

Grao en Bioloxía

Memoria do Traballo de Fin de Grao

Estudo *in vitro* do potencial terapéutico de extractos de algas pardas no tratamento da artrose

Estudio *in vitro* del potencial terapéutico de extractos de algas pardas en el tratamiento de la artrosis

***In vitro* study of therapeutic potential of brown algae extracts in osteoarthritis treatment**

Emma Capelo Mera

Curso: 2021-2022. Convocatoria: xullo

Director: Carlos Vaamonde García



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

Dr. Carlos Vaamonde García, profesor contratado interino do Departamento de Biología da Universidade da Coruña e membro do Grupo de Investigación en Reumatología y Salud (GIR-S) do Instituto de Investigación Biomédica da Coruña (INIBIC),

Informa,

Que o presente Traballo de Fin de Grao presentado por Emma Capelo Mera e con título "Estudo *in vitro* do potencial terapéutico de extractos de algas pardas no tratamento da artrose" foi realizado baixo a súa dirección e, considerándoo finalizado, autoriza o seu envío e presentación ao tribunal calificador.

E, para que así conste, expide o presente informe en A Coruña a 22 de xullo de 2022.

Fdo. Carlos Vaamonde García

**VAAMOND
E GARCIA
CARLOS -
46911149G** Firmado
digitalmente por
VAAMONDE
GARCIA CARLOS -
46911149G
Fecha: 2022.07.22
14:01:43 +02'00'

RESUMO

A artrose é unha patoloxía dexenerativa das articulacións cunha prevalencia do 29,35% na poboación española maior de 40 anos. Caracterízase pola degradación da cartilaxe hialina, cuxo único tipo celular son os condrocitos. Os extractos de algas pardas e, concretamente, os fucoidanos, empréganse para o tratamento clínico de numerosas doenzas. Neste estudo, analízase o potencial terapéutico de tres extractos de algas pardas sobre a liña celular de condrocitos humanos 260TT como tratamento complementario da artrose. Tras comprobar que estes compostos non son tóxicos para as células, testouse o seu efecto antiinflamatorio, antioxidante e antisenescente empregando entre outras técnicas ELISA, qPCR, western blot ou citometría de fluxo. Os resultados do traballo parecen indicar que os tres extractos analizados posúen efecto antiinflamatorio reducindo a síntese de IL-6 estimulada por IL-1 β . Tamén suxiren un efecto antioxidante de forma directa diminuíndo a secreción de ROS e indirecta pola regulación positiva de HO-1, pero non mediante a modulación do H₂S. Porén, non atopamos evidencias de que estes compostos modulen a senescencia. Estes resultados parecen indicar que os tres extractos son capaces de paliar parcialmente a sintomatoloxía da artrose.

RESUMEN

La artrosis es una patología degenerativa de las articulaciones con ua prevalencia del 29,35% en la poboación española mayor de 40 años. Se caracteriza por la degradación del cartílago hialino, cuyo único tipo celular son los condrocitos. Los extractos de algas pardas y, concretamente, los fucoidanos, se emplean para el tratamiento clínico de numerosas dolencias. En este estudio, se analiza el potencial terapéutico de tres extractos de algas pardas sobre la línea celular de condrocitos humanos 260TT como tratamiento complementario de la artrosis. Tras comprobar que estos compuestos no son tóxicos para las células, se testó su efecto antiinflamatorio, antioxidante y antisenescente empleando entre otras técnicas ELISA, qPCR, western blot o citometría de flujo. Los resultados del trabajo parecen indicar que los tres extractos analizados poseen efecto antiinflamatorio reduciendo la síntesis de IL-6 estimulada por IL-1 β . También sugieren un efecto antioxidante de forma directa disminuyendo la secreción de ROS e indirecta por la regulación positiva de HO-1, pero no mediante la modulación del H₂S. Sin embargo, no se encontraron evidencias de que estos compuestos modulen la senescencia. Estos resultados parecen indicar que los tres extractos son capaces de paliar parcialmente la sintomatología de la artrosis.

ABSTRACT

Osteoarthritis is a degenerative pathology of the joints with a prevalence of 29.35% in the Spanish population over 40 years of age. It is characterized by the degradation of hyaline cartilage, whose only cell type are chondrocytes. Brown algae extracts and, specifically, fucoidans, are used for the clinical treatment of numerous ailments. In this study, the therapeutic potential of three brown algae extracts on the 260TT human chondrocyte cell line as a complementary treatment for osteoarthritis is analyzed. After verifying that these compounds are not toxic to cells, their anti-inflammatory, anti-oxidant and anti-senescent effect was tested using, among other techniques, ELISA, qPCR, western blot or flow cytometry. The results of the research seem to indicate that the three extracts analyzed have an anti-inflammatory effect by reducing the synthesis of IL-6 stimulated by IL-1 β . They also suggest an antioxidant effect directly by decreasing ROS secretion and indirectly by positive regulation of HO-1, but not by modulating H₂S. However, no evidence was found that these compounds modulate senescence. These results seem to indicate that the three extracts are capable of partially palliating the symptoms of osteoarthritis.

ÍNDICE

<u>Palabras clave</u>	2
<u>Abreviaturas</u>	2
<u>Introducción</u>	3
<u>Articulacións e cartilaxe</u>	3
<u>Artrose</u>	4
<u>Extractos de algas pardas</u>	6
<u>H₂S</u>	7
<u>Hipótese e obxectivos</u>	8
<u>Material e métodos</u>	9
<u>Mantemento do cultivo celular</u>	9
<u>Estimulación e modelo experimental</u>	9
<u>Ensaio de viabilidade celular MTT</u>	10
<u>ELISA</u>	11
<u>Extracción de ARN e análise RT-PCR e qPCR</u>	11
<u>Extracción de proteínas e análise Western blot</u>	12
<u>Citometría de fluxo</u>	12
<u>Ensaio de proliferación celular BrdU</u>	13
<u>Análise estatística</u>	13
<u>Resultados</u>	14
<u>Viabilidade celular</u>	14
<u>Redución da resposta inflamatoria</u>	14
<u>Capacidade antioxidante</u>	15
<u>Modulación da síntese de H₂S</u>	16
<u>Modulación da senescencia</u>	17
<u>Discusión</u>	20
<u>Conclusións</u>	22
<u>Referencias</u>	23

PALABRAS CLAVE

Artrose, citoquinas proinflamatorias, condrocitos, fucoidanos, HO-1, ROS, senescencia.

ABREVIATURAS

3-MP- 3-mercaptopiruvato	MAE- <i>Microwave assisted extraction</i>
3-MPST- 3-mercaptopiruvato sulfurotransferasa	MEC- Matriz extracelular
ADN- Ácido desoxirribonucleico	MMPs- Metaloproteinasas
ADNc- Ácido desoxirribonucleico complementario	MTT- 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltretazol
AH- <i>Autohydrolysis</i>	NF- κ B- <i>Nuclear factor κB</i>
ARIC- Artrite reumatoide inducida por colágeno	Nrf-2- <i>Nuclear eritroid factor 2- related factor 2</i>
ARN- Ácido ribonucleico	P/S- Penicilina/Estreptomicina
ARNm- Ácido ribonucleico mensaxeiro	PBS- <i>Phosphate-Buffered Saline</i>
BrdU- 5-bromo-2'-desoxiuridina	PGE2- Prostaglandina E2
BSA- <i>Bovine serum albumin</i>	PMSF- <i>Phenylmethylsulfonyl fluoride</i>
CBS- Cistationina β -sintasa	PTGES- <i>PGE synthase</i>
CDK-2- <i>Ciclin-dependent kinase 2</i>	qPCR- <i>Quantitative polymerase chain reaction</i>
CDK-4- <i>Ciclin-dependent kinase 4</i>	ROS- <i>Reactive oxygen species</i>
CDK-6- <i>Ciclin-dependent kinase 6</i>	RT-PCR- <i>Reverse transcription polymerase chain reaction</i>
COX-2- <i>Cyclooxygenase 2</i>	SASP- <i>Senescence-associated secretory phenotype</i>
CTH- Cistationina γ -liala	SBF- Suero bovino fetal
DCFDA- 2',7'-diclorodihidrofluoresceína	SDS- Dodecilsulfato sódico
DMEM- <i>Dulbeccos's Modified Eagle Medium</i>	Sm- <i>Sargassum muticum</i>
ELISA- <i>Enzyme-Linked Inmunosorbent Assay</i>	T2X- Tripsina a concentración 2X
ESM- Extracto de <i>Sargassum muticum</i>	TMB-
FDG- Fluoresceína di- β -D-galactopiranosido	TNF- α - <i>Tumor necrosis factor α</i>
HRP- <i>Horseradish peroxidase</i>	TEAC- <i>Trolox equivalent antioxidant capacity</i>
H ₂ S- Sulfuro de hidróxeno	Up- <i>Undaria pinnatifida</i>
HO-1- <i>Hemeoxygenase 1</i>	WB- <i>Western blot</i>
IL-1 β - Interleuquina 1 β	
IL-6- Interleuquina 6	
IL-8- Interleuquina 8	
IL-17- Interleuquina 17	
LPS- Lipopolisacárido	

INTRODUCCIÓN

Articulacións e cartilaxe

As articulacións son un dos elementos esenciais do aparello locomotor, xunto cos ósos, os músculos, os tendóns e os ligamentos. Defínense como o punto de contacto entre os ósos e clasifícanse segundo o grao de movemento que permiten, sendo as diartrosis ou articulacións sinoviais as que permiten o movemento libre. Estas están formadas por unha cavidade articular, unha cápsula, cartilaxe que recobre os extremos dos ósos e os ligamentos.

O tecido cartilaxinoso é un tipo especializado de tecido conectivo avascular e aneural. Hai 3 tipos de cartilaxe, hialina, elástica e fibrosa, mais so a primeira é a que forma parte das articulacións. Como todo tecido conectivo, está formado por unha matriz extracelular (MEC) e células: os condrocitos son o único compoñente celular e a MEC está formada por coláxeno tipo II, proteoglicanos, glicoproteínas, lípidos e auga (Huber *et al.*, 2000). Os condrocitos atópanse aillados nun espazo denominado laguna ou condroplasto e sintetizan e manteñen a MEC xa que posúen un retículo endoplasmático rugoso e un aparello de Golgi ben desenvolvidos. Os condrocitos realizan o intercambio de gases e nutrientes a través da MEC co líquido sinovial que se atopa na cavidade articular (Zhou *et al.*, 2004).

Durante o desenvolvemento, a cartilaxe hialina forma un esqueleto que provee un molde para a formación do esqueleto óseo (osificación endocondral) e a medida que crecemos, queda unha reminiscencia deste esqueleto no que se coñece como placa epifisaria do crecemento, que permite a elongación dos ósos longos coma o fémur. No individuo adulto, o único que queda está na caixa torácica e na cartilaxe articular.

A cartilaxe articular caracterízase por carecer de pericondrio, ter un espesor de entre 2 e 5 mm e dividirse en 4 zonas (**Fig. 1**):

Zona superficial ou tanxencial. En contacto co líquido sinovial. Resistente á compresión. Contén moitos condrocitos alargados rodeados por fibrillas de coláxeno paralelas á superficie.

Zona intermedia ou transicional. Contén condrocitos redondeados con distribución aleatoria. As fibrillas de coláxeno están menos organizadas tamén e dispostas oblicuamente á superficie.

Zona profunda ou radial. Contén condrocitos redondeados pequenos dispostos en columnas perpendiculares á superficie. As fibrillas de coláxeno están dispostas entre as columnas de condrocitos.

Zona calcificada. Está separada da zona profunda pola marca de marea, unha liña calcificada e basófila. A matriz está calcificada e os condrocitos son pequenos. Nesta zona dáse crecemento intersticial, mediante a mitose destes condrocitos dentro da súa laguna, que migrarán lentamente cara a superficie articular libre, debido á rede estable de coláxeno e á larga vida media dos proteoglicanos.

As propiedades físicas deste tecido débense principalmente á integridade da súa MEC, que permite o acoplamento e deslizamento das superficies articulares adxacentes ca fin de amortiguar o impacto e soportar as forzas de fricción da articulación (Golding, 1997; Benito Ruiz *et al.*, 2000). Polo tanto, calquera fallo na cartilaxe hialina pode derivar nun fallo articular, que é a principal característica das enfermidades reumáticas coma a artrose.



Figura 1. Corte histolóxico da cartilaxe hialina humana con tinción hematoxilina-eosina. A disposición espacial dos condrocitos e das fibras de coláxeno varía en función da zona, e a densidade celular diminúe coa profundidade (Shetty *et al.*, 2014): zona superficial ou tanxencial, zona intermedia ou transicional, zona profunda ou radial, zona calcificada.

Artrose

A artrose é unha patoloxía dexenerativa das articulacións que se caracteriza pola degradación da cartilaxe (**Fig. 2**), pero tamén están implicados outros tecidos da articulación, como a membrana sinovial e o óso subcondral, afectados pola inflamación e a esclerose, respectivamente (Kraus *et al.*, 2015).

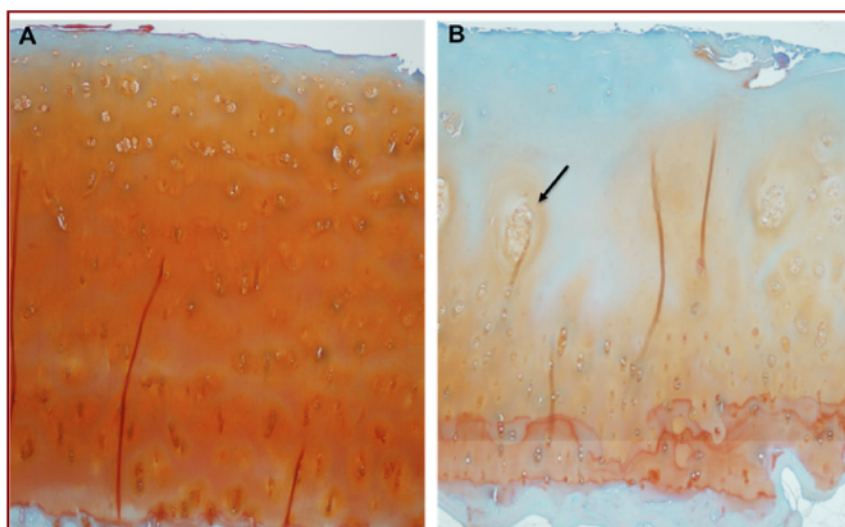


Figura 2. Corte histolóxico con dobre tinción (verde e safranina O) da cartilaxe da articulación do xeonllo humano sano (A) e artrósico (B). Na imaxe B obsérvase unha perda da tinción respecto á imaxe A debido á diminución no contido de proteoglicanos. Tamén se aprecia a erosión e fibrilación da superficie articular, ademais do cambio na distribución dos condrocitos, agora agrupados en clústeres patolóxicos na zona superficial-intermedia, sinalado cunha frecha (Vaamonde García, 2013).

A prevalencia da artrose sintomática na poboación española igual ou maior a 40 anos é do 29,35%, aumentando este valor coa idade (52,6% nos maiores de 80 anos), e tendo as mulleres maiores de 60 anos unha maior tendencia a padecela. Ademais, a probabilidade de sufrir de artrose de xeonllo, cadeira ou mans estando obeso é 4 veces maior en mulleres, e 4,8 veces maior en homes, aínda que se descoñece o mecanismo causal desta asociación (Blanco *et al.*, 2020).

Varios factores están implicados na patoxénese da enfermidade. Un deles é a disfunción mitocondrial, que pode prexudicar aos condrocitos mediante o acrecentamento da inflamación inducida por citoquinas (Vaamonde García *et al.*, 2012; Valcarcel Ares *et al.*, 2014), a modulación da expresión das metaloproteinasas na MEC (Cillero Pastor *et al.*, 2013) e o incremento da produción de especies reactivas de osíxeno (ROS) (Blanco *et al.*, 2004). Ademais, tamén afecta o desequilibrio no sistema de defensa antioxidante por parte do factor nuclear eritroide 2-factor relacionado 2 (Nrf-2), que regula entre outros procesos a expresión de hemoosixenasa 1 (HO-1) (Kundu *et al.*, 2014).

O incremento da expresión de citoquinas proinflamatorias na cartilaxe, na membrana sinovial e no óso subcondral está ligado ao desenvolvemento e progresión dos cambios estruturais da articulación artrósica. As principais citoquinas proinflamatorias responsables da fisiopatoloxía da artrose son interleuquina 1 β (IL-1 β), factor de necrose tumoral α (TNF- α) e interleuquina 6 (IL-6) (Kapoor *et al.*, 2011). Estas moléculas inducen a síntese de factores catabólicos e inflamatorios e son sintetizadas polos condrocitos, osteoblastos, fibroblastos sinoviais e leucocitos mononucleares.

IL-1 β está relacionada principalmente coa degradación da cartilaxe: suprime a síntese de coláxeno tipo II (Chadjichristos *et al.*, 2003; Shakibaei *et al.*, 2005) e agrecano (Stöve *et al.*, 2000); estimula a liberación de metaloproteinasas (MMPs) 1, 3 e 13 (Lefebvre *et al.*, 1990; Reboul *et al.*, 1996); induce a produción de IL-6 (Guerne *et al.*, 1990) e quemoquinas coma IL-8 (Lotz *et al.*, 1992).

TNF- α desencadea a cascada da resposta inflamatoria: inhibe a síntese de proteoglicanos, proteínas de unión e coláxeno tipo II nos condrocitos (Saklatvala, 1986); estimula a liberación de metaloproteinasas (MMPs) 1, 3 e 13 (Lefebvre *et al.*, 1990; Reboul *et al.*, 1996); induce a produción de IL-6 (Guerne *et al.*, 1990) e quemoquinas coma IL-8 (Lotz *et al.*, 1992).

IL-6 aumenta a expresión de MMPs 1 e 13 xunto con IL-1 β e oncostatina (Cawston *et al.*, 1998; Rowan *et al.*, 2001) e reduce a produción de coláxeno tipo II (Porée *et al.*, 2008).

A senescencia celular tamén é un factor importante na patoloxía da artrose (McCulloch *et al.*, 2013). Hai estudos que amosan que está relacionada coa artrose asociada á idade (Diekman *et al.*, 2018; Del Rey *et al.*, 2019), lesións (Jeon *et al.*, 2017) ou dieta (Schafer *et al.*, 2016), entre outros. A senescencia é unha resposta ao estrés que provoca unha detención permanente do ciclo celular e alteracións a nivel transcripcional, epixenético, metabólico e morfolóxico que desencadean cambios fenotípicos profundos. Ademais, as células senescentes son máis resistentes ás sinais de apoptose (Gorgolius *et al.*, 2019).

O cese da proliferación débese ao dano no ADN provocado polas vías supresoras tumorais p53/p21^{CIP1} e p16^{INK4a}/RB, que inhiyen as quinasas dependentes de ciclina (CDK2 por p21^{CIP1} e CDK4 e CDK6 por ambas) necesarias para a normal sucesión das fases do ciclo celular (McHugh e Gil, 2018). Isto explica parte dos efectos fisiopatolóxicos da senescencia, pero ademais, as células senescentes tamén modifican o seu entorno mediante o contacto directo célula-célula (Nelson *et al.*, 2012; Hoare *et al.*, 2016),

fusión celular (Chuprin *et al.*, 2013), formación de pontes citoplasmáticas (Biran *et al.*, 2017), sinalización por vesículas extracelulares (Takasugi *et al.*, 2017) e SASP (do inglés *senescence-associated secretory phenotype*- fenotipo secretor asociado á senescencia) (Birch e Gil, 2020). Un exemplo é a sinalización de ROS a través das unións tipo GAP, que induce a senescencia *in vitro* e, potencialmente, *in vivo* (Nelson *et al.*, 2012)

O SASP é o complexo secretoma que producen as células senescentes. Un dos seus compoñentes máis salientables é a secreción de citoquinas proinflamatorias (IL-6, IL-17, IL-1 β) e TNF (Coppe *et al.*, 2010; Basisty *et al.*, 2020) que inducen cambios relacionados coa artrose coma a inflamación e degradación da MEC.

Actualmente a artrose non ten cura, e os tratamentos baséanse na diminución dos síntomas como a dor, a inflamación, e a degradación da cartilaxe e a preservación da mobilidade articular. Entre outros medicamentos empregados atópanse os analxésicos, axentes antiinflamatorios non esteroideos (AINE), esteroides, medicamentos antirreumáticos modificadores da enfermidade (FARME) e modificadores da resposta biolóxica. Porén, algúns destes fármacos provocan efectos adversos graves cando son tomados por un período de tempo longo, polo que é preciso a búsqueda de alternativas.

Extractos de algas pardas

Os fucoidanos son uns polisacáridos sulfatados que supoñen os principais compostos terapéuticos das algas pardas (división Ochrophyta) e poden acadar unha gran relevancia no tratamento da artrose, posiblemente, debido ao seu alto contido de florotanino e ao seu ratio sulfato:fucosa (Vaamonde García *et al.*, 2021).

Está demostrado que os fucoidanos posúen un amplo rango de efectos antiinflamatorios e inmunomoduladores *in vitro*, relacionados cos seguintes procesos: diminución da síntese de óxido nítrico (NO) pola reducida expresión de iNOS; redución da expresión de ciclooxixenasa 2 (COX-2), diminución da secreción de prostaglandina E2 (PGE2), TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8 e inhiben a activación da ruta de sinalización NF- κ B (Apostolova *et al.*, 2020). Estes polisacáridos xa se utilizaron clinicamente para o tratamento de cancro, doenzas neurolóxicas e diabetes (Fitton *et al.*, 2019) e cada vez hai máis estudos que suxiren a súa aplicación en enfermidades reumáticas (Fitton, 2011; Piñeiro Ramil *et al.*, 2022). Ademais, a súa actividade beneficiosa antioxidante e antiinflamatoria está confirmada para os condrocitos, así como o seu papel protector na disfunción mitocondrial. Isto podería en parte deberse á súa capacidade para activar a ruta que inhibe a ruta de sinalización NF- κ B (Vaamonde García *et al.*, 2021).

Pero a súa composición química é moi diversa (Rodrigues *et al.*, 2005), de forma que non se poden sacar conclusións universais sobre o efecto dos fucoidanos para distintas patoloxías (Flórez *et al.*, 2017) e por elo necesítanse novos estudos comparativos que determinen cal é a composición e concentración máis adecuada para tratar a artrose. A actividade biolóxica destas moléculas varía en función do seu peso molecular, da súa estrutura tridimensional e do seu contido e posición de grupos sulfato (Chen *et al.*, 2019) e tamén dos factores ambientais nos que creceron as algas dos que se extraen e o método de extracción (Ale e Meyer, 2013; Ale *et al.*, 2011).

Así a todo, os extractos de algas pardas conteñen outros compoñentes terapéuticamente activos, que no seu conxunto mostran efectos antioxidantes e antiinflamatorios en condrocitos humanos *in vitro* (Park *et al.*, 2018₁; Park *et al.*, 2018₂), e xa foron

testados en ensaios clínicos. Por exemplo, Myers *et al.* en 2010 fixeron un ensaio controlado aleatorizado de fase I e II cun composto que contén tres especies de algas pardas [*Fucus vesiculosus* (85% w/w), *Macrocystis pyrifera* (10% w/w) e *Laminaria japonica* (5% w/w)] ademais de vitamina B6, zinc e manganeso. Este complexo reduciu significativamente os síntomas da artrose, mediante o decrecemento da puntuación COAT final (do inglés *comprehensive osteoarthritis test*-proba integral de artrose). O efecto foi altamente dependente da dose, posto que tras 12 semanas, a dose de 100 mg reduciu a puntuación media de COAT nun 18% e a dose de 1000 mg nun 52%.

En resumo, os extractos de algas pardas son interesantes candidatos para o tratamento complementario da artrose, mais precísanse máis estudos que o confirmen.

H₂S

O sulfuro de hidróxeno, xunto con outros gases coma o NO e o CO, é un gaso-transmisor (Wang, 2002) altamente lipofílico que permeabiliza as membranas celulares sen un transportador específico, polo que pode acadar multitude de dianas celulares en distintos tecidos cunha alta variedade de efectos (Martelli *et al.*, 2012). Esta molécula está emerxendo como un posible regulador da inflamación, que podería ser útil no tratamento da artrose. Nun estudo realizado por Burguera *et al.* no 2014 obsérvase que o H₂S reduce a expresión de COX-2 e PTGES (PGE sintasa) reducindo así a síntese de PGE₂. Tamén regula negativamente a expresión de IL-6 a nivel transcripcional e de tradución. Ademais, parece que reduce a translocación de NF-κB ao núcleo, aínda que non a prevén completamente.

Este gas sintetízase endóxenamente na articulación, mediante a acción das enzimas CBS (cistationina β-sintasa), CTH (cistationina γ-liasa) e 3-MPST (3-mercaptopiruvato sulfurotransferasa). A L-cisteína é o substrato para a produción do H₂S mediada pola CBS e CTH. Namentres que a 3-MPST cataliza a eliminación do sulfuro do 3-mercaptopiruvato (3-MP) formando ácido sulfúrico, sendo o H₂S o produto final (Martelli *et al.*, 2012). A CBS e a CTH son enzimas exclusivamente citosólicas, mais a 3-MPST pode atoparse tamén nas mitocondrias (Kamoun, 2004; Shibuya *et al.*, 2009).

Diferentes evidencias sinalan que estas dous enzimas son sintetizadas nos tecidos da articulacións, pero que os niveis de H₂S vense reducidos de forma natural nos condrocitos artrósicos (Burguera *et al.*, 2019). Pero, coma no caso do NO, a síntese endóxena de H₂S tamén pode ser inducida por factores externos (Li *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2006; Fox *et al.*, 2012). Neste sentido, sería interesante investigar se os extractos de Ochrophyta previamente mencioados poderían exercer un papel importante na modulación dos síntomas da artrose a través do incremento endóxeno do H₂S.

HIPÓTESE E OBXECTIVOS

Dado o papel beneficioso dos extractos de algas pardas descrito previamente, cremos que son unha alternativa terapéutica de interés no tratamento da artrose, polo que o obxectivo deste estudo é testar se 3 extractos das algas *Undaria pinnatifida* (Harvey) Suringar (Up) e *Sargassum muticum* (Yendo) Fensholt (Sm) son capaces de paliar os síntomas da artrose a distintos niveis.

1. Primeiro comprobarase que os extractos non son tóxicos para os condrocitos mediante un ensaio de viabilidade celular.
2. Por unha banda, estudarase o efecto antiinflamatorio a partir dun modelo artrósico inducido por IL-1 β para avaliar a posible:
 - Modulación da síntese de IL-6 e IL-8.
 - Regulación do sistema de sinalización Nrf-2/HO-1.
 - A modulación do sulfuro de hidróxeno por parte das enzimas que regulan a súa síntese no cartílago, CBS e CTH.
3. Por outra banda, testarase o posible efecto modulador da senescencia a partir dun modelo artrósico inducido por etopósido para estudar se:
 - Diminúe a abundancia de células senescentes detectando o marcador de senescencia β -galactosidasa.
 - Se reduce a secreción de ROS.
 - Aumenta a proliferación celular.
 - Decrece a síntese de IL-6 como compoñente do SASP.

MATERIAL E MÉTODOS

Mantemento do cultivo celular

Para estes estudos empregáronse condrocitos humanos inmortalizados no laboratorio, a liña celular 260TT (Piñeiro Ramil, *et al.*, 2021). Esta liña celular de condrocitos cultivábase en monocapa. Grazas aos nutrientes aportados polo soro bovino fetal (SBF) (Gibco, Life technologies, Pasley, Inglaterra) a unha concentración do 10% no medio de cultivo DMEM (Dulbeccos's Modified Eagle Medium) (Lonza, Basel, Suiza). As placas incúbanse na estufa a unha temperatura de 37 °C e atmosfera húmeda con 5% de CO₂.

Os condrocitos atópanse en todo momento nun estado de asepsia ao traballar cun cultivo de células humanas, carente da protección do sistema inmunitario. Para elo, trabállase nunha campana de fluxo laminar con material estéril, ademais de engadir a ao medio de cultivo P/S (Penicilina/Estreptomicina) a unha concentración do 1%.

Estimulación e modelo experimental

Unha vez acadada a confluencia fixéronse subcultivos en placas de 96 pocillos (Costar Corning Incorporated, NY, USA)(10.000 células/pocillo) para MTT, ELISA e BrdU; 24 pocillos (Costar Corning)(40.000 células/pocillo) para citometría e 12 pocillos (Costar Corning)(70.000 células/pocillo) para extracción de ARN (8-10/12 pocillos) e proteínas.

Realizouse un modelo de inflamación estimulando os condrocitos con IL-1 β (Sigma-Aldrich Aldrich, San Luis, Estados Unidos) a unha concentración de 5 ng/mL. Unha vez acadada a confluencia, depleccionamos o soro tratando as células con DMEM 0,5%, e 48h despois estimulamos cos extractos de algas pardas diluídos en DMEM 0%. Simúlase a condición artrósica ca IL-1 β .

Realizouse un modelo de senescencia estimulando os condrocitos con etopósido (Sigma-Aldrich) a unha concentración de 10 μ M. Unha vez acadada a confluencia, estimulamos directamente cos extractos de algas pardas diluídos en DMEM 2%, para que a falta de nutrientes non sexa un inductor da senescencia. Simúlase a condición artrósica co etopósido.

De modo que, os pocillos que non levan IL-1 β ou etopósido, simulan un paciente san, namentres que os que si levan, simulan un paciente con artrose. Os pocillos que levan algún dos extractos simulan un tratamento e os que non levan representan as condicións basais coas que comparar os efectos dos distintos tratamentos.

Empregáronse os extractos de algas *Undaria pinnatifida* e *Sargassum muticum* extraídos e cedidos polo grupo de investigación EQ2 liderado por Hermina Domínguez na Universidade de Vigo e un fucoídano comercial de *Undaria pinnatifida* (Sigma-Aldrich). O método de extracción e caracterización química dos mesmos amósase na Táboa 1.

	Extracto de Up-AH (Queffelec <i>et al.</i> , 2021)	Fucoidano comercial de Up (Vaamonde García <i>et al.</i> , 2021)	Extracto de Sm-US (Álvarez Viñas <i>et al.</i> , 2019)	Extracto de Sm-AH (Flórez Fernández <i>et al.</i> , 2017)
Fucosa	11,4%	27,1 ± 0,32%	8,79%	29,69%
Galactosa	+ manosa+ xilosa 10,64%	24,78 ± 0,69%	+ manosa+ xilosa 10,45%	+ manosa+ xilosa 28,13%
Glucosa	2,75%	-	2,88%	7,06%
Ác. fórmico	1,84%	-	-	1,28%
Grupos acetilo	2,57%	-	-	1,57%
Sulfatos	1,7 ± 0,9 g/g	384,44 ± 1,93 mg/g	3,76 ± 0,9 g/g	3,28 ± 0,01 g/g
Ratio fucosa:sulfato	1:0,15	1:1,42 (Piñeiro Ramil, <i>et al.</i> , 2022)	1:0,42	1:0,11
Floroglucinol	3,99 ± 0,12 mg/g	4,26 ± 0,04 mg/g	2,41 ± 0,02 g/g	3,22 ± 0,01 g/g
Valor TEAC	7,37 ± 0,82 mg/g	5,36 ± 2,09 mg/g	4 ± 0,11 g/g	1,29 ± 0,01 g/g

Táboa 1. Composición do fucoidano e dos distintos extractos de algas pardas empregados para a estimulación dos condrocitos. O valor TEAC (do inglés *Trolox equivalent antioxidant capacity*-capacidade antioxidante equivalente a Trolox) compara a capacidade captadora de radicais ABTS^{•+} ou DPPH[•] do composto a investigar respecto ao antioxidante sintético Trolox, un análogo polar da vitamina E. Os métodos de extracción son MAE (do inglés *microwave assisted extraction*) (160 °C), AH (do inglés *autohydrolysis*) (170°C) e US (do inglés *ultrasound assisted extraction*).

Ensaio de viabilidade celular MTT

As células estimuláronse en placa de 96 pocillos (10.000 células/pocillo) durante 24 horas. Transcurrido o tempo de incubación, a viabilidade celular avalíouse mediante a medición da redución enzimática do MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltretazol] a formazán, usando un kit comercial de ensaio celular MTT (Sigma-Aldrich). É unha reacción colorimétrica, o MTT é de cor amarela e os cristais de formazán de cor violeta. Polo tanto, a intensidade de cor violeta é proporcional á cantidade de células vivas capaces de reducir este composto.

Engadíronse 10 µL de MTT por pocillo e incobouse a placa 96 durante 4 horas na estufa a 37 °C, 5% CO₂ e atmósfera húmeda. Despois, engadíronse 100 µL de SDS por pocillo para disolver os cristais de formazán, e incubouse *overnight* na estufa. Por último, fíxose unha lectura da absorbancia a 570 nm no espectrofotómetro (NanoQuant).

A viabilidade celular relativa represéntase como a porcentaxe de absorbancia en cada condición experimental en relación á condición basal sen estimular (100%).

ELISA

Os condrocitos incubáronse con diferentes estímulos durante 24 horas en placa de 96 pocillos (10.000 células/pocillo).

A partir dos sobrenadantes recollidos dos experimentos fixéronse ensaios ELISA (do inglés Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) para comprobar o contido de IL-6. Utilizouse un kit comercial para a detección de IL-6 humana (Bio-Techne R&D Systems, Madrid, Spain) que contén: anticorpo de captura, anticorpo de detección e estándar de IL-6 liofilizados e a solución de estreptavidina-HRP. O rango de traballo era de 9,38 a 600 pg/mL de IL-6.

Para poder analizar os resultados é preciso medir a absorbancia a 450 nm no espectofotómetro (NanoQuant) coa axuda do software i-control 1.10.

Extracción de ARN e análise RT-PCR e qPCR

Para proceder coa análise da expresión xénica empregamos placas de 12 pocillos (70.000 células/pocillo) que se incubaron con diferentes estímulos durante 24 horas.

A extracción realízase en todo momento na campana de extracción de gases debido a que algúns dos reactivos empregados liberan gases tóxicos [TRIzol (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) e cloroformo (Sigma-Aldrich)]. Primeiro, extráese o ARN con TRIzol (400 µL/pocillo), que xunto co cloroformo, promove a separación das 3 fases, de superficie a fondo: ARN, proteínas e ADN. O isopropanol (Sigma-Aldrich) precipita o ARN.

Para cuantificar o ARN extraído, empregamos o espectofotómetro NanoDrop™ (Thermo Scientific, Madrid, Spain) a 260 nm e o software ND-100.

Retrotranscríbense 800 ng de ARN empregando un kit comercial (Nzytech, Lisboa, Portugal) nun termociclador (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific) e iniciamos un programa para a retrotranscripción (10 minutos a 25 °C, 30 minutos a 50 °C e 5 minutos a 85 °C).

O ADNc amplifícase mediante qPCR no LifeCycler (Roche Diagnostics, Química S.A) durante 45 ciclos. Cada ciclo conta cunha fase de desnaturalización [95 °C 10 segundos (s)], hibridación (60°C, 45 s) e extensión (72°C 10 s); a temperatura de melting ou de fusión é de 95°C durante 5 s, 60°C durante 60 s e despois aumentouse a temperatura lentamente ata 97°C. Por último, arrefriamente durante 20 s a 40°C.

Para analizar os niveis de expresión de cada xen, normalizamos os datos co xen de referencia HPRT (hipoxantina fosforribosiltransferasa 1) seguindo a fórmula $2^{-(Cp \text{ medio HPRT} - Cp \text{ medio gen de interés})}$.

Xen	Forward primer	Reverse primer
CBS	5'-aggagaagtgtccttgatg-3'	5'-taggtgtctgctccgtctg-3'
CTH	5'-gcattcaaaaacggaatgg-3'	5'-ctcatgctgtggatgagagg-3'
HO-1	5'-tccgatgggtccttacactc-3'	5'-taaggaagcagcaagaga-3'
IL-6	5'-gatgagtacaaaagtcctgatcca-3'	5'-ctgcagccactgggttctgt-3'
IL-8	5'-gagcactcataaggcaca-3'	5'-atggtccttccgggtg-3'
HPRT	5'-tgatagatccattcctatgactgtaga-3'	5'-caagacattcttccagttaaagttg-3'

Táboa 2. Cebadores dos xenos CBS, CTH, HO-1, IL-6, IL-8 e HPRT empregados nas qPCR.

Extracción de proteínas e análise Western blot

Os condrocitos incubáronse con diferentes estímulos durante 24 horas en placa de 12 pocillos (70.000 células/pocillo).

Para realizar a extracción, engadimos 50 μ L de tampón de lisis [Tris-HCl 0,2M pH 6,8; SDS 2%; glicerol 20%; PMSF 1% (Sigma-Aldrich); cocktail de inhibidores 1%] en cada pocillo e os raspamos, recuperamos en tubos eppendorf 1,5 mL e hervimos durante 10 minutos. Despois centrifugamos para poder recuperar o sobrenadante.

Para cuantificar as proteínas extraídas, empregamos o espectofotómetro Nano-Drop™ (Thermo Scientific, Madrid, Spain) a 260 nm e o software ND-100.

Para comezar western blot (WB) preparáramos as mostras en condicións reductoras (β -mercaptoetanol) e desnaturizantes (SDS), para que as proteínas migren no xel de electroforese so en función do seu peso molecular e non da súa carga. Facemos un xel de electroforese acrilamida/bisacrilamida ao 10%, adecuado para as proteínas que queremos detectar: HO-1 (32 KDa) (Enzo Life Sciences, New York, USA), tubulina (50 KDa) (Sigma-Aldrich), Nrf-2 (60 KDa) (SantaCruz Biotechnology, Heidelberg, Germany). Colocamos o xel na cubeta de electroforese e a enchemos con tampón de electroforese. Antes de cargar as mostras no xel, engadimos o tampón de carga a cada eppendorf e os hervimos durante 5 minutos.

Finalizada a electroforese, realizouse unha transferencia das proteínas a membranas de fluoruro de polivinilideno previamente activadas usando un Transblot (Biorad) a 20V.

Para facer a inmunodetección, primeiro bloqueamos a membrana con leite 5% e despois incubamos cos anticorpos primarios (anti Nrf-2 de rato con dilución 1/250; anti HO-1 de coello con dilución 1/1000) a 4 °C toda a noite. Ao día seguinte, incubamos co anticorpo anti tubulina de rato con dilución 1/2000 durante 1 hora a temperatura ambiente e despois incubamos cos anticorpos secundarios ligados a HRP (anti rato (Sigma-Aldrich) e anti coello (Sigma-Aldrich), respectivamente, con dilución 1/1000) 1 hora a temperatura ambiente.

O último paso é detectar as bandas na cámara de revelado. A expresión relativa das proteínas calcúlase proporcionalmente á intensidade do revelado en comparación coa proteína de referencia tubulina.

Citometría de fluxo

Mediante esta técnica leváronse a cabo dos ensaios diferentes: avaliación da senescencia celular e medida da produción de ROS. Para o primeiro dos ensaios, os condrocitos incubáronse con diferentes estímulos durante 48 horas en placa de 24 pocillos (40.000 células/pocillo). Unha hora antes de parar o experimento engadiuse o fluoróforo fluoresceína di- β -D-galactopiranosido (FDA), o substrato da enzima β -galactosidasa, e incubamos 1 hora sen luz. Ademais, engadimos tamén bafilomicina (Sigma-Aldrich) para estabilizar o pH na última media hora. A β -galactosidasa é un marcador de senescencia ben recoñecido, empregado en moitos estudos como o de Gao *et al.* no 2016.

Para avaliar a produción intracelular de ROS usouse 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (DCFDA). O composto difunde a través da membrana celular e reacciona coas ROS para xerar compostos altamente fluorescentes. A placa de 24 pocillos foi estimu-

lada 24 horas da estimulación cos fucoïdanos e o etopósido e na última media hora, engadiuse o DCFDA.

Para ambos ensaios, laváronse as placas con PBS, levantáronse as células con tripsina e centrifugouse a placa para poder resuspender en tubos de ensaio con PBS. Empregouse o canal de fluorescencia 1 para medir a intensidade de fluorescencia, que expresamos como M1 e M2 no primeiro caso e como a mediana da intensidade de fluorescencia no segundo caso.

Ensaio de proliferación celular BrdU

Os condrocitos incubáronse con diferentes estímulos durante 24 horas en placa de 96 pocillos (10.000 células/pocillo).

Tras a estimulación con etopósido e os extractos de algas durante 24h, procédese co ensaio de proliferación celular BrdU (5-bromo-2'-desoxiuridina) mediante un kit comercial (Cell Signaling TECHNOLOGY).

As células cultívanse con BrdU (1X) toda a noite na estufa a 37 °C, 5% CO₂ e atmosfera húmeda. Este análogo de pirimidina é incorporado ao ADN de nova síntese en lugar da timidina. Despois, as células fíxanse para que o ADN se desnaturalice e o BrdU poida ser detectado polo anticorpo anti-BrdU (1X). O seguinte paso é engadir o anticorpo secundario anti-rato ligado a HRP (1X), que detecta o anticorpo anti-BrdU. Finalmente, engádese o TMB, que ao unirse ao HRP xera unha reacción colorimétrica proporcional á cantidade de BrdU incorporada polas células. Para poder analizar os resultados é preciso medir a absorbancia a 450 nm no espectofotómetro (NanoQuant) coa axuda do software i-control 1.10.

Análise estatística

Para todos os ensaios realizouse unha análise ANOVA I seguido dun ensaio de comparación múltiple de Tukey co software GraphPad PRISM versión 8.0.2. Os resultados dos gráficos das figuras representan a media de «n» experimentos independentes (n = número de experimentos) ± erro estándar da media (SEM), no caso dos gráficos de barras, ou o valor de cada experimento co SEM asociado á media de «n» experimentos independentes para cada condición.

RESULTADOS

Viabilidade celular

En primeiro lugar avalíase a toxicidade das diferentes dosis de extractos de algas a testar en condrocitos. Engadiouse como control o fucoidano de *Undaria pinnatifida* testado no laboratorio anteriormente (Vaamonde García *et al.*, 2020). Tras realizar os ensaios de viabilidade celular MTT (n=3) e analizar estatisticamente os resultados mediante ANOVA I, non se atoparon evidencias de que os extractos de algas pardas nin o fucoidano comercial de *U. pinnatifida* (Up-C) afectasen á viabilidade celular (Fig. 3).

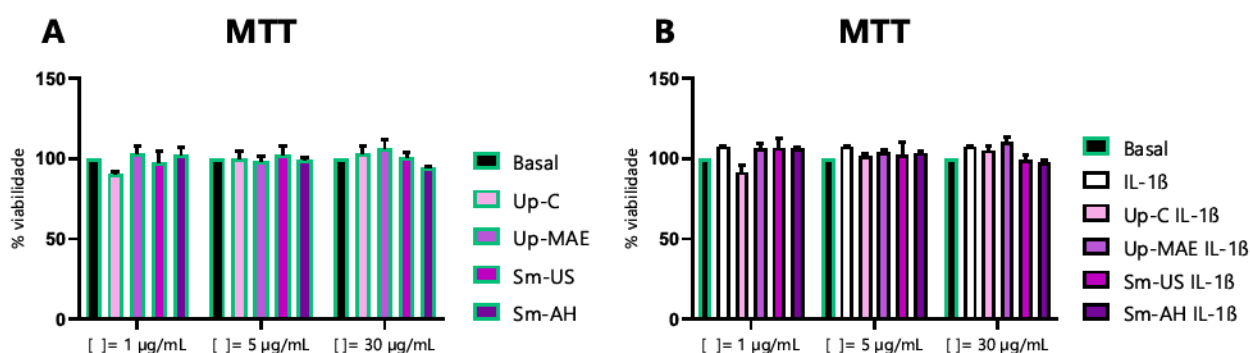


Figura 3. Efecto dos extractos de algas pardas e do fucoidano de *U. pinnatifida* na viabilidade celular da ñiña celular de condrocitos 260TT. A viabilidade celular foi avaliada mediante ensaio MTT (n=3). Non hai diferencias significativas entre calquera das condicións respecto ao basal nin respecto á condición estimulada so con IL-1β (p-valor>0,05).

Redución da resposta inflamatoria

Demostrada a seguridade do tratamento cos extractos de algas, realizáronse ensaios ELISA de IL-6 con todas as condicións (n=3) para tantear o seu efecto antiinflamatorio. Así, avalíase se existían diferencias na produción neta de IL-6 por parte dos condrocitos estimulados cos distintos tratamentos e as distintas concentracións. Como era de esperar, detectáronse diferencias significativas entre a produción de IL-6 das condicións basais respecto ás estimuladas con IL-1β (p-valor<0,001) e tamén entre as condicións cos tratamentos respecto á condición basal con IL-1β (**Fig. 4**). Porén, non se atoparon diferencias significativas entre os valores dos distintos tratamentos (p-valor>0,05). Baseándonos nestes resultados e en experimentos previos, seleccionouse a dose de 5 µg/mL para levar a cabo os ensaios posteriores de expresión xénica.

Como se pode observar na **Fig. 5**, nin para o xen de IL-6 (n=4) nin de IL-8 (n=4) se observaron diferencias significativas nos niveis de ARN entre ningunha das condicións (p-valores>0,05), mais se aprecia certa tendencia de incremento da expresión naquelas condicións estimuladas con IL-1β respecto aos basais. Os erros estándares son bastante amplos, polo que deberían repetirse os experimentos ata conseguir un número de mostraxe maior.

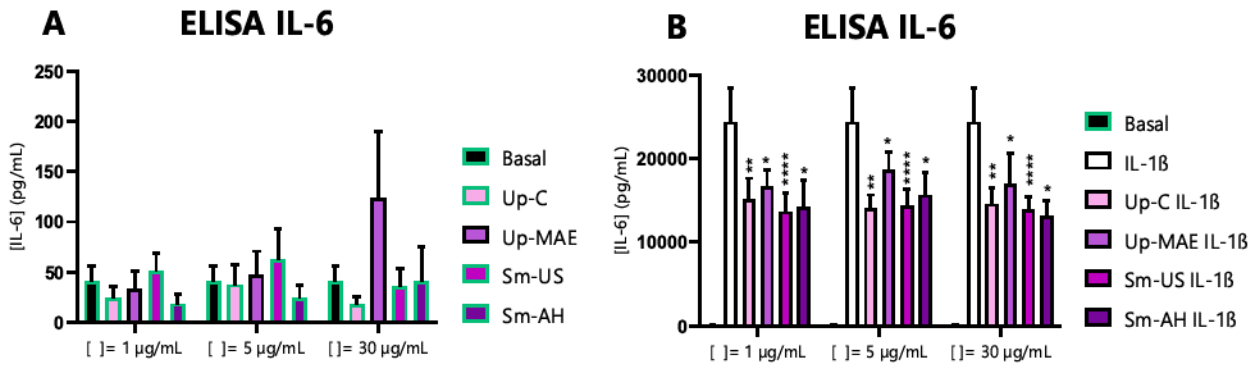


Figura 4. Producción de IL-6 pola liña celular 260TT tras 24 horas de estimulación. A síntese de IL-6 mediuse por ELISA (n=3). Representáanse os valores correspondentes ás condicións basais (A) e estimuladas con IL-1 β (B). A IL-1 β estimula a síntese de IL-6 (p-valor<0,001). Os valores de calquera dos 4 tratamentos a calquera das tres concentracións son diferentes respecto á condición basal con IL-1 β : *, p-valor<0,05; **, p-valor<0,01, ****, p-valor<0,0001.

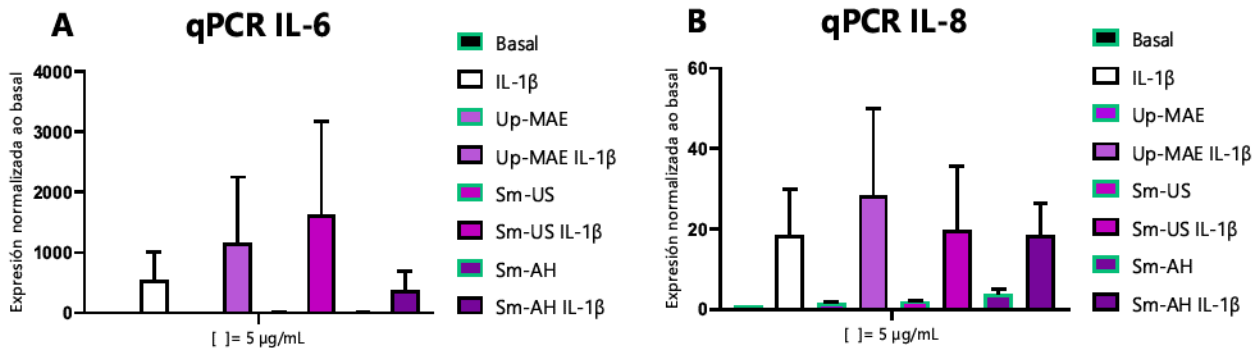


Figura 5. Niveis de expresión de ARNm de IL-6 (A) e IL-8 (B) na liña celular 260TT tras 24 horas de estimulación. A expresión xénica mediuse mediante qPCR (n=4 en ambos casos). Non hai diferenzas significativas entre ningunha das condicións (p-valor>0,05).

Capacidade antioxidante

O seguinte paso foi avaliar se os efectos antiinflamatorios detectados polos extractos de algas eran debidos a súa capacidade de activar a resposta antioxidante. Con este obxectivo, e en base a achados previos do grupo de laboratorio, avalíouse o sistema de sinalización Nrf-2/HO-1. Así, e da mesma forma que no caso da análise da expresión xénica de IL-6 e IL-8, tamén se escolleu a dose de 5 μ g/mL para analizar a expresión xénica de HO-1. Como se pode observar na **Fig. 6**, para o xen de HO-1 (n=4) non se observaron diferenzas significativas nos niveis de ARN entre ningunha das condicións (p-valores>0,05). Contrario ao esperado, os extractos de algas pardas non parecen incrementar a expresión xénica de HO-1.

Porén, avaliáronse os niveis proteicos de HO-1 e tamén de Nrf-2, o factor de transcrición responsable da activación da súa expresión. Como se mostra na **Fig. 7**, a coestimulación dos condrocitos cos extractos procedentes de Up-MAE e Sm-AH potenciaron de forma notoria os niveis de HO-1 inducidos por IL-1 β , aínda que estas modulacións non foron estatisticamente significativas (p-valores>0,05). Non se atoparon modulacións salientables na expresión de Nrf-2 debido á variabilidade entre experimentos.

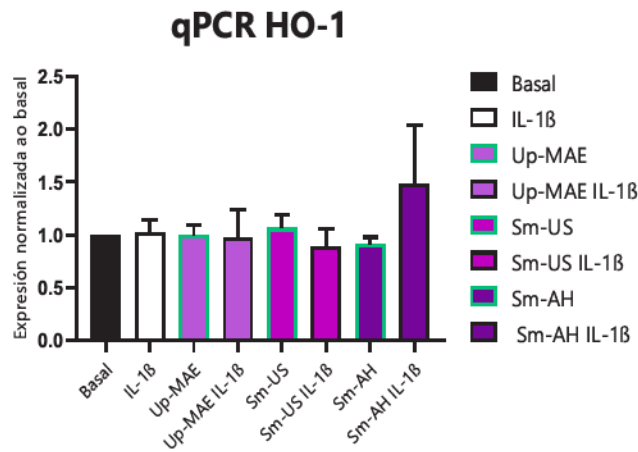


Figura 6. Niveis de expresión de ARNm de HO-1 na liña celular 260TT tras 24 horas de estimulación. A expresión xénica mediuse mediante qPCR (n=4). Non hai diferencias significativas entre ningunha das condicións (p-valores > 0,05).

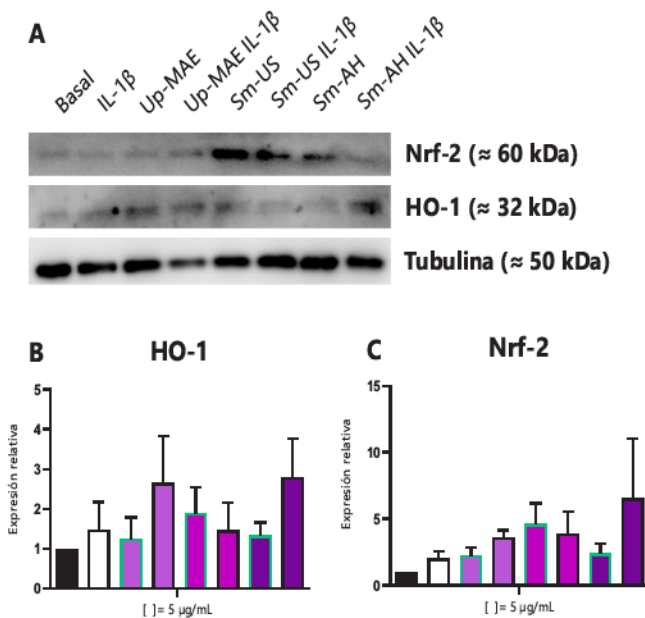


Figura 7. Expresión proteica relativa de HO-1 (B) e Nrf-2 (C) na liña celular 260TT tras 24 horas de estimulación. Móstrase unha imaxe da análise da expresión proteica avaliada por WB (n=3) (A). Non hai diferencias significativas entre ningunha das condicións (p-valores > 0,05).

Modulación da síntese de H₂S

Outro dos mediadores anticatabólicos polo cal os extractos poderían modular os seus efectos é a indución da produción endóxena H₂S. As principais enzimas encargadas da súa síntese son CBS e CTH, polo que se valorou a expresión xénica destas. Como se pode observar na **Fig. 8**, nin para o xen de CBS (n=4) nin de CTH (n=2) se observaron diferencias significativas nos niveis de ARN entre ningunha das condicións (p-valores > 0,05). Polo tanto, estes resultados non semellan indicar que os extractos de algas pardas regulen positivamente a síntese de CBS nin de CTH.

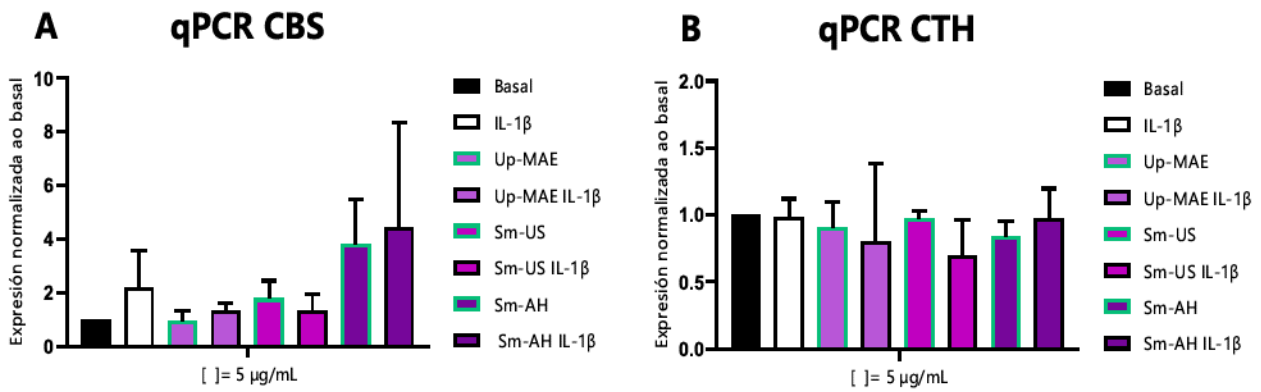


Figura 8. Niveis de expresión de ARNm de CBS (A) e CTH (B) na liña celular 260TT tras 24 horas de estimulación. A expresión xénica mediuse mediante qPCR (n=4 para CBS e n=2 para CTH). Non hai diferenzas significativas entre ningunha das condicións (p-valores > 0,05).

Modulación da senescencia

Finalmente avaliamos se os extractos de algas pardas podían modular a activación da senescencia nos condrocitos, así como os efectos deste proceso ligados á artrose. Para realizar estes estudos, leváronse a cabo catro tipos de probas: medición da actividade β-galactosidasa e produción de ROS mediante citometría de fluxo, ensaio de proliferación celular e ELISA de IL-6. Como control positivo de indución da senescencia as células estimuláronse con etopósido na presenza ou ausencia dos extractos de algas pardas.

Para avaliar o efecto dos extractos na activación da senescencia celular realizouse unha citometría de fluxo de β-galactosidasa (n=3). A β-galactosidasa é un marcador de senescencia ben recoñecido (Dimri *et al.*, 1995). Na **Fig. 9** pódese observar que tras 48 horas de estimulación, a abundancia de condrocitos senescentes é maior nas condicións estimuladas con etopósido (p-valor < 0,05). Ao contrario do que se esperaba, os tratamentos cos extractos de algas pardas reduciron so lixeiramente e non significativamente a abundancia de células senescentes respecto á condición estimulada so con etopósido (p-valor > 0,05).

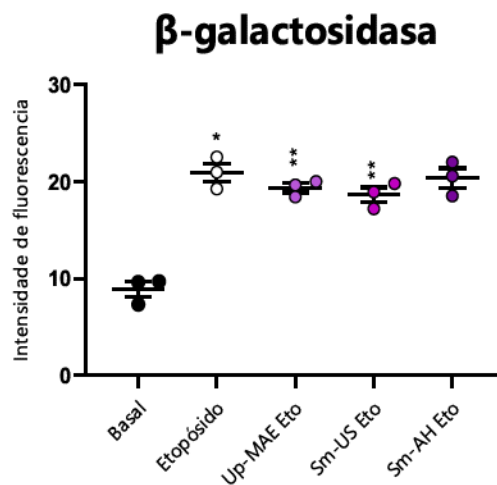


Figura 9. Abundancia de condrocitos 260TT senescentes tras 48 horas de estimulación. Determinada por citometría de fluxo (n=3). Condicións diferentes respecto á condición basal: *, p-valor < 0,05; **, p-valor < 0,01.

Para medir a produción de ROS polos condrocitos senescentes, levouse a cabo unha citometría de fluxo con DCFDA (n=3). Tras 48 horas de estimulación, pódese observar na **Fig. 10** que a condición estimulada con etopósido exclusivamente produce máis ROS que a basal (p-valor<0,01). A pesar de que se aprecia certa tendencia á diminución da síntese de ROS nos tratamentos con extractos respecto ao estimulado só con etopósido, esta diferenza non é significativa (p-valor>0,05), polo que habería que repetir os experimentos ata conseguir un número de mostraxe maior.

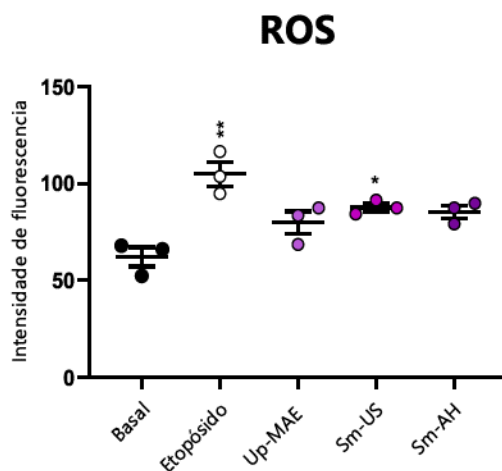


Figura 10. Produción de ROS pola liña celular 260TT tras 48 horas de estimulación. Deteción de ROS por citometría de fluxo (n=3). Condicións diferentes respecto á condición basal: *, p-valor<0,05; **, p-valor<0,01.

Tamén se fixeron ensaios de proliferación celular por BrdU (n=5) para avaliar se os extractos teñen a capacidade de recuperar a actividade proliferativa reducida pola senescencia celular. Na **Fig. 11** vemos que isto non é así, aínda que o ratio de proliferación da condición estimulada con etopósido non é significativamente diferente ao da condición basal, si se aprecia unha tendencia a que este diminúa, mais os extractos non semellan mellorar esta situación, posto que tampouco hai diferencias significativas entre o ratio da condición estimulada só con etopósido e o ratio das condicións cos tratamentos.

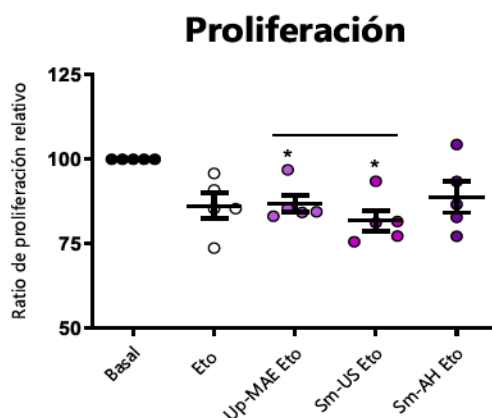


Figura 11. Ratio de proliferación da liña celular 260TT tras 24 horas de estimulación con etopósido. Avaliado por ensaio de viabilidade celular BrdU (n=5). Condicións significativamente diferentes da condición basal: *, p-valor<0,05.

Por último, realizamos ensaios ELISA de IL-6 (n=5) co obxectivo de descubrir se os extractos podían modular parte do fenotipo das células senescentes, é dicir, a secreción de mediadores proinflamatorios como é a IL-6 que caracterizan ao SASP. Polo tanto, avaliouse se existían diferencias na produción neta de IL-6 por parte dos condrocitos estimulados cos distintos tratamentos e as distintas concentracións. Na **Fig. 12** apréciase que tanto a condición estimulada con etopósido coma os tratamentos con Up-MAE e Sm-US incrementan significativamente a produción de IL-6 respecto á condición basal (p-valor<0,05), mais ningún tratamento reduce estes valores respecto á condición estimulada so con etopósido (p-valores>0,05).

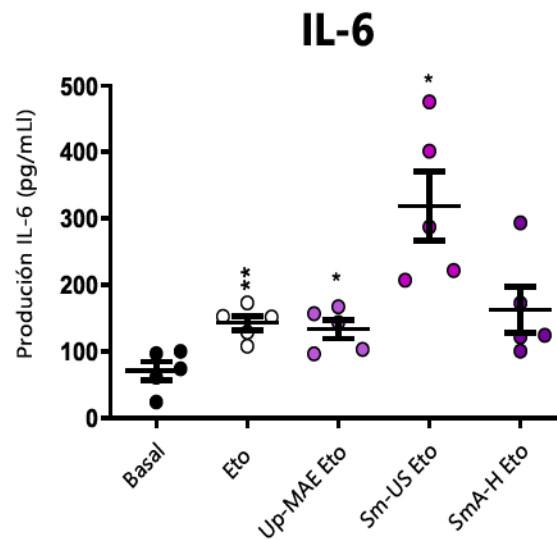


Figura 12. Produción de IL-6 pola liña celular 260TT tras 24 horas de estimulación con etopósido. Avaliado mediante ELISA (n=5). Condicións diferentes respecto á condición basal: *, p-valor<0,05; **, p-valor<0,01.

DISCUSIÓN

A artrose ten unha prevalancia moi alta en España (Blanco *et al.*, 2020), porén, a día de hoxe non ten cura todavía. Aínda que existen diferentes tratamentos para paliar a súa sintomatoloxía ou frear a súa progresión, en moitos casos non son totalmente efectivos ou poden ser prexudiciais para o doente debido a un uso prolongado no tempo. Polo tanto, o obxectivo deste traballo é aportar unha nova estratexia para facer fronte aos seus síntomas testando o efecto terapéutico de tres extractos de algas pardas na fisiopatoloxía da artrose.

Como comentamos, unha das preocupacións no uso de fármacos é a su toxicidade. Neste estudo observouse que os extractos non afectan á viabilidade celular, do mesmo modo que Vaamonde García *et al.* en 2021 detectaron con concentracións similares de fucoïdanos procedentes de algas pardas nun estudo tamén en condrocitos humanos. Polo tanto, estes achados parecen indicar que o uso destes extractos podería considerarse seguro.

Un dos factores máis salientables implicados na patoxénese da artrose son as citoquinas proinflamatorias. Jeon *et al.* en 2019 demostraron tanto *in vitro* coma *in vivo* que un extracto de *S. muticum* (ESM) reduce a produción de citoquinas IL-6 e TNF- α en ratos con artrite reumatoide inducida por coláxeno (ARIC). Ademáis, mediante análise histopatolóxica, obasérvase o maior dano da superficie articular dos ratos con ARIC fronte aos ratos tratados co ESM. No presente estudo, avalíouse a capacidade antiinflamatoria dos extractos sobre as moléculas IL-6 e IL-8. Acorde cos achados previamente descritos, calquera dos tres extractos reduce a produción de IL-6 no modelo de condrocitos artrósicos con independencia da dose empregada. Así mesmo, nun traballo previo do grupo detectáronse tamén efectos antiinflamatorios de fucoïdanos de *U. pinnatifida*, os mesmos que se empregaron neste estudo como control positivo de resposta antiinflamatoria (Vaamonde García *et al.*, 2021). Mais non semella que esta regulación aconteza tamén a nivel de ARNm nin para IL-6 nin para IL-8. Unha posibilidade para explicar esta discordancia entre os resultados a nivel proteico e xénico, pode ser o tempo de extracción do ARNm, o cal foi a 24 horas, e habería que avaliar tempos de incubación máis curtos que realmente reflexen a modulación na produción de IL-6 detectadas nos nosos ensaios.

O sistema de sinalización Nrf-2/HO-1 é un mecanismo de supervivencia celular moi importante que contrarresta o estrés oxidativo e a inflamación (Niture *et al.*, 2014; O'Connell e Hayes, 2015) e que se amosa prexudicado nos condrocitos artrósicos (Vaamonde García *et al.*, 2017). O xen COX-2 tamén está implicado na resposta antioxidante, e nun estudo levado a cabo en condrocitos artríticos de coello e rato, demostrouse tanto *in vitro* coma *in vivo* que un fucoïdano de *U. pinnatifida* regula negativamente o xen COX-2 e mellora os síntomas clínicos da artrite (Phull *et al.*, 2017). Neste traballo estúdiouse a capacidade antioxidante dos extractos sobre sistema de sinalización Nrf-2/HO-1 na liña celular 260TT, mais, igual ca no caso das interleuquinas, non parece que os extractos regulen a expresión xénica de HO-1. Porén, tanto o extracto Up-MAE coma Sm-AH amosan certa tendencia a regular positivamente a expresión proteica de HO-1, pero non a de Nrf-2. Esta tendencia non é significativa a nivel estatístico e os datos de Nrf-2 presentan unha alta variabilidade, polo que é preciso que se realicen réplicas dos experimentos en estudos futuros para confirmar a modulación por parte dos extractos. Así mesmo, a discordancia de resultados podería tamén residir nos tempos de incubación empregados para avaliar a expresión xénica.

O sulfuro de hidróxeno é un mediador anticatabólico que modula os síntomas da artrose. Como os niveis de H₂S están reducidos de forma natural nos condrocitos

artrósicos (Burguera *et al.*, 2019), neste traballo investigamos se os extractos poderían incrementarlos mediante a regulación das enzimas encargadas de sintetizalo, CBS e CTH. Fox *et al.* en 2012 demostraron que as células mesenquimais proxenitoras diferenciadas condroxenicamente que empregaron no seu estudo expresan tanto CBS coma CTH, e que a expresión de CTH podería ser inducida por IL-1 β , TNF α e IL-6 ou por lipopolisacárido (LPS). No actual estudo, non se detectaron tales diferencias, nin tampouco clase de modulación algunha por parte dos extractos na expresión xénica das mesmas. Estes resultados, concordan cos do estudo de Burguera *et al.* en 2019 realizado directamente sobre tecido cartilaxinoso.

A senescencia é un factor importante na patoloxía da artrose (McCulloch *et al.*, 2013). A β -galactosidasa é un marcador de senescencia ben recoñecido (Dimri *et al.*, 1995) e a súa expresión no cartílago articular está asociada ao progresivo dano articular causado pola artrose, polo que é un potencial indicador da severidade da enfermidade (Gao *et al.*, 2013). No presente traballo, confirmamos que a abundancia de condrocitos senescentes con actividade β -galactosidasa é maior no modelo de senescencia artrósico ca no basal. Os tratamentos cos extractos de algas pardas so reduciron lixeiramente e non de forma significativa a abundancia de células senescentes, polo tanto é preciso que en futuros estudos se realicen réplicas destes experimentos, quizáis con pequenas variacións das variables descritas.

A senescencia celular caracterízase tamén polo cese da proliferación. É por isto que ademais testouse a capacidade dos extractos para manter o ratio normal de proliferación dos condrocitos. Pero parece que os extractos carecen totalmente desta propiedade. Pola contra, un estudo recente empregando extractos de *Ecklonia stolonifera*, un alga parda da familia Laminariaceae, demostrou o seu papel protector fronte a un modelo de senescencia en fibroblastos de pel humana (Jun *et al.*, 2020). Porén, os autores administraron os extractos en nanopartículas, unha forma de administración que podería aumentar a súa penetrabilidade na célula e pola tanto potenciar os seus efectos antisenescentes.

A capacidade antioxidante dos extractos de algas pardas xa se comentou previamente, pero ademais dos experimentos con HO-1, levouse a cabo un estudo da modulación da secreción de ROS que concorda co descrito a nivel proteico. A estimulación dos condrocitos con etopósido promoveu a secreción de ROS e as condicións tratadas cos extractos de algas amosan certa tendencia a atenuar a produción de ROS pero, a pesar de que concorda co descrito en estudos previos de condrocitos empregando fucoïdanos (Vaamonde García *et al.*, 2021; Park *et al.*, 2018₂), non é significativa estatisticamente. Por elo, habería que repetir os experimentos en investigacións posteriores ata conseguir un número de mostraxe maior que reduza a variabilidade dos datos.

Finalmente, tamén testamos a modulación de IL-6 esta vez como parte do fenotipo do SASP, posto que o modelo artrósico era de senescencia. Pero neste caso, a pesar de que o etopósido fomenta a síntese de IL-6, da mesma forma que a IL-1 β no modelo artrósico de inflamación, os fucoïdanos non regulan negativamente esta produción, senón que ata parecen incrementala (Sm-US). Esta contradicción nos resultados da modulación de IL-6 pode deberse a que a regulación desta molécula ocorre de forma diferente no caso da indución por IL-1 β que no caso da indución por etopósido.

En resumo, os resultados do traballo parecen indicar que os 3 extractos analizados posúen efecto antiinflamatorio reducindo a síntese de IL-6 estimulada por IL-1 β e efecto antioxidante de forma indirecta pola regulación positiva de HO-1 e de forma directa diminuindo a secreción de ROS. Porén, non atopamos evidencias de que estes compostos modulen a senescencia, pero precísanse máis estudos para confirmalo.

CONCLUSIÓNS

Os 3 extractos das algas *Undaria pinnatifida* e *Sargassum muticum* son capaces de paliar algúns dos síntomas da artrose.

1. Os extractos de algas pardas nas concentracións testadas non afectan á viabilidade da liña celular 260TT e poderían ser seguras para o seu uso terapéutico.
2. Respecto ao modelo artrósico de inflamación inducido por IL-1 β :
 - Os extractos modulan a síntese de IL-6 a nivel proteico pero non a nivel xénico, nin tampouco a nivel xénico de IL-8.
 - Os extractos parecen regular a síntese de HO-1 a nivel proteico pero non a nivel de ARNm, mais non modulan a síntese proteica de Nrf-2.
 - O efecto antiinflamatorio descrito non se debe á modulación do sulfuro de hidróxeno por parte das enzimas que regulan a súa síntese, CBS e CTH.
3. Respecto ao modelo artrósico de senescencia inducido por etopósido:
 - Os extractos non reducen significativamente a cantidade de células senescentes avaliada mediante a actividade β -galactosidasa.
 - Os extractos parecen reducir a produción de ROS asociada á senescencia.
 - Os extractos non afectan á actividade proliferativa celular.
 - Os extractos non modulan a produción de IL-6 como parte do SASP.

REFERENCIAS

- Ale, M.T.; Meyer, A.S. 2013. Fucoidans from brown seaweeds: An update on structures, extraction techniques and use of enzymes as tools for structural elucidation. *RSC advances*, 3(22): 8131–8141.
- Ale, M.T.; Mikkelsen, J.D.; Meyer, A.S. 2011. Important determinants for fucoidan bioactivity: A critical review of structure-function relations and extraction methods for fucose-containing sulfated polysaccharides from brown seaweeds. *Marine drugs*, 9(10): 2106–2130.
- Álvarez Viñas, M.; Flórez Fernández, N.; Torres, M.D., Domínguez, H. 2019. Successful approaches for a red seaweed biorefinery. *Marine drugs*, 17(11): 620.
- Apostolova, E.; Lukova, P.; Baldzhieva, A.; Katsarov, P.; Nikolova, M.; Iliev, I.; Peychev, L.; Trica, B.; Oancea, F.; Delattre, C.; Kokova, V. 2020. Immunomodulatory and anti-inflammatory effects of fucoidan: A review. *Polymers*, 12(10): 2338.
- Basisty, N.; Kale, A.; Jeon, O.H.; Kuehnemann, C.; Payne, T.; Rao, C.; Holtz, A.; Shah, S.; Sharma, V.; Ferrucci, L.; Campisi, J.; Schilling, B. 2020. A proteomic atlas of senescence-associated secretomes for aging biomarker development. *PLOS biology*, 18(1): e3000599.
- Benito Ruiz, P.; Monfort Faure, J. Etiopatogenia, clasificación y epidemiología de la artrosis. En: Alonso Ruiz, A.; Álvaro Gracia, J.M.; Andreu Sánchez, J.L.; Blanch Rubió, J.; Collantes Estévez, E.; Cruz Martínez, J. e colaboradores, directores. Manual SER de las enfermedades reumáticas. 3ª edición Madrid: Editorial Panamericana; 2000. p. 463–475.
- Biran, A.; Zada, L.; Abou Karam, P.; Vadai, E.; Roitman, L.; Ovadya, Y.; Porat, Z.; Krizhanovsky, V. 2017. Quantitative identification of senescent cells in aging and disease. *Aging cell*, 16(4): 661–671.
- Birch, J.; Gil, J. 2020. Senescence and the SASP: many therapeutic avenues. *Genes & development*, 34(23–24): 1565–1576.
- Blanco, J.L.; Silva Díaz, M.; Quevedo Vila, V.; Seoane Mato, D.; Pérez Ruiz, F.; Juan Mas, A.; Pego Reigosa, J.M.; Narváez, J.; Quilis, N.; Cortés, R.; Romero Pérez, A.; Fábregas Canales, D.; Font Gayá, T.; Bordoy Ferrer, C.; Sánchez Piedra, C.; Díaz González, F.; Bustabad Reyes, S. 2020. Prevalencia de artrosis sintomática en España: Estudio EPISER2016. *Reumatología clínica*, 17(8): 461–470.
- Cawston, T.E.; Curry, V.A.; Summers, C.A.; Clark, I.M.; Riley, G.P.; Life, P.F.; Spaul, J.R.; Goldring, M.B.; Koshy, P.J.; Rowan, A.D.; Shingleton, W.D. 1998. The role of oncostatin M in animal and human connective tissue collagen turnover and its localization within the rheumatoid joint. *Arthritis & rheumatology*, 41(10): 1760–1771.
- Chadjichristos, C.; Ghayor, C.; Kypriotou, M.; Martin, G.; Renard, E.; Ala Kokko, L.; Suske, G.; de Crombrughe, B.; Pujol, J.P.; Galéra, P. 2003. Sp1 and Sp3 transcription factors mediate interleukin-1 β down-regulation of human type II collagen gene expression in articular chondrocytes. *Journal of biological chemistry*, 278(41): 39762–39772.
- Chen, L.; Ge, M.D.; Zhu, Y.J.; Song, Y.; Cheung, P.C.K.; Zhang, B.B.; Liu, L.M. 2019. Structure, bioactivity and applications of natural hyperbranched polysaccharides. *Carbohydrate polymers*, 223: 115076.
- Chuprin, A.; Gal, H.; Biron Shental, T.; Biran, A.; Amiel, A.; Rozenblatt, S.; Krizhanovsky, V. 2013. Cell fusion induced by ERVWE1 ormeasles virus causes cellular senescence. *Genes & development*, 27(21): 2356–2366.
- Coppe, J.P.; Desprez, P.Y.; Krtolica, A.; Campisi, J. 2010. The senescence-associated secretory phenotype: the dark side of tumor suppression. *Annual review of pathology*, 5: 99–118.
- Diekman, B.O.; Sessions, G.A.; Collins, J.A.; Knecht, A.K.; Strum, S.L.; Mitin, N.K.; Carlson, C.S.; Loeser, R.F.; Sharpless, N.E. 2018. Expression of p16^{NK4a} is a biomarker of chondrocyte aging but does not cause osteoarthritis. *Aging cell*, 17(4): e12771.
- Dimri, G.P.; Lee, X.; Basile, G.; Acosta, M.; Scott, G.; Roskelley, C.; Medrano, E.E.; Linskens, M.; Rubelj, I.; Pereira Smith, O. 1995. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin *in vivo*. *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America*, 92(20): 9363–9367.
- Del Rey, M.J.; Valín, A.; Usategui, A.; Ergueta, S.; Martín, E.; Municio, C.; D. Cañete, J.; Blanco, F.J.; Criado, D.; Pablos, J.L. 2019. Senescent synovial fibroblasts accumulate prematurely in rheumatoid arthritis tissues and display an enhanced inflammatory phenotype. *Immunity & ageing*, 16: 29.
- Burguera, E.F.; Vela Anero, A.; Magalhães, J.; Meijide Faílde, R.; Blanco, F.J. 2014. Effect of hydrogen sulfide sources on inflammation and catabolic markers on interleukin 1 β -stimulated human articular chondrocytes. *Osteoarthritis cartilage*, 22(7): 1026–1035.
- Burguera, E.F.; Vela Anero, A.; Gato Calvo, L.; Vaamonde García, C.; Meijide Faílde, R.; Blanco, F.J. 2019. Hydrogen sulfide biosynthesis is impaired in the osteoarthritic joint. *International journal of biometeorology*, 64(6): 997–1010.
- Fitton, J.H. 2011. Therapies from fucoidan; multifunctional marine polymers. *Marine drugs*, 9(10): 1731–1760.
- Fitton, J.H.; Stringer, D.S.; Park, A.Y.; Karpinić, S.N. 2019. Therapies from fucoidan: New developments. *Marine drugs*, 17(10): 571.
- Flórez Fernández, N.; González Munoz, M. J.; Ribeiro, D.; Fernandes, E.; Domínguez, H.; Freitas, M. 2017. Algae polysaccharides' chemical characterization and their role in the inflammatory process. *Current medicinal chemistry*, 24(2): 149–175.
- Fox, B.; Schantz, J.T.; Haigh, R.; Wood, M.E.; Moore, P.K.; Viner, N.; Spencer, J.P.; Winyard, P.G.; Whitman, M. 2012. Inducible hy-

- drogen sulfide synthesis in chondrocytes and mesenchymal progenitor cells: is H₂S a novel cytoprotective mediator in the inflamed joint? *Journal of cellular and molecular medicine*, 16(4): 896–910.
- Gao, S.G.; Zeng, C.; Li, L.J.; Luo, W.; Zhang, F.J.; Tian, J.; Cheng, C.; Tu, M.; Xiong, Y.L.; Jiang, W.; Xu, M.; Lei, G.H. 2016. Correlation between senescence-associated betagalactosidase expression in articular cartilage and disease severity of patients with knee osteoarthritis. *International journal of rheumatic diseases*, 19(3): 226–232.
- Goldring, M.B. Articular cartilage. En: Klippel, J.H., director. *Primer on the rheumatic diseases*. 11ª edición. Atlanta: Arthritis Foundation; 1997. p. 14–18.
- Gorgoulis, V.; Adams, P.D.; Alimonti, A.; Bennett, D.C.; Bischof, O.; Bishop, C.; Campisi, J.; Collado, M.; Evangelou, K.; Ferbeyre, G.; Gil, J.; Hara, E.; Krizhanovskiy, V.; Jurk, D.; B. Maier, A.; Narita, M.; Niedernhofer, L.; F. Passos, J.; D. Robbins, P.; A. Schmitt, C.; Sedivy, J.; Vougas, K.; von Zglinicki, T.; Zhou, D.; Serrano, M.; Demaria, M. 2019. Cellular senescence: Defining a path forward. *Cell*, 179(4): 813–827.
- Guerne, P.A.; Carson, D.A.; Lotz, M. 1990. IL-6 production by human articular chondrocytes. Modulation of its synthesis by cytokines, growth factors, and hormones *in vitro*. *Journal of immunology*, 144(2): 499–505.
- Hoare, M.; Ito, Y.; Kang, T.W.; Weekes, M.P.; Matheson, N.J.; Patten, D.A.; Shetty, S.; Parry, A.J.; Menon, S.; Salama, R.; Antrobus, R.; Tomimatsu, K.; Howat, W.; J. Lehner, P.; Zender, L.; Narita, M. 2016. NOTCH1 mediates a switch between two distinct secretomes during senescence. *Nature cell biology*, 18(9): 979–992.
- Huber, M.; Trattnig, S.; Lintner, F. 2000. Anatomy, biochemistry, and physiology of articular cartilage. *Investigative radiology*, 35(10): 573–580.
- Jeon, O.H.; Kim, C.; Laberge, R.M.; Demaria, M.; Rathod, S.; P. Vasserot, A.; Wook Chung, J.; Hun Kim, D.; Poon, Y.; David, N.; J. Baker, D.; van Deursen, J.M.; Campisi, J.; Elisseeff, J. 2017. Local clearance of senescent cells attenuates the development of post-traumatic osteoarthritis and creates a pro-regenerative environment. *Nature medicine*, 23(6): 775–781.
- Jeon, O.H.; Yoon, W.J.; Ham, Y.M.; Yoon, S.A.; Kan, S.C. 2019. Anti-arthritis effect through the anti-inflammatory effect of *Sargassum muticum* extract in collagen-induced arthritic (CIA) mice. *Molecules*, 24(2): 276.
- Kamoun, P. 2004. Endogenous production of hydrogen sulfide in mammals. *Amino acids*, 26(3): 243–254.
- Koh, H.S.A.; Lu, J.; Zhou, W. 2019. Structure characterization and antioxidant activity of fucoidan isolated from *Undaria pinnatifida* grown in New Zealand. *Carbohydrate polymers*, 212: 178–185.
- Kraus, V.B.; Blanco, F.J.; Englund, M.; Karsdal, M.A.; Lohmander, L.S. 2015. Call for standardized definitions of osteoarthritis and risk stratification for clinical trials and clinical use. *Osteoarthritis and cartilage*, 23(8): 1233–1241.
- Kundu, J.; Kim, D.H.; Kundu, J.K.; Chun, K.S. 2014. Thymoquinone induces heme oxygenase-1 expression in HaCaT cells via Nrf2/ARE activation: Akt and AMPK α as upstream targets. *Food and chemical toxicology*, 65: 18–26.
- Lefebvre, V.; Peeters Joris, C.; Vaes, G. 1990. Modulation by interleukin 1 and tumor necrosis factor α of production of collagenase, tissue inhibitor of metalloproteinases and collagen types in differentiated and dedifferentiated articular chondrocytes. *Biochimica et biophysica acta*, 1052(3): 366–378.
- Li, L.; Bhatia, M.; Zhu, Y.Z.; Zhu, Y.C.; Ramnath, R.D.; Wang, Z.J.; Anuar, F.B.; Whiteman, M.; Salto Tellez, M.; Moore, P.K. 2005 Hydrogen sulfide is a novel mediator of lipopolysaccharide-induced inflammation in the mouse. *FASEB journal*, 19(9): 1196–1198.
- Lotz, M.; Terkeltaub, R.; Villiger, P.M. 1992. Cartilage and joint inflammation. Regulation of IL-8 expression by human articular chondrocytes. *Journal of immunology*, 148(2): 466–473.
- Martelli, A.; Testai, L.; Breschi, M.C.; Blandizzi, C.; Viridis, A.; Taddei, S.; Calderone, V. 2012. Hydrogen sulphide: Novel opportunity for drug discovery. *Medicinal research reviews*, 32(6): 1093–1130.
- McCulloch, K.; Litherland, G.J.; Rai, T.S. 2017. Cellular senescence in osteoarthritis pathology. *Aging cell*, 16(2): 210–218.
- McHugh D.; Gil J. 2018. Senescence and aging: Causes, consequences, and therapeutic avenues. *The journal of cell biology*, 217(1): 65–77.
- Myers, S.P.; O'Connor, J.; Fitton, J.H.; Brooks, L.; Rolfe, M.; Connellan, P.; Wohlmuth, H.; Cheras, P.A.; Morris, C. 2010. A combined phase I and II open label study on the effects of a seaweed extract nutrient complex on osteoarthritis. *Biologics: targets & therapy*, 4: 33–44.
- Nelson, G.; Wordsworth, J.; Wang, C.; Jurk, D.; Lawless, C.; Martín Ruiz, C.; von Zglinicki, T. 2012. A senescent cell bystander effect: Senescence-induced senescence. *Aging cell*, 11(2): 345–349.
- Niture, S.K.; Khatri, R.; Jaiswal, A.K. 2014. Regulation of Nrf2 an update. *Free radical biology & medicine*, 66: 36–44.
- O'Connell, M.A.; Hayes, J.D. 2015. The Keap1/Nrf2 pathway in health and disease: from the bench to the clinic. *Biochemical society transactions*, 43(4): 687–689.
- Park, C.; Hong, S.H.; Shin, S.S.; Lee, D.S.; Han, M.H.; Cha, H.J.; Kim, S.; Kim, H.S.; Kim, G.Y.; Park, E.K.; Jeon, Y.J.; Choi, Y.H. 2018. Activation of the Nrf2/HO-1 signaling pathway contributes to the protective effects of *Sargassum serratifolium* extract against oxidative stress-induced DNA damage and apoptosis in SW1353 human chondrocytes. *International journal of environmental research and public health*, 15(6): 1173.

- Park, C.; Jeong, J.W.; Lee, D.S.; Yim, M.J.; Lee, J.M.; Han, M.H.; Kim, S.; Kim, H.S.; Kim, G.Y.; Park, E.K.; Jeon, Y.J.; Cha, H.J.; Choi, Y.H. 2018. *Sargassum serratifolium* extract attenuates interleukin-1 β -induced oxidative stress and inflammatory response in chondrocytes by suppressing the activation of NF- κ B, p38 MAPK and PI3K/Akt. *International journal of molecular sciences*, 19(8): 2308.
- Phull, A.R.; Majid, M.; Haq, I.U.; Khan, M.R.; Kim, S.J. 2017. *In vitro* and *in vivo* evaluation of anti-arthritic, antioxidant efficacy of fucoidan from *Undaria pinnatifida* (Harvey) Suringar. *International journal of biological macromolecules*, 97: 468-480.
- Piñeiro Ramil, M.; Flórez Fernández, N.; Ramil Gómez, O.; Torres, M.D.; Domínguez, H.; Blanco, F.J.; Meijide Faílde, R.; Vaamonde García, C. 2022. Antifibrotic effect of brown algae-derived fucoidans on osteoarthritic fibroblast-like synoviocytes. *Carbohydrate polymers*, 282: 119134.
- Piñeiro Ramil, M.; Sanjurjo Rodríguez, C.; Castro Viñuelas, R.; Rodríguez Fernández, S.; Hermida Gómez, T.; Fuentes Boquete, I.M.; Blanco, F.J.; Díaz Prado, S.M. 2021. Generation of an immortalized chondrocyte cell line from osteoarthritis articular cartilage. *Osteoarthritis and cartilage*, 29 (1): S208-S209.
- Porée, B.; Kypriotou, M.; Chadjichristos, C.; Beauchef, G.; Renard, E.; Legendre, F.; Melin, M.; Gueret, S.; Hartmann, D.J.; Malléin Gerin, F.; Pujol, J.P.; Boumediene, K.; Galéra, P. 2008. Interleukin-6 (IL-6) and/or soluble IL-6 receptor down-regulation of human type II collagen gene expression in articular chondrocytes requires a decrease of Sp1.Sp3 ratio and of the binding activity of both factors to the COL2A1 promoter. *The journal of biological chemistry*, 283(8): 4850-4865.
- Reboul, P.; Pelletier, J.P.; Tardif, G.; Cloutier, J.M.; Martel Pelletier, J. 1996. The new collagenase, collagenase-3, is expressed and synthesized by human chondrocytes but not by synoviocytes. A role in osteoarthritis. *The journal of clinical investigation*, 97(9): 2011-2019.
- Rodrigues, D.; Sousa, S.; Silva, A.; Amorim, M.; Pereira, L.; Rocha Santos, T.A.P.; Gomes, A.M.P.; Duarte, A.C.; Freitas, A.C. 2015. Impact of enzyme and ultrasound assisted extraction methods on biological properties of red, brown, and green seaweeds from the central west coast of Portugal. *Journal of agricultural and food chemistry*, 63(12): 3177-3188.
- Rowan, A.D.; et al. 2001. Synergistic effects of glycoprotein 130 binding cytokines in combination with interleukin-1 on cartilage collagen breakdown. *Arthritis and rheumatism*, 44(7): 1620-1632.
- Ryu, M.J.; Chung, H.S. 2016. Fucoidan reduces oxidative stress by regulating the gene expression of HO-1 and SOD-1 through the Nrf2/ERK signaling pathway in HaCaT cells. *Molecular medicine reports*, 14(4): 3255-3260.
- Schafer, M.J.; White, T.A.; Evans, G.; Tonne, J.M.; Verzosa, G.C.; Stout, M.B.; Mazula, D.L.; Palmer, A.K.; Baker, D.J.; Jensen, M.D.; Torbenson, M.S.; Miller, J.D.; Ikeda, Y.; Tchkonina, T.; van Deursen, J.M.; Kirkland, J.L.; LeBrasseur, N.K. 2016. Exercise prevents diet-induced cellular senescence in adipose tissue. *Diabetes*, 65(6): 1606-1615.
- Shakibaei, M.; Schulze Tanzil, G.; John, T.; Mobasheri, A. 2005. Curcumin protects human chondrocytes from IL-1 β -induced inhibition of collagen type II and β 1-integrin expression and activation of caspase-3: An immunomorphological study. *Annals of anatomy*, 187(5-6): 487-497.
- Shetty, A.A.; Kim, S.J.; Nakamura, N.; Brittberg, M. Articular cartilage: Histology and physiology. En: *Techniques in cartilage repair surgery*. Hierdelberg: Springer, ESKA 2014. p. 17-22.
- Shibuya, N.; Mikami, Y.; Kimura, Y.; Nagahara, N.; Kimura, H. 2009. Vascular endothelium expresses 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase and produces hydrogen sulfide. *Journal of biochemistry*, 146(5): 623-626.
- Saklatvala, J. 1986. Tumour necrosis factor α stimulates resorption and inhibits synthesis of proteoglycan in cartilage. *Nature*, 322: 547-549.
- Stöve, J.; Huch, K.; Günther, K.P.; Scharf, H.P. 2000. Interleukin-1 β induces different gene expression of stromelysin, aggrecan and tumor-necrosis-factor-stimulated gene 6 in human osteoarthritic chondrocytes in vitro. *Pathobiology*, 68(3): 144-149.
- Takasugi, M.; Okada, R.; Takahashi, A.; Virya Chen, D.; Watanabe, S.; Hara, E. 2017. Small extracellular vesicles secreted from senescent cells promote cancer cell proliferation through EphA2. *Nature communications*, 8: 15729.
- Vaamonde García, C.; Courties, A.; Pigenet, A.; Laignillon, M.C.; Sautet, A.; Houard, X.; Kerdine Römer, S.; Meijide Faílde, R.; Berenbaum, F.; Sellam, J. 2017. The nuclear factor-erythroid 2-related factor/hemeoxygenase-1 axis is critical for the inflammatory features of type 2 diabetes-associated osteoarthritis. *Journal of biological chemistry*, 292(35): 14505-14515.
- Vaamonde García, C.; Flórez Fernández, N.; Torres, M.D.; Lamas Vázquez, M.J.; Blanco, F.J.; Domínguez, H.; Meijide Faílde, R. 2021. Study of fucoidans as natural biomolecules for therapeutical applications in osteoarthritis. *Carbohydrate polymers*, 258: 117692.
- Wang, R. 2002. Two's company, three's a crowd: can H₂S be the third endogenous gaseous transmitter? *FASEB journal*, 16(13): 1792-1798.
- Zhang, H.; Zhi, L.; Moore, P.K.; Bhatia, M. 2006. Role of hydrogen sulfide in cecal ligation and puncture-induced sepsis in the mouse. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology*, 290(6): L1193-L1201.
- Zhou, S.; Cui, Z.; Urban, J.P. 2004. Factors influencing the oxygen concentration gradient from the synovial surface of articular cartilage to the cartilage-bone interface: a modeling study. *Arthritis & rheumatology*, 50(12): 3915-3924.