex multifactorial joint disease, in which inflammation plays a very important role. One of the risk factors associated with osteoarthritis is the metabolic syndrome, which includes type 2 diabetes mellitus. Recent studies suggest that type 2 diabetes favours an increased inflammatory response in the joint cartilage, mainly due to hyperglycaemia and insulin resistance, with a consequent increase in joint pain. However, there is currently no cure for these diseases and existing treatments are focused on alleviating their symptoms and mitigating their progression.

Hydrogen sulfide (H₂S) is a gas transmitter involved in a multitude of physiological and pathological processes that promotes an antioxidant and anti-inflammatory response in both osteoarthritis and diabetes separately. However, there are no studies addressing the relationship of H₂S in osteoarthritis associated with diabetes. In this sense, different findings indicate that H₂S levels are reduced in arthritic chondrocytes, and especially in the complications associated with diabetes, suggesting that exogenous administration of H₂S could have beneficial effects on this arthrosis phenotype. One of the molecular pathways by which H₂S may be exerting its protective effects is the Nrf-2/HO-1 antioxidative signaling pathway, which is positively regulated by the gas. Likewise, another key action pathway in the inflammatory process that can be modulated by H₂S as described is that of NF-κB.

Thus, this project aims to study the role played by H₂S in osteoarthritis associated with diabetes as well as its mode of action, with the aim of clarifying certain undescribed mechanisms. Furthermore, it is intended that the findings obtained in this study may be applicable to promote the development of alternative treatments for the disease based on the exogenous application of H₂S.

RESUMO

A artrose é o trastorno articular máis común e unha das principais causas de discapacidade no mundo. Esta enfermidade foi considerada clásicamente como consecuencia do envellecemento e do estrés mecánico da cartilaxe, con todo, os recentes avances no coñecemento da artrose revelaron que é unha enfermidade articular multifactorial complexa, na que a inflamación xoga un papel moi importante. Un dos factores de risco asociados á artrose é a síndrome metabólica, que inclúe a diabetes mellitus tipo 2. Estudos recentes suxiren que a diabetes tipo 2 favorece un aumento da resposta inflamatoria na cartilaxe articular, debido principalmente a hiperglicemia e a resistencia á insulina, co conseguinte aumento da dor nas articulacións. Non obstante, actualmente non existe cura para estas enfermidades e os tratamentos existentes están centrados en paliar os seus síntomas e mitigar a súa progresión.

O sulfuro de hidróxeno (H_2S) é un gasotransmisor implicado en multitude de procesos fisiolóxicos e patolóxicos que promove unha resposta antioxidante e antiinflamatoria tanto na artrose como na diabetes por separado. Non obstante, non hai estudos que aborden a relación da H_2S na artrose asociada á diabetes. Neste sentido, diferentes achados indican que os niveis de H_2S son reducidos en condrocitos artrosicos, e especialmente en complicacións asociadas á diabetes, suxerindo que a administración de H_2S exóxena podería ter efectos beneficiosos sobre este fenotipo de artrose. Unha das vías moleculares polas que o H_2S podería estar exercendo os seus efectos protectores é a vía de sinalización anti-oxidante de Nrf-2 / HO-1, que regula o gas positivamente. Así mesmo, outra vía de acción clave no proceso inflamatorio que pode ser modulado por H_2S como se describiu é a da NF- κ B.

Así, a través deste proxecto quérese estudar o papel que xoga o H_2S na artrose asociada á diabetes así como o seu modo de acción, coa intención de aclarar certos mecanismos non descritos. Ademais, preténdese que os resultados obtidos neste estudo poidan ser aplicables para promover o desenvolvemento de tratamentos alternativos para a enfermidade a partir da aplicación exóxena de H_2S .

ANTECEDENTES

El proyecto que se va a presentar pretende evaluar el papel del sulfuro de hidrógeno (H₂S) en la artrosis asociada a la diabetes. Para facilitar su correcta comprensión, así como la valoración de su posible alcance, a continuación se van a definir una serie de conceptos y presentar los antecedentes.

1. **Diartrosis o articulación sinovial.**

Las articulaciones sinoviales, también conocidas como diartrosis, son uniones entre los huesos que presentan, entre las superficies articulares, una cavidad sinovial (Pró, 2012). En general, son consideradas articulaciones de movilidad libre y destacan por su complejidad anatómica y su diversidad funcional. Además, son las articulaciones con mayor probabilidad de desarrollar disfunciones incómodas e incapacitantes (Marieb, 2008).

Estas articulaciones tienen una serie de estructuras anatómicas básicas que las constituyen (Figura 1a). Las superficies que se enfrentan en los dos huesos están cubiertas con cartílago articular y separadas por un espacio conocido como cavidad sinovial en cuyo interior hay líquido sinovial, que lubrica las superficies y evita su contacto. Además, una cápsula articular de tejido conjuntivo cubre la cavidad y retiene el líquido sinovial. Ésta se conforma a su vez de una membrana fibrosa que continúa con el periostio de los huesos adyacentes y una membrana sinovial por el interior (Saladin, 2013; Tortora & Derrickson, 2006).

1.1. Membrana sinovial.

La membrana sinovial es una estructura especializada que tapiza la cara interna de las articulaciones sinoviales y secreta el líquido sinovial. Consta de una lámina íntima superficial y una lámina subintimal. Por un lado, la lámina íntima superficial es la capa funcional de la membrana sinovial y está formada por sinoviocitos. Este tipo celular tiene poca capacidad mitótica, es capaz de producir citoquinas y se distingue en dos tipos: el tipo A, que proviene de fibroblastos, y el tipo B, que proviene de macrófagos (Ea, Bazille, & Lioté, 2008; Pró, 2012). Por otro lado, la lámina subintimal está formada por una matriz de fibras de colágeno de tipo I y tipo III, reticulina y fibronectina. Esta capa es rica en macrófagos, los cuales fagocitan y eliminan los desechos y las partículas intraarticulares, y posee vascularización, tanto sanguínea como linfática, a través de la cual se establece el intercambio tisular entre la cavidad articular y los tejidos periarticulares (Batlle-Gualda, Benito, Blanco, & Martín, 2002; Ea et al., 2008).

1.2. Cartílago articular.

El cartílago articular es un cartílago hialino de 2 a 4 mm de grosor que carece de vasos sanguíneos, nervios y vasos linfáticos. Su principal función es proporcionar una superficie lisa y lubricada a las articulaciones y facilitar la transmisión de cargas con un bajo coeficiente de fricción (Sophia Fox, Bedi, & Rodeo, 2009). El cartílago articular se compone un único tipo celular, los condrocitos, y una matriz extracelular densa (MEC).

Los condrocitos constituyen aproximadamente el 10% del peso del cartílago y son un tipo de células altamente especializadas que se encargan de la biosíntesis y mantenimiento de los componentes de la MEC así como de su recambio periódico (Burguera, Vela-Anero, Magalhães, Meijide-Faílde, & Blanco, 2014; Fortoul, 2019). El condrocito maduro es relativamente inactivo pero, aun así, es capaz de responder a estímulos bioquímicos, estructurales o físicos, sintetizando distintos enzimas, factores de crecimiento, citoquinas y los diversos componentes de la MEC.

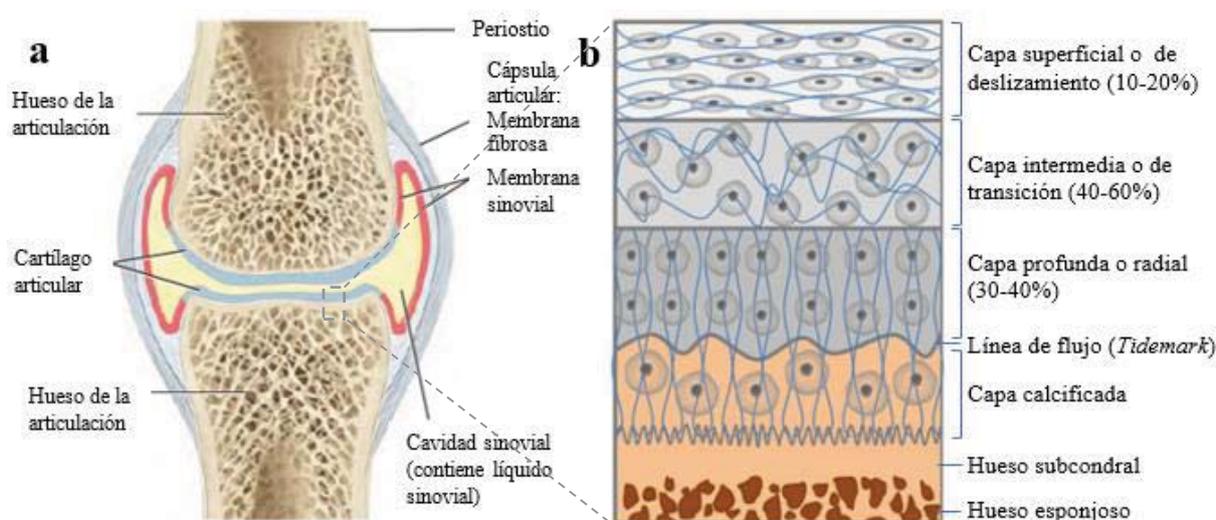


Figura 1. Representación de una articulación sinovial y del cartílago articular. *a.* Estructura de una articulación sinovial de rodilla; modificada de: Tortora & Derrickson, 2006. *b.* Diagrama esquemático transversal de un cartílago articular sano; modificada de: Oliveira & Reis, 2017.

La disposición de los condrocitos y de la MEC a lo largo del cartílago articular va variando con la profundidad, de manera que se diferencian distintas capas (Figura 1b). En primer lugar, la capa superficial presenta una escasa actividad metabólica, pocos proteoglicanos, condrocitos aplanados y paralelos a la superficie y esa misma disposición para las fibras de colágeno. A esta capa le sigue la de transición, que tiene una elevada actividad metabólica, las fibras de colágeno están distribuidas al azar y los condrocitos son más redondeados. Por debajo de ésta, se encuentra la capa radial, que es rica en proteoglicanos y fibras de colágeno y en la cual los

condrocitos se disponen formando columnas. Por último, la más profunda es la capa calcificada la cual, separada de la anterior por la línea de flujo o *tidemark*, tiene fibras de colágeno dispuestas radialmente y presenta cristales de hidroxipatita y condrocitos hipertróficos (Oliveira & Reis, 2017).

De esta forma, dada la complejidad del cartílago articular y la importancia de su papel, una pérdida de las propiedades de este tejido puede derivar en patologías que limitan el movimiento y la función de la articulación, como es el caso de la artrosis.

2. Artrosis.

La artrosis u osteoartritis (OA) es una enfermedad degenerativa caracterizada por la degradación de la matriz del cartílago y por la muerte celular del condrocito. Esto tiene como resultado la pérdida gradual de la integridad del cartílago articular así como la modificación temprana del hueso subcondral y la afección de la membrana sinovial (Batlle-Gualda et al., 2002; Marchev et al., 2017; Vaamonde-García et al., 2012). Con una alta prevalencia entre la población de edad avanzada, es el trastorno articular más común y una de las principales causas de discapacidad en el mundo (Burguera et al., 2019; Vinatier, Domínguez, Guicheux, & Caramés, 2018). De hecho, se estima que alrededor de 250 millones de personas tienen artrosis de rodilla en todo el mundo y que el 9,6% de los hombres y el 18% de las mujeres mayores de 60 años tienen algún tipo de OA sintomática. (Martel-Pelletier et al., 2016; O'Neill, McCabe, & McBeth, 2018). Asimismo, y debido al gran volumen de pacientes afectados, esta enfermedad genera un elevado volumen de costes socioeconómicos, además de una reducción en la calidad de vida de las personas que la padecen.

Clínicamente, la afección se caracteriza por dolor articular, sensibilidad, crepitación, rigidez y limitación del movimiento con derrames ocasionales y grados variables de inflamación local (Hunter & Bierma-Zeinstra, 2019). Por otro lado, cabe destacar que actualmente la OA se considera un trastorno multifactorial con un componente inflamatorio porque, en su patogénesis y progresión, participan factores metabólicos, genéticos, epigenéticos y locales. Entre estos factores, los considerados de riesgo son la edad, las lesiones articulares, los antecedentes familiares de OA, la obesidad y el síndrome metabólico (Courties & Sellam, 2016).

2.1. Fisiopatología de la artrosis.

En el transcurso de la OA, se produce la desregulación de los procesos catabólicos y anabólicos que controlan la síntesis de la matriz del cartílago (Burguera et al., 2019). No obstante, la

pérdida de este equilibrio no es el resultado de un único mecanismo sino de una compleja interacción entre tensiones mecánicas anormales, el aumento de las cantidades de citoquinas proinflamatorias y otros daños (Figura 2).

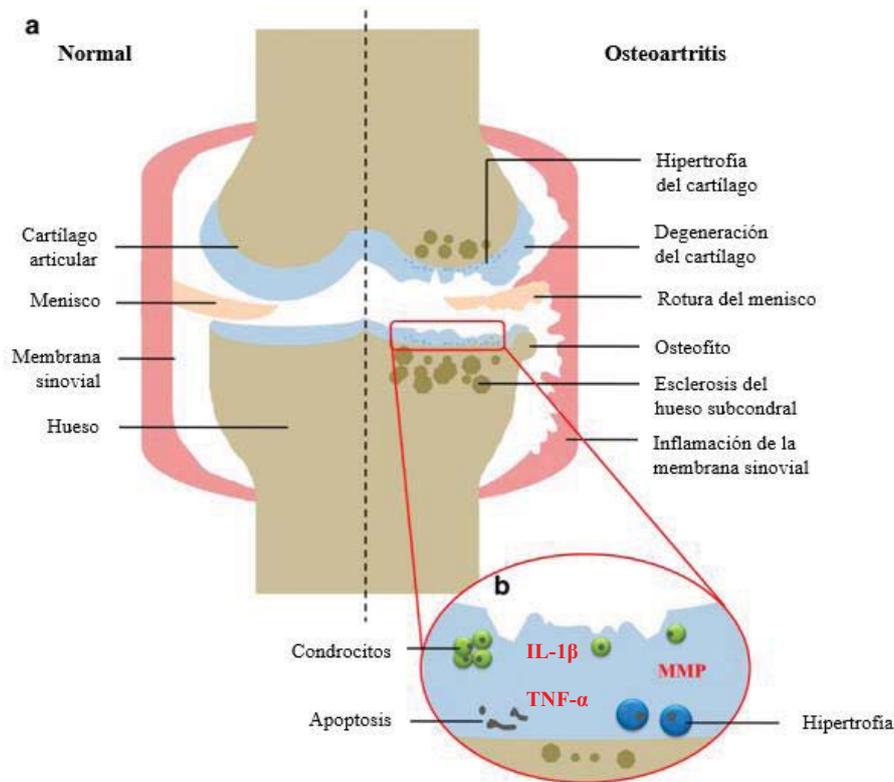


Figura 2. Cartilago OA. a) Los cambios de la estructura articular durante la progresión de la OA. b) Esquema de las respuestas celulares que tienen lugar en el cartilago OA. OA, osteoartritis. Imagen modificada de: Zhang et al. 2016.

De esta forma, en la OA, tras la aparición de un estrés biológico o mecánico tiene lugar un aumento de la producción de mediadores proinflamatorios por parte de los condrocitos en el cartilago, así como de los sinoviocitos y los osteoblastos en el tejido sinovial y hueso subcondral respectivamente. Entre los mediadores proinflamatorios más habituales se encuentran las citoquinas, entre las cuales destacan las interleuquinas IL-1 β , IL-6, IL-17 IL-8 y el factor de necrosis tumoral- α (TNF- α); las especies radicales de oxígeno (ERO); los productos de la glicación avanzada (PGAs) y lípidos bioactivos como la prostaglandina E₂ (PGE₂) (Marchev et al., 2017). Esta inflamación local induce además un aumento de la producción de enzimas proteolíticas, como son la metaloproteinasa (MMP) y la agregasa por parte de las células articulares, las cuales digerirán la matriz cartilaginosa. Además, los condrocitos se desdiferencian y mueren principalmente por apoptosis (Blanco, Guitian, Vázquez-Martul, De Toro, & Galdo, 1998), lo cual tiene como consecuencia la alteración y pérdida de la síntesis de la MEC (Berenbaum, 2008; Zhang, Ouyang, Dass, & Xu, 2016). Además de la modificación

del cartílago, bajo la influencia del factor de crecimiento insulínico (IGF; *insulin-like growth factors*) y el factor de crecimiento transformante β (TGF- β ; *transforming growth factor β*) entre otros, tiene lugar en el hueso subcondral una remodelación del tejido con condensación y sobrecrecimiento del mismo que da lugar a los llamados osteofitos (Berenbaum, 2008). Finalmente, durante el desarrollo de la OA también se observa una reacción inflamatoria en la membrana sinovial principalmente activada por los productos de la degradación del cartílago circundantes. Además, la infiltración en el tejido de células inflamatorias como los linfocitos y los macrófagos promueve la sobreproducción de citoquinas y de enzimas proteolíticas así como el aumento del estrés oxidativo, agravando a su vez la degradación del cartílago y creándose en consecuencia un círculo vicioso (Courties & Sellam, 2016).

2.2. Artrosis asociada a la diabetes mellitus tipo 2.

Como se ha indicado anteriormente, uno de los factores de riesgo de la OA es el síndrome metabólico, el cual no es una enfermedad propiamente dicha, sino un término que pone de relieve una serie de factores que pueden favorecer el mayor riesgo a padecer ciertas patologías, aproximadamente el doble en el caso de enfermedades cardiovasculares y el quintuple o más en el caso de la diabetes mellitus tipo 2 (DM2) (Samson & Garber, 2014). Así, la obesidad abdominal, la resistencia a la insulina, la hipertensión y la hiperlipidemia constituyen el núcleo de la mayoría de los casos de síndrome metabólico (Saklayen, 2018).

Directamente relacionado con el síndrome metabólico se encuentra la DM2, un desorden metabólico crónico asociado con muchas complicaciones adversas. En este sentido, hallazgos tanto epidemiológicos como experimentales sugieren que esta enfermedad podría ser también un factor de riesgo independiente para la OA más allá de su asociación con la edad o la obesidad. De hecho, se calcula que el 47,3% de los pacientes diabéticos presentan algún tipo de OA (Veronese et al., 2019).

La DM2 tiene un impacto negativo en las articulaciones principalmente a través de dos vías. En primer lugar, al igual que en otros órganos, la hiperglucemia crónica induce el estrés oxidativo, provocando la sobreproducción de citoquinas proinflamatorias y PGAs en los tejidos de las articulaciones, y reduce el potencial de diferenciación de las células madre. En segundo lugar, la resistencia a la insulina podría desempeñar un papel a nivel local, pero también a través del estado de inflamación sistémica de bajo grado que genera (Courties & Sellam, 2016).

Los PGAs inducidos por la glucosa alta interactúan con el receptor de PGA (RAGE; *Receptor for advanced glycation endproducts*) y promueven en el condrocito estrés oxidativo

a través del incremento de los niveles de ERO y óxido nítrico (NO) y de la liberación de citoquinas (Vinatier et al., 2018). Además, los PGAs también modifican la rigidez y la resistencia del cartílago. Por otro lado, niveles altos de glucosa aumentan la expresión de MMP y hacen que disminuya la producción de colágeno II (Courties & Sellam, 2016).

Por último, es importante destacar que, en condiciones normales, los condrocitos expresan transportadores de glucosa (GLUT) que les permite adaptarse a la variación de los niveles de glucosa pero que, durante la OA, pierden esta capacidad (Courties & Sellam, 2016). Además, se ha descrito que los condrocitos que presentan OA asociada a la DM2 (OA-DM2) tienen una mayor respuesta a la inflamación inducida por IL-1 β que los condrocitos OA sin DM2, lo que significa que la alta glucosa y la DM2 podrían participar en el aumento de la inflamación de la OA (Laiguillon et al., 2015).

Para poder responder al incremento de estos procesos catabólicos, el organismo activa una serie de mecanismos para controlar el estrés oxidativo e inflamatorio en la articulación y entre los distintos reguladores de estos mecanismos se encuentra el H₂S.

3. Sulfuro de hidrógeno.

El H₂S es una pequeña molécula gaseosa que durante mucho tiempo ha sido conocida por sus efectos tóxicos y su olor nocivo. Sin embargo, a finales del siglo XX se hizo evidente que el propio organismo sintetizaba de forma endógena el H₂S en la mayoría de los tejidos, y que era una molécula de señalización celular crucial que intervenía en una gran cantidad de procesos fisiológicos (Burguera et al., 2019). Fue entonces cuando empezó a ser considerado, junto al NO y al monóxido de carbono (CO), como un gasotransmisor crucial en el organismo (Wallace & Wang, 2015).

Por su naturaleza liposoluble, el H₂S es capaz de atravesar la membrana plasmática sin un transportador específico, lo cual le facilita la participación en un amplio rango de funciones fisiológicas y el acceso a la mayoría de los tejidos del organismo. De esta forma, este gasotransmisor tiene un alto potencial biológico, ya que puede ejercer una gran variedad de funciones en muchos objetivos biológicos (Wallace & Wang, 2015). No obstante, cabe mencionar que, a altas concentraciones, el H₂S puede producir una intoxicación letal. Para evitarlo, las células tienen un mecanismo de regulación que controla el nivel endógeno de H₂S dentro del rango fisiológico (Wang, 2002).

3.1. Síntesis de H₂S.

El H₂S es sintetizado de manera endógena en los tejidos de los mamíferos a través de dos vías, una enzimática y otra no enzimática. Por un lado, la vía no enzimática es resultado de la reducción de la ruta elemental de azufre a H₂S. Esto se logra por medio de otras especies reductoras generadas a través de la oxidación de la glucosa, tales como glutatión, lactato, nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH), o nicotinamida adenina dinucleótido (NADH) (Burguera et al., 2019).

Por otro lado, la vía enzimática se basa en la acción de principalmente tres enzimas: cistationina γ -liala (conocida como CSE o CTH), cistationina β -sintasa (CBS) y 3-mercaptopiruvato sulfurtransferasa (MST). Esta última, actúa gracias a la acción de una cuarta, la cisteína aminotransferasa (CAT).

El sustrato para la generación de H₂S endógeno es la L-cisteína (Cys), un aminoácido que contiene azufre procedente de fuentes alimentarias, sintetizado a través de la vía inversa de transulfuración a partir de L-metionina y pasando por homocisteína. De esta forma, las enzimas dependientes de piridoxal fosfato (PLP), CSE y CBS, catalizan la desulfuración de la L-cisteína en la producción de H₂S (Renga, 2011).

Al igual que CSE y CBS, la enzima CAT usa PLP como cofactor y convierte la L-cisteína en 3-mercaptopiruvato. Tras esta reacción y usando zinc como cofactor, la 3-mercaptopiruvato sulfurtransferasa (MST) cataliza la transferencia del azufre del 3-mercaptopiruvato a otros aceptores de azufre, la cual da como resultado la formación de H₂S (Murphy, Bhattacharya, & Mukherjee, 2019). Por tanto, MST actúa como un portador de azufre, en lugar de un productor de H₂S, pero también tiene un papel relevante en lo que se refiere a la disponibilidad de H₂S.

Además, la producción endógena de H₂S depende de la disponibilidad del sustrato y de determinados factores del medio intracelular que, junto con la localización tisular, afectan de manera diferente a la actividad enzimática. En este aspecto, CBS ejerce su acción predominantemente en el cerebro, el sistema nervioso y los tejidos del corazón. Por otra parte, CSE se expresa predominantemente en el músculo liso vascular, el intestino, el hígado y el riñón. Y por último, MST se ha localizado en el corazón, el riñón, el hígado y también en el cerebro (Renga, 2011).

Con respecto a la localización celular, la producción endógena de H₂S puede tener lugar en el citosol y/o en la mitocondria, dependiendo del tipo celular y de las condiciones de estrés. CBS

y CSE se encuentran por norma general en el citosol, mientras que MST se puede encontrar tanto en el citoplasma como en la mitocondria regulando la producción de H₂S. No obstante, bajo condiciones de estrés, CSE puede ser translocada del citosol a la mitocondria. Por otro lado, CBS también puede encontrarse en la mitocondria de ciertos tipos de células en condiciones de reposo. Además, la hipoxia disminuye la degradación de CBS en la mitocondria, lo que lleva a la acumulación de dicha enzima y, por lo tanto, aumenta la producción de H₂S en este orgánulo (Wallace & Wang, 2015).

En cuanto a la expresión de estas enzimas en la articulación, se ha descrito que los condrocitos primarios y las células progenitoras mesenquimales que se diferencian en condrocitos, expresan CBS, CSE y MST y producen H₂S (Burguera et al., 2019; Nasi et al., 2020)

Aparte de la producción endógena, el H₂S puede ser aplicado de manera exógena a través de la dieta (Melino, Leo, & Toska Papajani, 2019) y donadores químicos, como por ejemplo, el NaSH, que es un análogo sólido del gas que proporciona un acceso directo e instantáneo al H₂S; o el GYY4137, que se considera un donador de liberación lenta (Veronese et al., 2019).

3.2. Funciones fisiológicas del H₂S.

La importancia del H₂S radica en su implicación en numerosos procesos fisiológicos y patológicos (Figura 3). El H₂S puede suprimir la adherencia de los leucocitos al endotelio vascular, la extravasación de los leucocitos y la consiguiente formación de edemas. Asimismo, es capaz de sustituir al oxígeno en la conducción de la respiración mitocondrial, atenuando así la lesión tisular relacionada con el estrés oxidativo. Por otro lado, la capacidad del H₂S para inhibir la actividad de las fosfodiesterasas (EDP) puede contribuir a su capacidad de relajar el músculo liso vascular, lo que resulta en un aumento del flujo sanguíneo. Además, el aumento de la producción de H₂S en tejidos con lesiones puede acelerar la curación de tales daños a través de la estimulación de la angiogénesis (Figura 3).

Aparte de estas funciones, uno de los procesos más importantes en los que interviene el H₂S es la reducción de la inflamación y la protección de los tejidos frente a lesiones. Y es que el H₂S potencia la resolución de la inflamación, entre otras cosas, promoviendo la apoptosis de los neutrófilos y propiciando la diferenciación de los macrófagos hacia el fenotipo M2 o antiinflamatorio (Figura 3). Además, modula la actividad de algunos factores de transcripción como Nrf-2 (*nuclear factor-erythroid 2 related factor*) y NF-κB (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*), promoviendo la reducción de la producción de factores proinflamatorios y citoquinas como IL-1β o TNF-α.

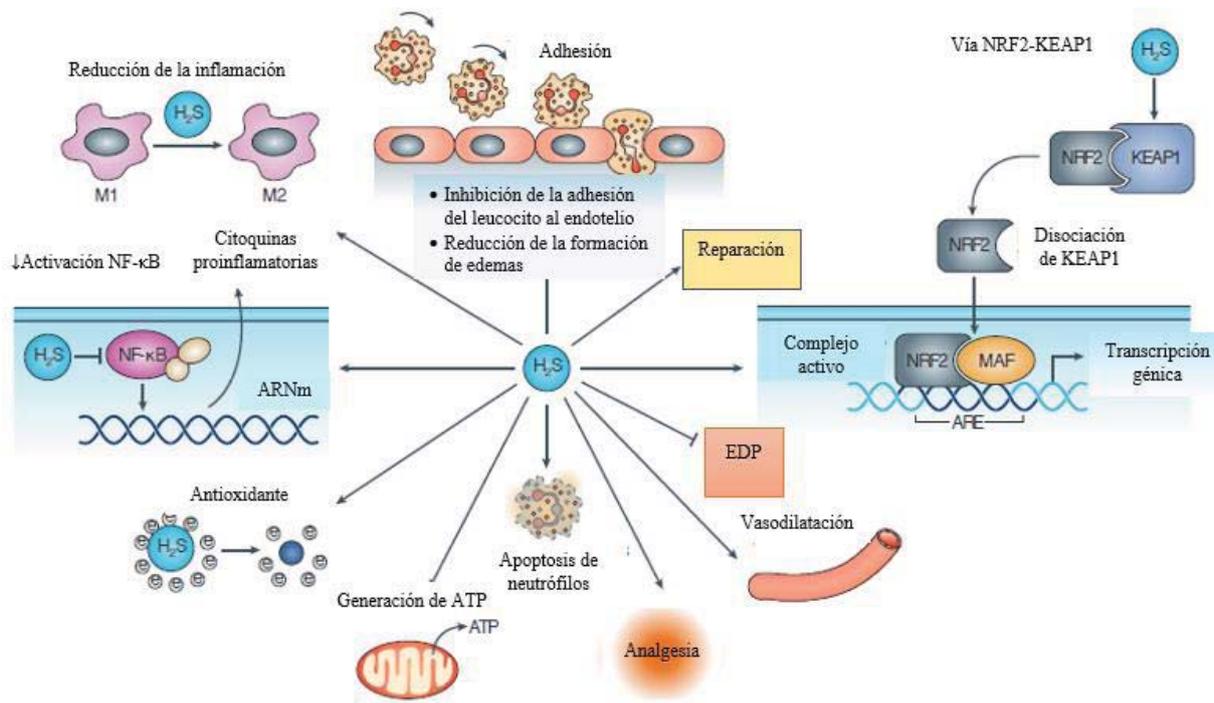


Figura 3. Dianas antiinflamatorias y citoprotectoras del H₂S. EDP, fosfodiesterasas; ARE, elementos de respuesta antioxidante. Imagen modificada de: Wallace & Wang, 2015.

3.3. Señalización del H₂S.

La señalización celular por parte del H₂S se produce principalmente a través de tres vías: (1) eliminación de ERO y especies de nitrógeno reactivo, (2) por unión y/o reducción del metal de proteínas de hierro-hemo, y (3) a través de S-sulfhidración, que es una modificación postraduccional que convierte el grupo tiol (-SH) de los residuos de cisteína de determinadas proteínas en persulfuro (-SSH), lo cual altera su función (Murphy et al., 2019).

3.3.1. Eje Nrf-2/HO-1.

Nrf-2 es un factor de transcripción que participa en la señalización antioxidante y en la respuesta de supervivencia celular. Así, este factor transcripcional regula una gran cantidad de respuestas citoprotectoras y ayuda a atenuar las enfermedades metabólicas, neurodegenerativas y otras relacionadas con la edad (Francisqueti-Ferron et al., 2019). Sin embargo, se ha visto que, en procesos de envejecimiento y en trastornos metabólicos como la DM2, se produce la alteración de la señalización de Nrf-2 (Seo & Lee, 2013).

En condiciones normales, Nrf-2 se encuentra generalmente en el citoplasma unido a su regulador negativo, la proteína Keap1 (*Kelch-like ECH-associated protein 1*). Sin embargo, en respuesta al estrés oxidativo o electrofílico, Nrf-2 se disocia de Keap1 y se transloca al núcleo, donde forma un heterodímero con la proteína MAF. Esto permite su unión a los elementos de

respuesta antioxidante (ARE; *Antioxidant Response Elements*) en las regiones promotoras aguas arriba de los genes antioxidantes (Figura 3) (Marchev et al., 2017). Es en este punto en el que entra en juego el H₂S, ya que induce la S-sulfhidración de Keap1, facilitando su disociación de Nrf-2 y produciendo así un aumento de las respuestas antioxidantes mediadas por Nrf-2 (Wallace & Wang, 2015).

Por otro lado, entre los genes antioxidantes promovidos por los ARE, se encuentra el de la hemo-oxigenasa-1 (HO-1), una enzima antioxidante crucial que cataliza la degradación del grupo hemo en hierro, monóxido de carbono y biliverdina. Se ha descrito que esta enzima regula los procesos catabólicos y anabólicos en condrocitos OA de manera que su sobreexpresión en el cartílago previene la activación proinflamatoria inducida por vías catabólicas, apoptóticas o de senescencia. Por lo tanto, representa una parte importante de la respuesta celular a estrés inflamatorio y oxidativo en las articulaciones (Waza, Hamid, Ali, Bhat, & Bhat, 2018) De esta forma, el eje Nrf-2/HO-1 es un mecanismo crucial de supervivencia celular que contrarresta el estrés oxidativo y la inflamación.

3.3.2. NF-κB.

La de NF-κB es una familia de factores de transcripción inducibles altamente conservados evolutivamente que intervienen en la respuesta del sistema inmune y que, como se ha indicado anteriormente, también se ven modulados por parte del H₂S. La activación de la vía de NF-κB induce la transcripción de genes que regulan la inflamación, la supervivencia celular, la proliferación y la diferenciación (Hayden & Ghosh, 2014). De hecho, esta vía se considera un punto de regulación clave de la inflamación de los tejidos, que incluye entre otros la expresión de IL-6, IL-8, y de COX-2 en varios tipos de células y particularmente en los condrocitos OA (Pulai et al., 2005).

El H₂S es capaz de inhibir la actividad transcripcional de NF-κB, lo que lleva a una reducción de la producción de factores proinflamatorios y citoquinas (Figura 3) (Hashmp, Sattar, Rathore, Ahmadi, & Johns, 2017). Una de las rutas a través de las cuales actúa el H₂S es mediante la S-sulfhidración de la subunidad p65 de NF-κB. Esta modificación postraducciona promueve la unión de NF-κB a la proteína ribosómica coactivadora S3 (RPS3), interfiriendo así en la transcripción de genes proinflamatorios (Sen et al., 2012).

3.4. Importancia del H₂S en la patogénesis de la artrosis y la diabetes.

Como se ha descrito anteriormente, tanto la OA como la DM2 son enfermedades estrechamente relacionadas con una respuesta inflamatoria y con estrés oxidativo. En este sentido, diferentes hallazgos sugieren que el H₂S podría jugar un papel clave en la activación de procesos antiinflamatorios y antioxidantes durante el transcurso de dichas patologías, mientras que un deterioro en su síntesis podría favorecer su patogénesis.

En relación a esto último, se ha demostrado que los condrocitos artrósicos presentan niveles de H₂S más bajos que los condrocitos normales así como una menor expresión génica y proteica de MST (Burguera et al., 2019). En otro estudio, se observó *in vitro* que la aplicación exógena de H₂S a través de los donadores NaSH y GYY4137 tiene propiedades anticatabólicas en condrocitos OA (Burguera et al., 2014). Además, Nasi et al., 2020 descubrieron que la disminución de los niveles de H₂S a través del silenciamiento de MST tenía como consecuencia una mayor calcificación articular y un agravamiento de la OA. Por último, otro estudio reciente demostró *in vivo* que la aplicación de H₂S a través de aguas sulfuradas mediante balneoterapia conllevaba a una reducción de la destrucción del cartílago y del daño oxidativo (Vaamonde-García et al., 2020).

Por otro lado, con respecto a la diabetes, se ha descrito que la concentración sanguínea de H₂S de pacientes diabéticos es menor que en pacientes normales (Bełtowski, Wójcicka, & Jamroz-Wiśniewska, 2018). Además, se ha demostrado que el H₂S endógeno protege a las células beta del páncreas de la glucotoxicidad inducida por una dieta rica en grasas y previene el desarrollo de la DM2 (Okamoto et al., 2013). Por otro lado, se ha observado que los pacientes diabéticos presentan una mayor actividad de CBS y CSE que los controles sanos (Yusuf et al., 2005).

No obstante, el H₂S juega un papel diferente en función de la etapa en que se encuentre la diabetes. De esta forma, elevados niveles de H₂S en las células beta del páncreas y en los hepatocitos tiene un papel crucial en la aparición de la diabetes. Sin embargo, una vez establecida la enfermedad, los niveles endógenos de H₂S son más bajos en los órganos y tejidos afectados contribuyendo al desarrollo de complicaciones diabéticas en estos órganos. En consecuencia, una terapia para la diabetes basada en H₂S debería estar escalonada en dos fases. Por un lado, en la fase de inicio, la inhibición selectiva de la producción endógena de H₂S en las células beta del páncreas y el hígado aumentaría la disponibilidad de insulina y disminuiría la disponibilidad de glucosa. Mientras que por otro lado, en etapas posteriores, la aplicación

exógena de H₂S a los órganos periféricos podría ser beneficiosa para prevenir y tratar las complicaciones de la diabetes (Wallace & Wang, 2015).

ESTADO ACTUAL DE LA CUESTIÓN

Actualmente está ampliamente aceptado que la DM2 es un factor de riesgo independiente para la OA, tanto para su desarrollo como para su mayor rapidez de progresión. Un fenómeno que parece favorecer la patogénesis del fenotipo de OA-DM, es el hecho de que los condrocitos OA-DM2 presenten una mayor sensibilidad en el proceso inflamatorio y oxidativo en comparación con los condrocitos OA sin DM diagnosticada. Esto puede, al menos en parte, deberse al estrés por glucosa generado en el espacio articular en este subconjunto de pacientes (Laiguillon et al., 2015). En este sentido, se ha descrito que los condrocitos de pacientes OA-DM2 presentan menores niveles de Nrf-2/HO-1 que los pacientes OA, lo cual tiene una consecuencia directa en su mayor sensibilidad catabólica (Vaamonde-Garcia 2017).

Con respecto al H₂S, parece evidente que desempeña un papel protector tanto en la OA como en la DM2 por separado. No obstante, no hay estudios que aborden la relación del H₂S en la OA asociada a la DM2. Lo que sí que se ha demostrado, como se ha indicado anteriormente, es que los niveles de H₂S están reducidos en condrocitos OA, así como en las complicaciones asociadas a la DM2. Una de las vías moleculares por las cuales el H₂S podrían estar ejerciendo sus efectos protectores es la vía de señalización antioxidante Nrf-2/HO-1, la cual está regulada positivamente por el gas. De esta forma, mediante la administración exógena de H₂S se podrían reestablecer los niveles normales de dicha vía en condrocitos OA-DM2 y, en consecuencia, disminuir la inflamación. Y de igual manera, otra vía de actuación clave en el proceso inflamatorio que puede ser modulada por H₂S según ha sido descrito es la de NF-κB, . El estudio de estas vías y su modulación por parte del H₂S podría servir para disminuir la inflamación y el estrés oxidativo en la OA asociada a la DM2.

En conclusión, el estudio de la biosíntesis de H₂S y sus principales vías de actuación en pacientes OA-DM2 podría arrojar luz en relación con los mecanismos moleculares subyacentes que favorecen el desarrollo de este fenotipo de OA. Además, el descubrimiento de la importancia biológica del H₂S en estos sistemas podría abrir nuevas vías en la búsqueda de terapias más efectivas, de la misma forma que se han encontrado terapias novedosas relacionadas con el H₂S para otras enfermedades en tipos celulares distintos de condrocitos (Wallace, Vaughan, Dicay, Macnaughton, & De Nucci, 2018).

HIPÓTESIS

Niveles altos de glucosa en el espacio articular podrían afectar a la disponibilidad de H₂S, disminuyendo en consecuencia su papel protector en procesos inflamatorios, y pudiendo estar directamente relacionado con el hecho de que la diabetes sea un factor de riesgo en la artrosis.

OBJETIVOS

1. Estudiar la variación de los niveles de H₂S en pacientes artrósicos con y sin diabetes a nivel sistémico y local. Para medir el H₂S en sangre se utilizará un microelectrodo selectivo de iones conectado a un medidor de voltaje. A nivel de cartílago, se valorará la expresión de las enzimas más importantes involucradas en la síntesis de H₂S en los condrocitos mediante Western blot.
2. Establecer un modelo *in vitro* de estrés por glucosa en condrocitos OA para estudiar:
 - a) La sensibilidad a estímulos inflamatorios. Para ello, se estimulará un cultivo primario de condrocitos OA y se cuantificará la expresión de genes activadores de la respuesta antiinflamatoria por qPCR y Western blot y la liberación de mediadores proinflamatorios por ELISA.
 - b) La sensibilidad a estrés oxidativo. Se llevará a cabo mediante el análisis de las especies reactivas de oxígeno (ERO) mediante citometría de flujo en el cultivo primario de condrocitos previamente estimulado.
3. Valorar si el aumento de los niveles de H₂S mediante los donadores NaSH y GYY4137 modula la sensibilidad de los condrocitos OA a un estrés inflamatorio y oxidativo.
4. Estudio de las vías a través de las cuales el H₂S modula la respuesta antiinflamatoria y antioxidante:
 - a) Complejo Nrf-2/HO-1: comprobar si el H₂S ejerce sus efectos a través del factor transcripcional Nrf-2. Para ello, se silenciará el gen Nrf-2 por transfección de ARN pequeño de interferencia (ARNip) y se cuantificará la expresión de genes activadores de la respuesta antiinflamatoria por qPCR y Western blot, así como la liberación de mediadores proinflamatorios por ELISA. Por otra parte, también se estudiará mediante tag-switch y Western blot si el H₂S induce la S-sulfhidración de keap1.
 - b) NF-κB: comprobar si el H₂S inhibe la translocación de NF-κB al núcleo. Esto se evaluará mediante inmunofluorescencia, tag-switch y Western blot.

METODOLOGÍA

1. Obtención de las muestras.

Para la realización de este proyecto se utilizarán muestras de sangre y de cartílago de pacientes artrósicos con y sin patología diabética diagnosticada. Las muestras procederán de pacientes tratados en el Complejo Hospitalario Universitario de A Coruña (CHUAC). Todos los estudios se realizarán estrictamente de acuerdo con las regulaciones éticas locales vigentes. Además, todas las muestras serán tratadas de forma anónima y, para su obtención, se proporcionará a los pacientes la información necesaria (ANEXO I) y se les hará firmar un consentimiento informado (ANEXO II).

2. Cuantificación de los niveles de H₂S en sangre.

La concentración de H₂S en sangre se medirá utilizando un electrodo selectivo de iones (Modelo LIS-146GSCM; Lazar Research Lab. Inc) conectado a un voltímetro (Modelo 6230N; Jenco Electronics) mediante un método previamente descrito (Burguera et al., 2019). Este electrodo es un transductor que convierte la actividad del H₂S en un potencial eléctrico que es medido con el voltímetro. Para realizar la medición, se preparará una solución madre tampón antioxidante con salicilato de sodio, ácido ascórbico y NaOH. A partir de la solución madre se hará una dilución 1:3 en agua destilada para obtener la solución de trabajo. La muestra de sangre (200 µL) se mezclará en una proporción 1:1 con la solución de trabajo, se sellará con Parafilm y se incubará a 37°C durante 1 hora. A continuación, el electrodo se sumergirá en la mezcla y se registrarán los valores de voltaje obtenidos, los cuales serán convertidos a concentración de H₂S con una curva de calibración preparada con el estándar Na₂S.

3. Cultivo celular.

3.1. Aislamiento y cultivo primario de condrocitos.

Los condrocitos humanos artrósicos se obtendrán como se describió previamente (Nogueira-Recalde et al., 2019). De esta forma, se cortará el cartílago en rodajas y se incubará con tripsina 2x (Gibco) durante 10 minutos a 37°C. A continuación, se mantendrán en agitación con colagenasa IV (Sigma-Aldrich) en medio de cultivo *Dulbecco's Modified Eagle Medium* glucosa 1 gr/L, 1 mM de Piruvato (DMEM; Gibco) con un 5% de Suero Bovino Fetal (SBF; Gibco) durante toda la noche. La digestión resultante se centrifugará y las células serán incubadas en DMEM suplementado con un 10% de SBF y un 1% de los antibióticos Penicilina

(Gibco) y Estreptomicina (Gibco). Asimismo, el cultivo se mantendrá a 37°C con una humedad del 90% y un 5% de CO₂.

Tras esto, se realizarán los siguientes subcultivos de condrocitos aislados a partir del cartílago:

- Subcultivo en placa de 12 pocillos a una densidad de 2×10^5 células/pocillo para el análisis de ARN y de proteínas.
- Subcultivo en placa de 24 pocillos a una densidad de 1×10^5 células/pocillo para el ensayo de citometría de flujo.
- Subcultivo en placas de 96 pocillos a una densidad de $2,5 \times 10^4$ células/pocillo para los ensayos de inmunoabsorción enzimática (ELISA) de IL-8, IL-6 y PGE₂.
- Subcultivo en portaobjetos de cámara de 8 pocillos *chamber slides* (Millipore) a una densidad de 1×10^4 células/pocillo para el estudio de inmunofluorescencia.

3.2. Línea celular de condrocitos.

Para realizar la transfección de ARN, se utilizará la línea celular de condrocitos humanos T/C-28a2, la cual fue immortalizada por Goldring et al., 1994 mediante la transfección de un cultivo primario de condrocitos juveniles con el antígeno T del virus SV40, el cual permite bloquear la inhibición de la progresión del ciclo celular, dando lugar a un mayor número de generaciones producidas por cada célula. Esta línea celular crece en monocapa en medio con suero, tiene ARN mensajeros (ARNm) que codifican para los colágenos específicos de condrocitos II, IX y XI y proteoglicanos, y responde a la modulación producida por la IL-1 β . Es por esto que es ampliamente empleada para estudiar los mecanismos de reparación normales y patológicos de cartílago relacionados con la biología y fisiología de los condrocitos (Goldring et al., 1994). No obstante, es necesario corroborar que la línea celular T/C-28a2 presenta un comportamiento similar al de los condrocitos en cultivo primario. En caso afirmativo, se procederá a la realización de estos experimentos. Esta corroboración se hará tras realizar los mismos experimentos llevados a cabo con el cultivo primario de condrocitos y comparar la respuesta entre las células. Las condiciones de cultivo y mantenimiento de la línea celular T/C-28a2 serán las mismas que las anteriormente detalladas para el cultivo primario de condrocitos.

3.3. **Estimulación celular.**

Con el fin de simular las condiciones a estudiar, los cultivos celulares deben ser estimulados para poder valorar posteriormente los cambios experimentados. En este caso, queremos simular condiciones de estrés por glucosa, un evento que habitualmente tiene lugar en pacientes

diabéticos, con una respuesta inflamatoria. Además, se añadirán los donadores de H₂S para estudiar su efecto en relación con el proceso inflamatorio. Cuando los condrocitos procedentes del primer subcultivo alcancen la confluencia, los cultivos serán deplecionados. Para ello, se incubarán 48 horas en DMEM con 0,5% de SBF. La estimulación se llevará a cabo en medio de cultivo al 0% de SBF para que las células presenten un estado quiescente. Los estímulos empleados en este estudio serán los siguientes:

- DMEM 1 g/L para simular las condiciones de glucosa normales.
- DMEM 4,5 g/L (Lonza) para simular las condiciones de estrés por glucosa.
- IL-1 β (Sigma-Aldrich) a una concentración de 5 ng/ml para inducir la respuesta inflamatoria.
- NaSH (Sigma-Aldrich) a una concentración de 500 μ g/ml, para aumentar los niveles de H₂S rápidamente.
- GYY4137 (Santa Cruz Biotechnology), a una concentración de 500 μ g/ml para aumentar los niveles de H₂S lentamente.

Las concentraciones seleccionadas para cada uno de los estímulos empleados se basan en estudios previos (Burguera et al., 2014; Vaamonde-García et al., 2012; Vela-Anero et al., 2017)

4. Detección de ERO mediante citometría de flujo.

Los condrocitos se sembrarán y cultivarán en placas de 24 pocillos a una densidad de 100.000 células por pocillo. Tras 3 y 18 horas desde el tratamiento de las muestras, la producción de ERO será medida utilizando un ensayo fluorimétrico con diacetato de diclorodihidrofluoresceína (DCF-DA) (Sigma-Aldrich). El DCF-DA es una sonda que no emite fluorescencia pero, al entrar en contacto con las ERO en el citoplasma celular, se esterifica y pasa a ser diclorofluoresceína (DFC), compuesto que sí emite fluorescencia verde. De esta forma, los condrocitos serán incubados con DCF-DA diluido en el medio de cultivo durante 30 minutos a 37°C en la oscuridad. Posteriormente, los condrocitos deberán ser lavados con tampón fosfato salino (PBS; *Phosphate Buffered Saline*), y la fluorescencia será medida con un citómetro de flujo BD FACScalibur (Becton Dickinson) para un total de 10000 eventos usando el canal FL-2.

5. Silenciamiento génico por transfección de ARN pequeño de interferencia (ARNip).

La transfección de ARNip se hará por electroporación y para ello se utilizará el nucleofactor *Nucleofector*[®] *Device* (Amaxa) y el kit comercial *Amaxa Cell Line Nucleofactor. Kit V*

(Amaxa) siguiendo las indicaciones del fabricante. Además, como se indicó anteriormente, para la realización de esta técnica se utilizará la línea celular T/C-28a2, unas células que presentan una buena respuesta a la transfección.

En este caso, se transfectará aproximadamente un millón de células con un ARNip aleatorio que no interfiere con la transcripción de ningún ARNm a una concentración de 300 nM, y que servirá como control negativo de silenciamiento; y otro millón de células con una mezcla de 3 secuencias diferentes de ARNip específicas para el silenciamiento del ARNm de Nrf-2, a una concentración de 100 nM cada una. Por otra parte, también se emplearán células sin transfectar, que servirán de control.

En primer lugar, será necesario levantar las células con tripsina 1x que será inactivada con DMEM al 10% SBF el cual, tras centrifugar, deberá ser eliminado del cultivo celular ya que la transfección ha de hacerse con el tampón específico incluido en el kit comercial. A continuación, se añadirá el ARNip, se resuspenderá la muestra y se introducirá en el nucleofactor por medio de una cubeta estéril que incluye el kit, seleccionando el programa x-001, que es el que recomienda el fabricante para este tipo de células. Por último, las células transfectadas se colocarán en las diferentes placas de cultivo con DMEM glucosa 1 gr/L para su estabilización, crecimiento y posterior estimulación.

6. Análisis de la expresión génica.

6.1. Extracción de ARN.

El ARN celular será aislado utilizando el reactivo *TRI Reagent*[®] (Molecular Research Center), el cual lisa los componentes celulares al mismo tiempo que desnaturaliza tanto las proteínas que están unidas al ARN como las que lo degradan (ARNasas). Para ello, se seguirán las instrucciones del fabricante y se trabajará en hielo para evitar la degradación del ARN. En primer lugar, se eliminará el DMEM de los pocillos, se lavará con PBS y se añadirá el *TRI Reagent*[®]. Tras 10 minutos de incubación, se adicionará cloroformo (Sigma-Aldrich), se incubará 10 min y se centrifugará a 12000 rpm y a 4°C durante 15 minutos. El cloroformo hace que se diferencien tres fases en la mezcla: una acuosa, que contiene el ARN; una interfase, en la cual está el ADN; y una orgánica, con los restos de estructuras no digeridas. Por tanto, habrá que recuperar la fase acuosa y se añadirán isopropanol (Sigma-Aldrich) y glucógeno (Sigma-Aldrich), que ayudan a la precipitación del ARN. A continuación, se incubará 10 minutos a temperatura ambiente y se centrifugará a 12000 rpm y a 4°C durante 10 minutos. El pellet resultante habrá que lavarlo con etanol al 75%, ya que favorece la precipitación de ARN, y se

llevará a cabo una última centrifugación a 7500 rpm durante 5 minutos a 4°C. Por último, se resuspenderá el pellet en 15 µL de agua libre de ARNasas y se cuantificará su concentración con el espectrofotómetro NanoDROD ND-1000 (Thermo Fisher Scientific) midiendo la absorbancia de la muestra a 260 nm. Los ratios A260/280 y A260/230 permiten verificar la calidad y la pureza del ARN.

6.2. Tratamiento con ADNasa y retrotranscripción.

Con el fin de eliminar cualquier posible contaminación de ADN, la muestra será tratada con la enzima desoxirribonucleasa (ADNasa I) (Fermentas) siguiendo el protocolo del fabricante. Esta enzima cataliza la escisión hidrolítica de los enlaces fosfodiéster de la molécula de ADN, llevando a su degradación. De esta forma, una vez cuantificada la concentración de ARN de las muestras, habrá que ajustar la concentración de ARN a 1000 ng, añadir 1 µL de ADNasa y completar con H₂O hasta un volumen final de 10 µL. Una vez hecha la mezcla, se incubará en el termociclador durante 30 minutos a 37°C. Después se inactivará la enzima para que no esté presente en el resto del proceso añadiendo 1 µL de EDTA a la muestra e incubando 10 minutos a 65°C.

Una vez realizado el tratamiento con ADNasa, se podrá llevar a cabo la retrotranscripción, que permite la generación de ADN complementario (ADNc) a partir de ARNm mediante el uso de la enzima transcriptasa reversa.

Para realizar dicho proceso, se utilizará el kit comercial *NZY First-Strand cDNA Synthesis Kit* (NZY) que incluye una combinación de hexámeros aleatorios y oligos dT (*NZYRT 2x Master Mix*) que se unen a la cola poliA característica del ARNm e inician la síntesis de la hebra de ADNc. Además, el kit incluye una mezcla de enzimas (*NZYRT Enzime Mix*) que contiene la transcriptasa reversa y un inhibidor de ribonucleasas que evita que degraden el ARN.

De esta forma, y siguiendo el protocolo incluido en el kit, se añadirán a la muestra 10 µL de *NZYRT 2x Master Mix*, 2 µL de *NZYRT Enzime Mix* y se llevará hasta 20 µL con H₂O libre de ARNasas. El resultante ha de ser incubado a 25°C durante 10 minutos, después 30 minutos a 50°C y, a continuación, se inactivará la reacción aumentando la temperatura a 85°C durante 5 minutos y poniendo seguidamente la muestra a 4°C. Por último, para eliminar los posibles restos de ARN, se añadirá 1 µL de ribonucleasa *NZY Rnase H* y se incubará a 37°C durante 20 minutos. El ADNc resultante podrá ser almacenado a -20°C.

6.3. Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR).

Para poder cuantificar la expresión de los genes estudiados, es necesario amplificar el ADNc obtenido anteriormente. Para ello se cargará una placa de 96 pocillos con los componentes necesarios para llevar a cabo la qPCR, es decir, un molde de ADN; dos cebadores específicos para la región que se quiera amplificar; dNTPs; MgCl₂, que funciona como tampón de reacción; una ADN polimerasa termoestable (Taq polimerasa); el fluoróforo *SYBR Green* (Roche), que se unirá se une al ADN de doble cadena permitiendo su detección; la muestra y H₂O hasta un volumen final de 10 µL. Todas las muestras se harán por duplicado.

La reacción se llevará a cabo en un termociclador y se producirán de manera automática una serie cambios de temperatura necesarios para la correcta realización de la prueba (Tabla 1).

Tabla 1. Fases de la Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

PASO	TEMPERATURA (°C)	TIEMPO (t)	CICLOS
Activación de la ADN polimerasa	95°C	10 min	1
Desnaturalización	94°C	10 s	45
Hibridación	55 - 72°C	30 s	
Elongación	72°C	1 min	
Elongación final	72°C	5 min	1

Los genes estudiados estarán relacionados con la síntesis de sulfuro (CBS, CSE y MST), con el sistema Nrf-2/HO-1 (Nrf-2, HO-1, Keap1) y con la respuesta inflamatoria (IL-8, IL-6, COX-2). También será necesario medir la expresión de un gen *housekeeping*, en este caso el gen RPLP, que se expresa constitutivamente bajo cualquier condición y tiene unos niveles de expresión similares a los de interés, permitiéndonos así normalizar los resultados. Además, se realizará un control negativo con H₂O para comprobar que no hay contaminación. Por último, mediante el modelo matemático $\Delta\Delta C_t$ se establecerá la expresión relativa de cada gen, normalizando las condiciones con respecto al basal.

7. **Análisis de la expresión proteica.**

7.1. Extracción de proteínas.

Para poder realizar el aislamiento de las proteínas de la muestra, será necesario un tampón de lisis (Tabla 4) que va a degradar los componentes no proteicos de la muestra, al que se le añadirá un 1% del inhibidor de proteasas fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 0.1M (Sigma-

Aldrich), que ayudará a la degradación de proteínas, y un 1% de cóctel de inhibidores (Sigma-Aldrich) que evita que sucedan modificaciones postraduccionales como la fosforilación.

En primer lugar, y trabajando en todo momento en frío, habrá que retirar el medio de los pocillos y lavar con PBS. A continuación, se añadirá un volumen de tampón suficiente para lisar el fondo de la placa. Se dejará en agitación durante 10 minutos y se recogerán las muestras. A continuación, se hervirán en el termobloque 10 minutos a 100°C para favorecer la lisis y romper estructuras tridimensionales. Posteriormente, se centrifugarán durante 5 minutos a 12500 rpm para recuperar en el sobrenadante las proteínas digeridas. La cuantificación proteica se llevará a cabo con el NanoDROP ND-1000 a una longitud de onda de 280 nm.

7.2. Western blot.

Con el fin de cuantificar la expresión de las proteínas estudiadas, se realizará un Western blot como ha sido descrito previamente (Vaamonde-Garcia et al., 2017).

7.2.1. Electroforesis.

En primer lugar, se separarán las proteínas de interés mediante una electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS; SDS-PAGE: *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*), donde las proteínas serán desnaturalizadas y cargadas negativamente para que la migración dependa únicamente de su peso molecular. Para realizarla, será necesario hacer un gel al 10% de Acrilamida/Bisacrilamida (Sigma-Aldrich) de 1,5 mm de grosor que consta de una parte concentradora y otra separadora y cuya composición se indica en las Tablas 2 y 3. Entre los componentes del gel se encuentran el tetrametiletilendiamina (TEMED; Sigma-Aldrich), que cataliza la polimerización, y el persulfato de amonio (APS; Sigma-Aldrich) que actúa como iniciador de ésta.

Tabla 2. Composición del gel concentrador.

Gel concentrador	
Acrilamida/Bis	400 µL
H ₂ O	2,2 mL
Tris 1M pH 6.8	375 µL
SDS 10%	30 µL
APS 20%	12 µL
TEMED	3 µL

Tabla 3. Composición del gel separador.

Gel separador	
Acrilamida/Bis	3,33 mL
H ₂ O	4,64 mL
Tris 2M pH 6.8	1,88 mL
SDS 10%	100 µL
APS 20%	25 µL
TEMED	12 µL

Antes de cargar el gel, habrá que hervir las muestras en el termobloque a 100°C durante 5 minutos para desnaturalizar las proteínas con el tampón de carga 1x (Tabla 4) que contiene, entre otros componentes, glicerol, que es un alcohol que facilita la carga de los pocillos aumentando la densidad de la muestra; azul de Bromoefenol, colorante que permite observar la migración de las proteínas; y β -mercaptoetanol, agente reductor que rompe los puentes disulfuro de las estructuras proteicas. Cada pocillo se cargará con 20 μ g de muestra y, después se iniciará la electroforesis SDS-PAGE en la cámara de electroforesis (Bio-rad) con tampón de electroforesis (Tabla 4) a 80 V durante 2 horas.

7.2.2. Transferencia.

En la transferencia, las proteínas cargadas negativamente se van a adherir a una membrana tras migrar hacia el polo positivo bajo efecto de un campo eléctrico generado externamente. En este caso, se utilizará una membrana de PVDF (Millipore) que requiere un pretratamiento con metanol por su naturaleza hidrófoba.

Tabla 4. Relación de tampones utilizados en la extracción de proteína y Western blot y su composición.

TAMPÓN	COMPOSICIÓN
Tampón de lisis	0,2 M Tris-HCl pH 6.8, 2% SDS, 20% Glicerol
Tampón de carga	10% SDS, 200 mM Tris-Clorhídrico pH 6.8, 50% Glicerol, 0,1% Azul de Bromofenol, 10% β -mercaptoetanol
Tampón de electroforesis (10%)	30,3 g Tris Base, 144 g glicina, 10 g SDS
Tampón de transferencia (10%)	58g Tris Base, 29 g glicina, 3,7 g SDS
Tampón de lavado (10%)	2mM Tris-base, 150 mM NaCl (ajustar el pH a 7.5)

En este caso se va a realizar una transferencia semiseca en la cámara de transferencia semiseca *Transblot semi-dry Transfer Cell* (Bio Rad) a 20 V durante 45 minutos y el conjunto de elementos tiene que estar humedecido con el tampón de transferencia. El montaje se realizará a modo de “sándwich”, colocando de abajo a arriba: papel absorbente, membrana, gel, papel absorbente. Finalizado el montaje, se efectuará la transferencia semiseca a un voltaje de 20 V durante 45 minutos.

A continuación, para verificar que la transferencia se haya realizado correctamente, se realizará una tinción con rojo Ponceau que permitirá observar si las proteínas se han transferido a la membrana desde el gel.

7.2.3. Inmunodetección.

El primer paso de la inmunodetección es incubar la membrana con leche (Sigma-Aldrich) al 5% durante 40 minutos en agitación para poder bloquear los sitios de unión inespecíficos. Una vez bloqueada la membrana, hay que incubarla con los anticuerpos primarios para las proteínas de interés (Tabla 5) toda la noche a 4°C.

Tabla 5. Anticuerpos primarios y secundarios utilizados en el Western blot.

Anticuerpo 1°	Dilución	Anticuerpo 2°	Dilución
Nrf-2 (Santa Cruz Technology)	1:200	Anti-conejo	1:1000
HO-1 (Enzo Life Sciences)	1:1000		
Keap1 (Santa Cruz Technology)	1:200		
NF-κB p65 (Santa Cruz Technology)	1:200		
CBS (Abcam)	1:200	Anti-ratón	1:500
CSE (Abcam)	1:200		
MST (Santa Cruz Technology)	1:200		
COX-2 (R&D systems)	1:250		
Anti-biotina (Abcam)	1:1000		

Tras la incubación con el anticuerpo primario, se realizarán 3 lavados de 5 minutos en agitación en tampón de lavado con Tween 20 (Sigma-Aldrich) al 0,05% y se realizará la incubación con los anticuerpos secundarios (Tabla 4), que se unen al anticuerpo primario amplificando la señal y permitiendo su detección. El anticuerpo secundario está marcado con peroxidasa de rábano para ser detectable. En este caso, la incubación se realizará durante 1 hora en agitación a temperatura ambiente y después se realizan de nuevo 6 lavados de 5 minutos en agitación en tampón de lavado.

Por último, habrá que llevar a cabo el revelado de la membrana. Para ello, se usará una cámara de revelado de quimioluminiscencia (Bio-rad) y se añadirán a la membrana aproximadamente 200 µl de reactivo de detección *ECL Select* (Millipore) que es un sustrato quimioluminiscente al que se unirá la peroxidasa de rábano, produciendo una señal que se registra en la cámara. En función de la señal que tenga la membrana, necesitará un mayor o menor tiempo de exposición para revelar la imagen.

Para poder comprobar que la cantidad de proteína es igual en todas las muestras, será necesario hacer un control de carga. Este control se realizará con tubulina, proteína cuya expresión es

constitutiva y no está alterada por ninguna de las condiciones experimentales empleadas en nuestros estudios. Para ello, hay que seguir el mismo proceso de incubación detallado anteriormente pero, en este caso, el anticuerpo primario se incubará 1 hora. De esta manera, el revelado de la tubulina sirve para normalizar los datos obtenidos a través del Western blot.

8. Tag-switch.

Esta técnica permite etiquetar y detectar selectivamente los residuos sulfhidrilados de una proteína. Para ello, en primer lugar se hace un bloqueo de los grupos tiol y los persulfuros con metilsulfonil benzotiazol (MSBT). A continuación, se hace un “cambio de etiqueta” (“*switch tag*”) a biotina conjugada con cianoacetato (CN-biotina), que solo se une a los persulfuros, los cuales resultan de la S-sulfhidración. Por último, los grupos marcados se capturan por inmunoprecipitación y se detectan por Western blot (Park, Macinkovic, Filipovic, & Xian, 2015).

A través del método Tag-switch se detectará la S-sulfhidración de keap1 y de la subunidad p65 de NF- κ B. Para ello, según ha sido previamente descrito (Xie et al., 2016), la proteína a detectar será tratada con MSBT y, a continuación, con CN-biotina. Después, la muestra se disolverá en tampón Laemmli, se calentará y se realizará un Western blot utilizando el anticuerpo anti-biotina (Santa Cruz Technology) (Tabla 5).

9. Ensayo de ELISA de PGE₂, IL-8 e IL-6.

Los niveles de PGE₂, IL-8 e IL-6 serán determinados mediante el ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), utilizando para ello los kits *Prostaglandin E2 ELISA Kit – Monoclonal* (Cayman) y *DUOset® human IL-8 y IL-6* (R&D Systems) siguiendo el protocolo proporcionado por los fabricantes. El ELISA utilizado para medir la PGE₂ es competitivo mientras que el de IL-8 e IL-6 son ambos un ELISA “sándwich”, es decir, un ensayo de captura de antígeno y detección mediante inmunocomplejos.

Para la correcta realización del ensayo, se recogerán los sobrenadantes de las distintas condiciones en una placa de 96 pocillos y se seguirá el protocolo proporcionado por la casa comercial. La densidad óptica será medida a una absorbancia de 405 nm en un lector de placas.

El rango de trabajo se establecerá entre 0,6, and 7,8 pg/mL para IL-6; entre 1,0 y 240 pg/mL para IL-8 y entre 2,5 y 230 pg/pocillo para PGE₂.

10. Inmunofluorescencia.

Este ensayo permite la localización de moléculas en células en cultivo mediante anticuerpos marcados y se realizará tal y como ha sido descrito previamente (Pooladanda et al., 2019). Tras la estimulación, las células se lavarán con PBS y se fijarán con acetona durante 10 minutos a 4°C. A continuación, se harán 3 lavados con PBS y se dejará secar a temperatura ambiente. Tras esto, habrá que lavar las células con PBS con Tween 20 al 0,2% y permeabilizarlas con Tritón-X (Sigma) al 0,1%. Además, se incubarán en primer lugar en tampón de bloqueo PBS con 1% de Albúmina de suero bovino (ABS; Sigma-Aldrich) durante 1 hora para evitar uniones inespecíficas y después con el anticuerpo primario frente a la subunidad p65 de NF-kb (Santa Cruz Technology) durante toda la noche a 4°C.

Al día siguiente, se lavarán las células y se incubarán con el anticuerpo secundario durante 1 hora a temperatura ambiente. El anticuerpo secundario está conjugado con el fluoróforo FITC (DAKO A/S) y se utilizará a una dilución de 1:200. Para visualizar los núcleos celulares se empleará la tinción DAPI. Por último, los cubreobjetos se montarán con el medio acuoso de montaje *Glycergel* (Sigma-Aldrich). Las imágenes serán capturadas con el microscopio de fluorescencia Olympus BX61 (Olympus Biosystems). Además, la cuantificación de la fluorescencia será llevada a cabo con el programa de procesamiento de imagen digital ImageJ versión 1.52p (National Institutes of Health).

11. Análisis estadístico.

Los datos obtenidos a partir de los experimentos serán analizados con el programa *GraphPad Prism 7* (GraphPad Software) de forma que cada experimento se representará con un punto, indicándose la desviación estándar para representar el error. Para el análisis se aplicarán pruebas de análisis de varianza (ANOVA) con la prueba de *Tukey's post hoc tests*. Para las muestras apareadas, se utilizará la prueba de los rangos con signo de Wilcoxon. Los valores $p \leq 0,05$ serán considerados estadísticamente significativos.

PLAN DE TRABAJO

El tiempo necesario para la correcta realización del proyecto será de 1 año. A continuación, en la Tabla 6 se refleja la secuencia de tareas programadas en función del tiempo expresado en meses.

Tabla 6. Cronograma que representa el plan de trabajo relativo al proyecto descrito.

Tareas	Mes											
	1°	2°	3°	4°	5°	6°	7°	8°	9°	10°	11°	12°
METODOLOGÍA												
Obtención de muestras	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
Cuantificación de H ₂ S en sangre	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
Detección de ERO por citometría de flujo	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
Transfección de ARN	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
Cuantificación génica	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
Cuantificación proteica y tag-switch	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
Ensayo ELISA	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
Inmunofluorescencia	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
CONCLUSIONES												
Análisis estadístico de los datos obtenidos	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
Redacción del artículo científico	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
DIFUSIÓN DE LOS RESULTADOS												
Publicación del estudio	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
Participación en congresos	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
Participación en jornadas divulgativas	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■

CUESTIONES ÉTICAS

El procedimiento para obtener las muestras deberá ser aprobado por el Comité de Ética de Investigación de Galicia de forma que todos los métodos se realizarán de acuerdo con las directrices y reglamentaciones pertinentes cumpliendo con los requisitos éticos de la Ley 14/2007 del 3 de julio del Comité de Ética de Galicia, y la ley 1716/2011 del 18 de noviembre de Investigación Biomédica. En base a esto y según la Declaración de Helsinki (“World Medical Association Declaration of Helsinki: ethical principles for medical research involving human subjects.” 2013), se entregará a todos los participantes de la investigación la información (ANEXO I) y la hoja de consentimiento informado (ANEXO II) para que sus muestras biológicas y datos clínicos puedan ser susceptibles de ser utilizados en este estudio.

APLICABILIDAD

La asociación epidemiológica de la OA y la DM2 es sólida pero los mecanismos que vinculan a ambas enfermedades siguen sin estar del todo claros, así como la influencia que se ejercen mutuamente. Por ejemplo, actualmente se desconoce si el control y la prevención de la DM2 pueden modular la aparición y la progresión de la OA. En esta línea, los resultados obtenidos a través de este proyecto podrían esclarecer los mecanismos de conexión entre ambas enfermedades.

Por otro lado, la ausencia de un tratamiento reversible y eficaz para la DM2 y la OA, más allá del paliativo del dolor articular, hace que resulte urgente abrir la vía de posibles tratamientos alternativos. En este sentido, hay hallazgos previos que sugieren la aplicabilidad terapéutica a través del H₂S, el cual tiene un gran potencial por su involucración en múltiples procesos fisiológicos y patológicos.

Por ejemplo, la incorporación de sales inorgánicas de sulfuro como NaSH o Na₂S a la dieta del paciente es una posible vía. Se ha demostrado mediante este tipo de administración que el efecto vasodilatador del H₂S podría tener aplicaciones terapéuticas en patologías del sistema cardiovascular (Powell, Dillon, & Matson, 2018).

En relación con su efecto antiinflamatorio y su papel ante el estrés oxidativo, la combinación de H₂S con fármacos es una opción muy interesante. Un estudio reciente prueba que la administración de H₂S a través del donador GYY4137 con naproxeno reporta beneficios en el tratamiento de íleo postoperatorio (IPO) (Van Dingenen, Pieters, Vral, & Lefebvre, 2019).

Por otro lado, se ha probado la inhalación directa de H₂S para disminuir la inflamación pulmonar y sistémica (Zhao, Biggs, & Xian, 2014). No obstante, es difícil establecer una concentración óptima y controlarla durante la administración del gas para que no se produzca toxicidad por exceso de H₂S, por lo cual es necesario seguir investigando en ese aspecto.

También existen medicamentos liberadores de H₂S, como es el caso del SG1002 para los trastornos cardiovasculares y el ATB-346 para la artritis que han demostrado ser muy prometedores aunque es necesario comprender bien sus mecanismos de acción por los efectos secundarios que puedan ocasionar (Wallace et al., 2018).

Además, se han obtenido resultados positivos administrando el H₂S a través de la balneoterapia como un baño de agua sulfurosa, lo cual sugiere que la aplicación exógena de H₂S puede proporcionar una opción terapéutica viable para estas enfermedades, particularmente para la

OA (Vaamonde-García et al., 2020). Aun así y como en los casos descritos anteriormente, esta opción debe ser estudiada más a fondo.

PLAN PARA LA DIFUSIÓN DE LOS RESULTADOS

A la hora de difundir los resultados, se partirá del concepto de Ciencia Abierta, que es el movimiento que pretende que la investigación científica, los datos científicos y la difusión de la ciencia sean accesibles a todos los niveles de la sociedad. De esta forma, los hallazgos realizados serán compartidos de manera pública, por un lado, a través de una publicación en una revista científica. Para asegurar la completa accesibilidad, será un artículo *Open Access*, es decir, no requerirá de registro, suscripción o pago para su lectura.

Por otro lado, se participará en dos congresos científicos. En primer lugar, en el “XLVII Congreso Nacional de la SER (Sociedad Española de Reumatología)” que se celebrará en octubre de 2021 en Madrid (España). Y en segundo lugar, en el *OARSI World Congress*, que está organizado por la Sociedad Internacional de Investigaciones sobre Osteoartritis (OARSI; *Osteoarthritis Research Society International*) y que tendrá lugar el 29 de abril de 2021 en Denver (EEUU).

De manera adicional, se participará en jornadas de divulgación científica relacionadas con las enfermedades reumáticas, como es el caso de la jornada *Mechanisms of aging-related diseases V* organizada por el INIBIC y celebrada en el CHUAC, a fin de difundir los resultados en el ámbito científico y médico. Por otro lado, se participará, a nivel didáctico, en seminarios organizados por la Universidad de la Coruña (UDC) relacionadas con la investigación científica.

RECURSOS NECESARIOS

1. Recursos disponibles, infraestructura y/o equipo singular.

El proyecto se desarrollará en los laboratorios de investigación del Instituto de Investigación Biomédica de A Coruña (INIBIC). En relación con el equipamiento, el INIBIC cuenta con todas las instalaciones necesarias para desarrollar con éxito todas las tareas incluidas en la propuesta:

- Laboratorio de biología celular totalmente equipado, cabinas de bioseguridad de clase II, incubadoras de células y otros equipos necesarios para la rutina de cultivo de células primarias (microscopios invertidos, centrífugas, agitadores, baño termostático, etc.).

- Equipo para la caracterización de tejidos y células: citómetro de flujo (BD FACScalibur), lector de placas de luminiscencia (Tecan), ultracentrífuga (Beckman Coulter Optima L90K).
- Equipo de histomorfología: microscopio de fluorescencia (Olympus BX61).
- Equipo de biología molecular: espectrofotómetro (NanoDrop ND-1000), dos termocicladores (GeneAmp PCR Systems 9700 de Applied Biosystems y Roche LightCycler 480 II), dos termocicladores de gradiente (Applied Biosystems ambos), electrodo selectivo de iones (Lazar Research Lab. Inc), voltímetro (Jenco Electronics) y nucleofactor (Amaxa).
- Equipo para el análisis de las proteínas: cubetas de electroforesis SDS-PAGE (BioRad), cámara de transferencia semiseca (BioRad), espectrofotómetro (Labsystem multiscan Plus), lavador de placas ELISA (Labsystem multiwash), micropipetas multicanal y otro material necesario para la realización de los ensayos bioquímicos y luminometría propuestos.

Las instalaciones también cuentan con diversos equipos de laboratorio comunes, como balanzas, agitadores magnéticos, termobloques, medidores de pH, microcentrífugas, micropipetas, etc. Además, el INIBIC cuenta con la siguiente infraestructura de Biobancos: congeladores 80°C con sistema de alarma de temperatura (alarmas remotas y telefónicas); un robot congelador 20°C con brazo mecánico para insertar y extraer muestras; *software* de gestión de muestras NorayBanks. Por último, también se contará con el apoyo de la Unidad de Epidemiología Clínica y Bioestadística del INIBIC para la realización de análisis estadísticos.

2. Presupuesto.

2.1. Gastos de Personal.

Tabla 7. Relación de gastos de personal.

Perfil	Coste Imputable	Justificación de necesidad
Doctorado	25.290,00 €	Gastos de contratación fijos del IP
Total	25.290,00 €	

2.2. Gastos de Ejecución.

2.2.1. Viajes y dietas.

Tabla 8. Relación de gastos de ejecución asociados a viajes y dietas.

Descripción	Coste Imputable	Justificación de uso
Gastos derivados de la asistencia a congresos	3.500,00 €	Como parte de plan de difusión de resultados del proyecto, se enviarán los hallazgos preliminares a congresos científicos nacionales e internacionales. Merece especial atención el <i>OARSI World Congress</i> , al que van los mejores y más novedosos trabajos en este campo. Nos parece fundamental la asistencia a este congreso, ya que tendrá una función de retroalimentación de nuestro trabajo, actualización de nuevos aspectos en la enfermedad, y de <i>networking</i> con otros investigadores internacionales. Por otra parte, también está prevista la asistencia al Congreso Nacional de la SER organizado por la Sociedad Española de Reumatología.
Total Viajes y dietas	3.500,00 €	

2.2.2. Otros gastos.

Tabla 9. Relación de otros gastos de ejecución.

Descripción	Coste Imputable	Justificación de uso
Coste de informe de auditoría	1.200,00 €	Gastos imputables
Inscripción a congresos y otros eventos científicos	2.000,00 €	Como parte de plan de difusión de resultados del proyecto, se enviarán los hallazgos preliminares a los congresos científicos nacionales e internacionales citados.
Gastos derivados de publicaciones	3.500,00 €	Acorde con el plan de difusión del proyecto, está previsto publicar los hallazgos obtenidos en una revista de alto impacto en el campo de la biomedicina y reumatología. Además, al ser una revista <i>Open Access</i> tendrá una cuota de pago por publicación. Al que habría que añadirle, para alguno de los casos, un servicio de editado científico.
Total Otros gastos	6.700,00 €	

2.2.3. Adquisición de inventariable.

Tabla 10. Relación de gastos de ejecución asociados a la adquisición de inventariable.

Descripción	Coste Imputable	Justificación de uso
Disco duro de almacenamiento y programa informático estadístico (SPSS)	1.200,00 €	Debido al volumen de datos generados, se necesitará un soporte físico de almacenamiento. A su vez, para el análisis estadístico de los resultados obtenidos está previsto comprar la licencia para el programa estadístico SPSS.
Total Adquisición de inventariable	1.200,00 €	

2.2.4. Fungibles y similares.

Tabla 11. Relación de gastos de ejecución asociados a fungibles y similares.

Descripción	Coste Imputable	Justificación de uso
Biología molecular	10.000,00 €	<p>Biología molecular: Para los modelos <i>in vitro</i> se realizarán estudios de expresión proteica y génica, además de ELISAs.</p> <ul style="list-style-type: none"> - Secuencias para silenciamiento de Nrf-2 y control negativo. - Reactivos para la cuantificación de sulfuro de hidrogeno (NaSH, NaS). - Fluoróforos para niveles de ERO (citometría) - <i>TRI Reagent</i>[®] para extracción de ARN. - <i>DNAasa I</i> y “NZY First-Strand cDNA Synthesis Kit” para retrotranscripción. - Cebadores y tampón para realizar los ensayos de PCR a tiempo real. - Material y reactivos para realizar western blot: membranas de transferencia, papel absorbente, reactivo de revelado ECL, SDS, APS, TEMED, acrilamida/bisacrilamida. - Anticuerpos primarios y secundarios. - Kit de ELISAs: <i>Prostaglandin E₂ ELISA Kit – Monoclonal</i> y <i>DUOset[®] human IL-8 y IL-6</i>.
Material para cultivos celulares	6.000,00 €	<p>El cultivo celular será necesario para llevar a cabo el modelo <i>in vitro</i> de estrés por altos niveles glucosa en los condrocitos. Y comprende:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Medio de cultivo DMEM 4.5 g/L de glucosa y 1 g/L glucosa - Material plástico: Placas de cultivo de diferentes dimensiones y pocillos, frascos cultivo, tubos de diferentes volúmenes. - Suero bovino fetal. - Kit de transfección por electroporación <i>Amaxa Cell Line Nucleofactor. Kit V</i>. - Estímulos para experimentos: IL-1beta (citoquina procatabólica), NaSH y GYY4137 (donadores de H₂S), Antimicina AA (control positivo de producción de ROS). - Tripsina para subcultivos. - Antibióticos para evitar contaminaciones. - Filtros de 0,22 micrómetros desechables - Escalpelos y pinzas desechables - Colagenasa para extracción de los condrocitos a partir de muestras de cartilago.
Técnicas inmunohistoquímicas. Plataforma de Histomorfología-INIBIC	1000,00 €	<p>Material necesario para realizar el análisis de inmunofluorescencia de las muestras obtenidas partir de modelo <i>in vitro</i>.</p> <ul style="list-style-type: none"> - Anticuerpos primarios y secundarios marcados.
Total Fungibles y similares	18.000,00 €	

2.3. Resumen del presupuesto (Costes Marginales).

Tabla 12. Resumen del presupuesto del proyecto.

Tipo Coste	Concepto	Coste Imputable
Costes Directos	Gastos de Personal	25.290,00 €
	Viajes y dietas	3.500,00 €
	Otros gastos	6.700 €
	Adquisición de inventariable	1.200 €
	Alquiler de inventariable	0,00 €
	Mantenimiento de inventariable	0,00 €
	Fungible y similares	17.000 €
Total Costes Directos		53.690,00 €

BIBLIOGRAFÍA

- Batlle-Gualda, E., Benito, P., Blanco, F. J., & Martín, E. (2002). *Manual S.E.R. de la Artrosis* (Rottapharm). Sociedad Española de Reumatología.
- Bełtowski, J., Wójcicka, G., & Jamroz-Wiśniewska, A. (2018). Hydrogen sulfide in the regulation of insulin secretion and insulin sensitivity: Implications for the pathogenesis and treatment of diabetes mellitus. *Biochemical Pharmacology*, *149*, 60–76. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2018.01.004>
- Berenbaum, F. (2008). Osteoarthritis. Pathology and Pathogenesis. *Primer on the Rheumatic Diseases: Thirteenth Edition*, 235–240. https://doi.org/10.1007/978-0-387-68566-3_11
- Blanco, F. J., Guitian, R., Vázquez-Martul, E., De Toro, F. J., & Galdo, F. (1998). Osteoarthritis chondrocytes die by apoptosis: A possible pathway for osteoarthritis pathology. *Arthritis and Rheumatism*, *41*(2), 284–289. [https://doi.org/10.1002/1529-0131\(199802\)41:2<284::AID-ART12>3.0.CO;2-T](https://doi.org/10.1002/1529-0131(199802)41:2<284::AID-ART12>3.0.CO;2-T)
- Burguera, E. F., Vela-Anero, Á., Gato-Calvo, L., Vaamonde-García, C., Mejjide-Failde, R., & Blanco, F. J. (2019). Hydrogen sulfide biosynthesis is impaired in the osteoarthritic joint. *International Journal of Biometeorology*. <https://doi.org/10.1007/s00484-019-01823-w>
- Burguera, E. F., Vela-Anero, Á., Magalhães, J., Mejjide-Failde, R., & Blanco, F. J. (2014). Effect of hydrogen sulfide sources on inflammation and catabolic markers on interleukin 1 β -stimulated human articular chondrocytes. *Osteoarthritis and Cartilage*, *22*(7), 1026–1035. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2014.04.031>
- Courties, A., & Sellam, J. (2016). Osteoarthritis and type 2 diabetes mellitus: What are the links? *Diabetes Research and Clinical Practice*, *122*(October), 198–206. <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2016.10.021>
- Ea, H.-K., Bazille, C., & Lioté, F. (2008). Histología y fisiología de la membrana sinovial. *EMC - Aparato Locomotor*, *41*(4), 1–6. [https://doi.org/10.1016/s1286-935x\(08\)70912-2](https://doi.org/10.1016/s1286-935x(08)70912-2)

- Fortoul, T. (2019). Histología y Biología Celular. In *Journal of Chemical Information and Modeling* (Vol. 53). <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Francisqueti-Ferron, F. V., Ferron, A. J. T., Garcia, J. L., Silva, C. C. V. de A., Costa, M. R., Gregolin, C. S., ... Correa, C. R. (2019). Basic Concepts on the Role of Nuclear Factor Erythroid-Derived 2-Like 2 (Nrf2) in Age-Related Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(13). <https://doi.org/10.3390/ijms20133208>
- Goldring, M. B., Birkhead, J. R., Suen, L., Yamin, R., Mizuno, S., Glowacki, J., ... Apperleyll, J. F. (1994). Human Chondrocytes. *Society*, 94(December), 2307–2316.
- Hashmp, S. F., Sattar, M. Z. A., Rathore, H. A., Ahmadi, A., & Johns, E. J. (2017). A CRITICAL REVIEW ON PHARMACOLOGICAL SIGNIFICANCE OF HYDROGEN SULFIDE (H₂S) ON NF-κB CONCENTRATION AND ICAM-1 EXPRESSION IN RENAL ISCHEMIA REPERFUSION INJURY. *Acta Poloniae Pharmaceutica*, 74(3), 747–752.
- Hayden, M. S., & Ghosh, S. (2014). Regulation of NF-κB by TNF family cytokines. *Seminars in Immunology*, 26(3), 253–266. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2014.05.004>
- Hunter, D. J., & Bierma-Zeinstra, S. (2019). Osteoarthritis. *The Lancet*, 393(10182), 1745–1759. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(19\)30417-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(19)30417-9)
- Laiguillon, M.-C., Courties, A., Houard, X., Auclair, M., Sautet, A., Capeau, J., ... Sellam, J. (2015). Characterization of diabetic osteoarthritic cartilage and role of high glucose environment on chondrocyte activation: toward pathophysiological delineation of diabetes mellitus-related osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage*, 23(9), 1513–1522. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2015.04.026>
- Marchev, A. S., Dimitrova, P. A., Burns, A. J., Kostov, R. V., Dinkova-Kostova, A. T., & Georgiev, M. I. (2017). Oxidative stress and chronic inflammation in osteoarthritis: can NRF2 counteract these partners in crime? *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1401(1), 114–135. <https://doi.org/10.1111/nyas.13407>
- Marieb, E. N. (2008). *Anatomía y Fisiología Humana* (9ª Edición). Pearson Educación.
- Martel-Pelletier, J., Barr, A. J., Cicuttini, F. M., Conaghan, P. G., Cooper, C., Goldring, M. B., ... Pelletier, J. P. (2016). Osteoarthritis. *Nature Reviews Disease Primers*, 2. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2016.72>
- Melino, S., Leo, S., & Toska Papajani, V. (2019). Natural Hydrogen Sulfide Donors from Allium sp. as a Nutraceutical Approach in Type 2 Diabetes Prevention and Therapy. *Nutrients*, 11(7). <https://doi.org/10.3390/nu11071581>
- Murphy, B., Bhattacharya, R., & Mukherjee, P. (2019). Hydrogen sulfide signaling in mitochondria and disease. *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 33(12), 13098–13125. <https://doi.org/10.1096/fj.201901304R>
- Nasi, S., Ehreichiou, D., Chatzianastasiou, A., Nagahara, N., Papapetropoulos, A., Bertrand, J., ... Busso, N. (2020). The protective role of the 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase (3-MST)-hydrogen sulfide (H₂S) pathway against experimental osteoarthritis. *Arthritis Research & Therapy*, 22(1), 49. <https://doi.org/10.1186/s13075-020-02147-6>
- Nogueira-Recalde, U., Lorenzo-Gómez, I., Blanco, F. J., Loza, M. I., Grassi, D., Shirinsky, V., ... Caramés, B. (2019). Fibrates as drugs with senolytic and autophagic activity for osteoarthritis therapy. *EBioMedicine*, 45, 588–605. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2019.06.049>

- O'Neill, T. W., McCabe, P. S., & McBeth, J. (2018). Update on the epidemiology, risk factors and disease outcomes of osteoarthritis. *Best Practice and Research: Clinical Rheumatology*, 32(2), 312–326. <https://doi.org/10.1016/j.berh.2018.10.007>
- Okamoto, M., Yamaoka, M., Takei, M., Ando, T., Taniguchi, S., Ishii, I., ... Kimura, T. (2013). Endogenous hydrogen sulfide protects pancreatic beta-cells from a high-fat diet-induced glucotoxicity and prevents the development of type 2 diabetes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 442(3–4), 227–233. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.11.023>
- Oliveira, J. M., & Reis, R. L. (2017). Regenerative Strategies for the Treatment of Knee Joint Disabilities. *Studies in Mechanobiology, Tissue Engineering and Biomaterials*, 129–146. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-44785-8>
- Park, C.-M., Macinkovic, I., Filipovic, M. R., & Xian, M. (2015). Use of the “tag-switch” method for the detection of protein S-sulfhydration. *Methods in Enzymology*, 555, 39–56. <https://doi.org/10.1016/bs.mie.2014.11.033>
- Pooladanda, V., Thatikonda, S., Bale, S., Pattnaik, B., Sigalapalli, D. K., Bathini, N. B., ... Godugu, C. (2019). Nimbolide protects against endotoxin-induced acute respiratory distress syndrome by inhibiting TNF- α mediated NF- κ B and HDAC-3 nuclear translocation. *Cell Death & Disease*, 10(2), 81. <https://doi.org/10.1038/s41419-018-1247-9>
- Powell, C. R., Dillon, K. M., & Matson, J. B. (2018). A Review of Hydrogen Sulfide (H₂S) Donors: Chemistry and Potential Therapeutic Applications. *Biochem Pharmacol.*, 176(12), 139–148. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2017.03.040>
- Pró, E. A. (2012). *Anatomía Clínica*. Buenos Aires: Médica Panamericana.
- Pulai, J. I., Chen, H., Im, H.-J., Kumar, S., Hanning, C., Hegde, P. S., & Loeser, R. F. (2005). NF- κ B mediates the stimulation of cytokine and chemokine expression by human articular chondrocytes in response to fibronectin fragments. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 174(9), 5781–5788. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.174.9.5781>
- Renga, B. (2011). Hydrogen sulfide generation in mammals: the molecular biology of cystathionine- β -synthase (CBS) and cystathionine- γ -lyase (CSE). *Inflammation & Allergy Drug Targets*, 10(2), 85–91. <https://doi.org/10.2174/187152811794776286>
- Saklayen, M. G. (2018). The Global Epidemic of the Metabolic Syndrome. *Current Hypertension Reports*, 20(2), 12. <https://doi.org/10.1007/s11906-018-0812-z>
- Saladin, K. S. (2013). *Anatomía y Fisiología. La unidad entre forma y función*. (6ª Edición). Mc Graw Hill.
- Samson, S. L., & Garber, A. J. (2014). Metabolic syndrome. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*, 43(1), 1–23. <https://doi.org/10.1016/j.ecl.2013.09.009>
- Sen, N., Paul, B. D., Gadalla, M. M., Mustafa, A. K., Sen, T., Xu, R., ... Snyder, S. H. (2012). Hydrogen sulfide-linked sulfhydration of NF- κ B mediates its antiapoptotic actions. *Molecular Cell*, 45(1), 13–24. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.10.021>
- Seo, H.-A., & Lee, I.-K. (2013). The role of Nrf2: adipocyte differentiation, obesity, and insulin resistance. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2013, 184598. <https://doi.org/10.1155/2013/184598>

- 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. <https://doi.org/10.1177/1941738109350438>
- Tortora, G. J., & Derrickson, B. (2006). *Principios de Anatomía y Fisiología* (13ª Edició). Editorial Médica Panamericana.
- Vaamonde-García, C., Courties, A., Pigenet, A., Laignillon, M. C., Sautet, A., Houard, X., ... Sellam, J. (2017). The nuclear factor-erythroid 2-related factor/heme oxygenase-1 axis is critical for the inflammatory features of type 2 diabetes-associated osteoarthritis. *Journal of Biological Chemistry*, 292(35), 14505–14515. <https://doi.org/10.1074/jbc.M117.802157>
- Vaamonde-García, C., Riveiro-Naveira, R. R., Valcárcel-Ares, M. N., Hermida-Carballo, L., Blanco, F. J., & López-Armada, M. J. (2012). Mitochondrial dysfunction increases inflammatory responsiveness to cytokines in normal human chondrocytes. *Arthritis and Rheumatism*, 64(9), 2927–2936. <https://doi.org/10.1002/art.34508>
- Vaamonde-García, C., Vela-Anero, Á., Hermida-Gómez, T., Fernández-Burguera, E., Filgueira-Fernández, P., Goyanes, N., ... Meijide-Failde, R. (2020). Effect of balneotherapy in sulfurous water on an in vivo murine model of osteoarthritis. *International Journal of Biometeorology*, 64(3), 307–318. <https://doi.org/10.1007/s00484-019-01807-w>
- Van Dingenen, J., Pieters, L., Vral, A., & Lefebvre, R. A. (2019). The H₂S-releasing naproxen derivative ATB-346 and the slow-release H₂S donor GYY4137 reduce intestinal inflammation and restore transit in postoperative ileus. *Frontiers in Pharmacology*, 10(February). <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00116>
- Vela-Anero, Á., Hermida-Gómez, T., Gato-Calvo, L., Vaamonde-García, C., Díaz-Prado, S., Meijide-Failde, R., ... Burguera, E. F. (2017). Long-term effects of hydrogen sulfide on the anabolic-catabolic balance of articular cartilage in vitro. *Nitric Oxide : Biology and Chemistry*, 70, 42–50. <https://doi.org/10.1016/j.niox.2017.08.004>
- Veronese, N., Cooper, C., Reginster, J.-Y., Hochberg, M., Branco, J., Bruyère, O., ... Scheen, A. (2019). Type 2 diabetes mellitus and osteoarthritis. *Seminars in Arthritis and Rheumatism*, 49(1), 9–19. <https://doi.org/10.1016/j.semarthrit.2019.01.005>
- Vinatier, C., Domínguez, E., Guicheux, J., & Caramés, B. (2018). Role of the inflammation-autophagy-senescence integrative network in Osteoarthritis. *Frontiers in Physiology*, 9(JUN), 1–25. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00706>
- Wallace, J. L., Vaughan, D., Dicay, M., Macnaughton, W. K., & De Nucci, G. (2018). Hydrogen Sulfide-Releasing Therapeutics: Translation to the Clinic. *Antioxidants and Redox Signaling*, 28(16), 1533–1540. <https://doi.org/10.1089/ars.2017.7068>
- Wallace, J. L., & Wang, R. (2015). Hydrogen sulfide-based therapeutics: Exploiting a unique but ubiquitous gasotransmitter. *Nature Reviews Drug Discovery*, 14(5), 329–345. <https://doi.org/10.1038/nrd4433>
- Wang, R. (2002). Two's company, three's a crowd: can H₂S be the third endogenous gaseous transmitter? *The FASEB Journal*, 16(13), 1792–1798. <https://doi.org/10.1096/fj.02-0211hyp>
- Waza, A. A., Hamid, Z., Ali, S., Bhat, S. A., & Bhat, M. A. (2018). A review on heme oxygenase-1 induction: is it a necessary evil. *Inflammation Research : Official Journal of the European Histamine Research Society ... [et Al.]*, 67(7), 579–588. <https://doi.org/10.1007/s00011-018-1151-x>

- World Medical Association Declaration of Helsinki: ethical principles for medical research involving human subjects. (2013). *JAMA*, *310*(20), 2191–2194. <https://doi.org/10.1001/jama.2013.281053>
- Xie, L., Gu, Y., Wen, M., Zhao, S., Wang, W., Ma, Y., ... Ji, Y. (2016). Hydrogen Sulfide Induces Keap1 S-sulfhydration and Suppresses Diabetes-Accelerated Atherosclerosis via Nrf2 Activation. *Diabetes*, *65*(10), 3171–3184. <https://doi.org/10.2337/db16-0020>
- Yusuf, M., Kwong Huat, B. T., Hsu, A., Whiteman, M., Bhatia, M., & Moore, P. K. (2005). Streptozotocin-induced diabetes in the rat is associated with enhanced tissue hydrogen sulfide biosynthesis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *333*(4), 1146–1152. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.06.021>
- Zhang, W., Ouyang, H., Dass, C. R., & Xu, J. (2016). Current research on pharmacologic and regenerative therapies for osteoarthritis. *Bone Research*, *4*(October 2015). <https://doi.org/10.1038/boneres.2015.40>
- Zhao, Y., Biggs, T. D., & Xian, M. (2014). Hydrogen sulfide (H₂S) releasing agents: chemistry and biological applications. *Chemical Communications (Cambridge, England)*, *50*(80), 11788–11805. <https://doi.org/10.1039/c4cc00968a>

ANEXOS

ANEXO I. INFORMACIÓN PARA EL PACIENTE

INFORMACIÓN PARA EL PACIENTE



D. / Dña.:

INTRODUCCIÓN.-

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

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

OBJETIVO DEL PROYECTO.-

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

DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO.-

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

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

RIESGOS.-

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

COMPENSACIÓN.-

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

CONFIDENCIALIDAD.-

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

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

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

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

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

NUEVOS HALLAZGOS Y RESULTADOS.-

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

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

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

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

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

PARTICIPACIÓN VOLUNTARIA.-

Su participación en el proyecto de investigación es totalmente voluntaria.

Si firma el consentimiento informado, confirmará que desea participar.

Puede negarse a participar o retirar su consentimiento en cualquier momento posterior a la firma sin tener que explicar los motivos.

Si decide retirar su consentimiento, su muestra será destruida y sólo se guardará la información obtenida hasta ese momento.

Su no-participación o retirada posterior del consentimiento no afectará en modo alguno a su asistencia médica presente o futura.

OBTENCIÓN DE INFORMACIÓN ADICIONAL.-

Usted puede contactar con cualquier miembro del Servicio de Reumatología del C.H.U. A Coruña si le surge cualquier duda sobre su participación en este proyecto o sobre sus derechos como paciente, en el teléfono 981176399.

En todo momento se pondrán los medios necesarios para facilitarle la información más adecuada.

ANEXO II - CONSENTIMIENTO INFORMADO DEL PACIENTE.



CONSENTIMIENTO INFORMADO DEL PACIENTE

Yo, _____ (nombre del paciente),

He leído la información que se me ha entregado.

He podido hacer preguntas sobre el proyecto.

He recibido suficiente información sobre el mismo.

He hablado de ello con _____

Comprendo que mi participación es voluntaria.

Comprendo que puedo retirar mi consentimiento:

1º. Cuando quiera.

2º. Sin tener que dar explicaciones.

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

Presto libremente mi conformidad para participar en el proyecto.

FIRMA DEL PACIENTE

Nombre

Fecha

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

FIRMA

Nombre

Fecha