



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

CURSO ACADÉMICO 2022-2023

TRABAJO DE FIN DE MÁSTER

**Papel del sulfuro de hidrógeno en la
polarización de macrófagos asociada a la
artrosis metabólica**

Natalia Mercedes Lendoiro Cino

17 de febrero de 2023



El Dr. Carlos Vaamonde García, investigador del Instituto de Investigación Biomédica de A Coruña (INIBIC) del grupo de Reumatología y profesor en la Facultad de Ciencias de la Universidad de la Coruña,

CERTIFICA QUE

El presente Trabajo de Fin de Máster titulado "Papel del sulfuro de hidrógeno en la polarización de macrófagos asociada a la artrosis metabólica" presentado por Natalia Mercedes Lendoiro Cino, ha sido realizado bajo su dirección y autorizan su presentación para que pueda ser juzgado por el tribunal correspondiente.

Y para que así conste, expide y firma el presente informe en A Coruña, a 16 de febrero de 2023.

Fdo: Carlos Vaamonde García

Fdo: Natalia Mercedes Lendoiro Cino

INDICE

ÍNDICE DE ABREVIATURAS	vi
RESUMEN	I
RESUMO	II
ABSTRACT	IV
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. La articulación	1
1.2. Tipos de articulaciones	1
1.3. Diartrosis o articulación sinovial	1
1.4. Cartílago articular	2
1.5. Membrana sinovial	3
1.6. La artrosis	4
1.7. Tejido sinovial en la artrosis	6
1.8. Artrosis e Inflamación	6
1.9. Macrófagos sinoviales	7
1.10. Sulfuro de hidrógeno	8
1.11. Señalización de H₂S en el mantenimiento de la homeostasis M1/M2 en macrófagos	9
1.12. Papel del H₂S en la artrosis	10
2. OBJETIVOS	12
3. METODOLOGÍA	14
3.1. Cultivo celular	14
3.1.1. Línea celular de macrófagos	14
3.1.2. Activación de células THP-1	14
3.1.3. Estimulación de los macrófagos.....	14
3.2. Determinación de moléculas de superficie por citometría de flujo ..	15
3.3. Análisis de la expresión génica	15
3.3.1. Extracción de ARN	15
3.3.2. Cuantificación de ARN	16
3.3.3. Retrotranscripción a ADNc	16
3.3.4. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	16
3.4. Análisis de la expresión proteica mediante Western blot	18
3.4.1. Extracción de proteína	18
3.4.2. Electroforesis	18

3.4.3.	Inmunotransferencia	18
3.4.4.	Inmunodetección.....	19
3.5.	Determinación de IL-6	20
3.6.	Análisis de la capacidad de Proliferación	20
3.7.	Inmunohistoquímica (IHQ).....	21
3.8.	Análisis estadístico	22
4.	RESULTADOS.....	23
4.1.	Evaluación de la maquinaria de síntesis enzimática de H₂S en macrófagos	23
4.1.1.	Análisis de la expresión génica de CBS, CSE y MPST	23
4.1.2.	Análisis de la expresión proteica de CBS y CSE	24
4.2.	Caracterización fenotípica de macrófagos y efecto de la adición de una fuente exógena de H₂S.....	25
4.3.	Respuesta inflamatoria en macrófagos.....	30
4.3.1	Niveles relativos de expresión génica de los mediadores pro-inflamatorios IL-6, IL-8 e iNOS	30
4.3.2	Niveles de IL-6 liberados al medio extracelular	31
4.4.	Evaluación del sistema anti-oxidante Nrf-2/HO-1	32
4.4.1	Efecto en la expresión proteica de Nrf-2.....	32
4.4.2.	Efecto en la expresión génica de HO-1	33
4.4.3.	Efecto en la expresión proteica de HO-1	33
4.5.	Expresión de CSE en la membrana sinovial en pacientes OA y OA diabéticos.....	34
5.	DISCUSIÓN	36
6.	CONCLUSIONES	42
7.	BIBLIOGRAFÍA	44
8.	ANEXO I: COPIA DEL MODELO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA EL PACIENTE.....	49
9.	AGRADECIMIENTOS.....	53

INDICE DE TABLAS

Tabla 1: Secuencias de cebadores utilizados	17
Tabla 2: Anticuerpos primarios para Western blot	19

INDICE DE FIGURAS

Figura 1: Estructura de una articulación sinovial.	2
Figura 2: Histología de la membrana sinovial.	4
Figura 3: Perfiles de macrófagos en artrosis. Vías pro-inflamatoria y pro-condrogénica	8
Figura 4: Papel del H₂S en la polarización de los macrófagos	10
Figura 5: Expresión génica de CBS, CSE, MPST.	24
Figura 6: Expresión proteica de CBS y CSE.....	25
Figura 7: Niveles de expresión génica de marcadores vinculados a M1.	26
Figura 8: Niveles de expresión génica de marcadores vinculados a M2.	27
Figura 9: Efecto de los diferentes estímulos sobre la expresión de proteínas de membrana.....	28
Figura 10: Evaluación de la proliferación celular.....	29
Figura 11: Análisis de la expresión génica de mediadores pro-inflamatorios	30
Figura 12: Análisis de los niveles de IL-6 secretados al medio de cultivo.	32
Figura 13: Análisis de la expresión génica de HO-1.	33
Figura 14: Análisis de la expresión proteica de HO-1/Nrf-2.	34
Figura 15: Análisis de la expresión de CSE en muestras humanas de tejido sinovial.	35

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

ADN:Ácido desoxirribonucleico

ADNc: Ácido desoxirribonucleico complementario.

ARN: Ácido ribonucleico.

BrdU: 5-bromo-2'-desoxiuridina

CBS: Cistationina β -sintasa.

CCL 18: Ligando 18 de quimiocina

CD: Cúmulo de diferenciación

CO₂: Dióxido de carbono

COX-2: Ciclooxygenasa 2

CSE: cistationina γ -liasa.

CSF1R: Receptor del factor estimulante 1 de colonias

DB: Diabetes

EDTA: Ácido etilendiaminotetracético.

ELISA: Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas

FITC: Isotiocianato de fluoresceína

FSC:Dispersión frontal

GA:Glucosa alta

GN:Glucosa normal

HLA: Complejo principal de histocompatibilidad

HO-1: Hemoxigenasa 1

H₂S: Sulfuro de hidrógeno

IHQ: Inmunohistoquímica

IL: Interleucina

IL-1Ra: Antagonista del receptor IL-1

IMF: Intensidad media de fluorescencia

iNOS: Óxido nítrico sintasa

LPS: Lipopolisacárido

MMP-9: Metaloproteasa de matriz 9

MPST: 3-mercaptopiruvato sulfuro transferasa

NO: Óxido nítrico

NOX4: NADPH oxidasa 4

Nrf-2: Factor nuclear eritroide 2

OA: Artrosis

PBS: Tampón fosfato salino

PCR: Reacción en cadena de polimerasa

PE: Ficoeritrina

PMA: Acetato miristato de forbol

PGE2: Prostaglandina natural E2

ROS: Especies reactivas de oxígeno

RPMI: Roswell Park Memorial Institute

MARCO: Receptor de macrófagos con estructura de colágeno

SSC: Dispersión lateral

TGF- β : Factor de crecimiento transformante beta

TNF- α : Factor de necrosis tumoral alfa

RESUMEN

Introducción y objetivos:

Macrófagos presentes en el revestimiento sinovial de las articulaciones están involucrados en la inflamación del tejido, participando así en la progresión de la artrosis (OA). En concreto, tiene lugar un incremento en el porcentaje de macrófagos tipo M1 (pro-inflamatorios) sobre los de tipo M2 (anti-inflamatorios). El sulfuro de hidrógeno (H₂S), una pequeña molécula gaseosa que se sintetiza entre otros tejidos en la articulación, está implicado en la polarización de macrófagos manteniendo el equilibrio homeostático M1/M2. Sin embargo, estudios recientes señalan una reducción en la síntesis enzimática del H₂S en los pacientes artrósicos, y específicamente en su fenotipo metabólico. De esta forma, en este trabajo evaluamos si un estrés por altos niveles de glucosa podría favorecer la polarización de macrófagos hacia el tipo M1, y si la administración de una fuente exógena de H₂S atenuaría estos efectos.

Metodología:

Se realizó un modelo *in vitro* de OA asociada a diabetes (DB) en macrófagos, empleando la línea celular de monocitos TPH-1. En primer lugar, las células se diferenciaron a macrófagos maduros con éster de alcohol forbol (PMA). Las células fueron luego estimuladas con lipopolisacárido (LPS) bajo condiciones normales (GN; 1g/l) o altas de glucosa (GA; 4,5 g/l) en presencia o ausencia de una fuente exógena de H₂S (Gyy-4137, un liberador lento del gas). La polarización de los macrófagos se monitorizó mediante estudios de expresión génica y proteica evaluando marcadores de superficie utilizando citometría de flujo. Además, se determinó la proliferación celular y la liberación del mediador pro-inflamatorio interleucina 6 (IL-6). Finalmente, se evaluó la expresión de la enzima sintetizadora de sulfuro cistationina γ -liasa (CSE) en muestras de

tejido sinovial de pacientes artrósicos con o sin diagnóstico de DB tipo II (OA vs OA-DB).

Resultados:

La incubación en altos niveles de glucosa de macrófagos activados con LPS incrementó la expresión de mediadores asociados al fenotipo M1, tanto a nivel génico como proteico. Estos resultados fueron confirmados mediante la detección de una mayor liberación de IL-6 y capacidad proliferativa en estas células. Además, también detectamos que la activación de los macrófagos estaba asociada a una menor expresión génica de la maquinaria de síntesis de H₂S. A destacar, el co-tratamiento de las células con Gyy-4137 atenuó los efectos del estrés por altos niveles de glucosa, posiblemente al activar la respuesta anti-oxidante mediada por la vía de señalización Nrf-2/HO-1. En relación, los pacientes OA-DB mostraban menores niveles de expresión de CSE en el tejido sinovial que los pacientes OA no DB.

Conclusiones:

Nuestro estudio parece reforzar el papel clave del H₂S en la OA y concretamente en su fenotipo metabólico, así como señalar sus efectos en la polaridad de macrófagos sinoviales, abriendo nuevas perspectivas terapéuticas en el manejo de esta patología.

RESUMO

Introducción y objetivos:

Macrófagos presentes no revestimento sinovial das articulações estão envolvidos na inflamação do tecido, participando assim na progressão da artrose (OA). Em concreto, tem lugar um incremento na percentagem de macrófagos tipo M1 (pro-inflamatórios) sobre os de tipo M2 (anti-inflamatórios). O sulfuro de hidrógeno (H₂S), unha pequena molécula gasosa que se sintetiza entre outros tecidos na articulação, está implicado na polarização de macrófagos mantendo o equilibrio homeostático M1/M2.

Porén, estudos recentes sinalan unha redución na síntese encimática do H₂S nos pacientes artrósicos, e especificamente no seu fenotipo metabólico. Deste xeito, neste traballo avaliamos se un estrés por altos niveis de glucosa podería favorecer a polarización de macrófagos facía o tipo M1, e se a administración dunha fonte exóxena de H₂S podería atenuar estes efectos.

Metodoloxía:

Realizouse un modelo *in vitro* de OA asociada a diabetese (DB) en macrófagos, empregando a liña celular de monocitos TPH-1. En primeiro lugar, as células diferenciáronse a macrófagos maduros con ester de alcohol forbol (PMA). As células foron logo estimuladas con lipopolisacárido (LPS) baixo condicións normais (GN; 1g/l) ou altas de glucosa (GA; 4,5 g/l) na presenza ou ausencia dunha fonte exóxena de H₂S (Gyy-4137, un liberador lento do gas). A polarización dos macrófagos monitorizouse mediante estudos de expresión xénica e proteica avaliando marcadores de superficie utilizando citometría de fluxo. Ademais, determinouse a proliferación celular e a liberación do mediador pro-inflamatorio interleucina 6 (IL-6). Finalmente, avaliouse a expresión da encima sintetizadora de sulfuro cistationina γ -liasa (CSE) en mostras de tecido sinovial de pacientes artrósicos con ou sen diagnóstico de DB tipo II (OA vs OA-DB).

Resultados:

A incubación en altos niveis de glucosa de macrófagos activados con LPS incrementou a expresión de mediadores asociados ao fenotipo M1, tanto a nivel xénico como proteico. Estes resultados foron confirmados mediante a detección dunha maior liberación de IL-6 e capacidade proliferativa nestas células. Ademais, tamén detectamos que a activación dos macrófagos estaba asociada a unha menor expresión xénica da maquinaria de síntese de H₂S. A destacar, o co-tratamento das células con Gyy-4137 atenuou os efectos do estrés por altos niveis de glucosa, posiblemente ao activar a resposta anti-oxidante mediada pola vía de sinalización Nrf-2/HO-1. En

relación, os pacientes OA-DB mostraban menores niveis de expresión de CSE no tecido senónvial que os pacientes OA non DB.

Conclusións:

O noso estudo parece reforzar o papel clave do H₂S na OA e concretamente no seu fenotipo metabólico, así como sinalar os seus efectos na polaridade de macrófagos senónviais, abrindo novas perspectivas terapéuticas no manexo desta patoloxía.

ABSTRACT

Introduction and objectives:

Macrophages present in the synovial lining of the joints are involved in tissue inflammation, thus participating in the progression of osteoarthritis. Specifically, there is an increase in the percentage of macrophages type M1 (pro-inflammatory) over those of type M2 (anti-inflammatory). Hydrogen sulfide (H₂S), a small gaseous molecule that is synthesized among other tissues in the joint, is involved in the polarization of macrophages maintaining the M1/M2 homeostatic balance. However, recent studies indicate a reduction in the enzymatic synthesis of H₂S in OA patients, and specifically in their metabolic phenotype. In this work we evaluated whether a stress due to high glucose levels could favor the polarization of macrophages towards type M1, and if the administration of an exogenous source of H₂S could attenuate these effects.

Methods:

An *in vitro* model of osteoarthritis associated with diabetes (DB) in macrophages using the TPH-1 monocyte cell line was performed. First, cells were differentiated to mature macrophages with phorbol myristate acetate (PMA). Cells were then stimulated with lipopolysaccharide (LPS) under normal (GN; 1g/l) or high glucose (GA; 4,5 g/l) conditions in the presence or absence of an exogenous source of H₂S (Gyy-4137, a slow gas releaser). Macrophage polarization was monitored by gene and protein expression

studies evaluating surface markers using flow cytometry. In addition, cell proliferation and release of the pro-inflammatory mediator interleukin 6 (IL-6) were determined. Finally, we evaluated the expression of the sulfur synthionizing enzyme cystathionine γ -lyase (CSE) in synovial tissue samples from osteoarthritic patients with or without a diagnosis of type II DB (OA vs OA-DB).

Results:

Incubation of LPS activated macrophages in high glucose conditions increased the expression of mediators associated with the M1 phenotype, both at gene and protein levels. These results were confirmed by the increase of IL-6 levels and proliferative capacity in these cells. In addition, we observed that the activation of macrophages was associated with a reduced gene expression of the H₂S synthesis machinery. It was noted that co-treatment of the cells with Gyy-4137 attenuated the effects of stress from high glucose levels, possibly by activating the anti-oxidant response mediated by the Nrf-2/HO-1 signaling pathway. In addition, OA-DB patients showed lower levels of CSE expression in synovial tissue than non-DB OA patients.

Conclusions:

Our study seems to reinforce the key role of H₂S in OA and specifically its metabolic phenotype, as well as to point out its effects on the polarity of synovial macrophages, opening new therapeutic perspectives in the management of this pathology.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. La articulación

El aparato locomotor es el sistema encargado de facilitar el movimiento y está formado por los huesos, las articulaciones, los músculos, los tendones y los ligamentos. Entre estos elementos que componen el aparato locomotor, la articulación consiste en la unión entre dos o más huesos por sus superficies de contacto. Su forma y grado de movilidad varía ampliamente en relación con sus requerimientos funcionales. Las articulaciones derivan del mesénquima y pueden ser fibrosas, cartilaginosas y sinoviales (1).

1.2. Tipos de articulaciones

Como hemos comentado, las articulaciones se clasifican de acuerdo a la naturaleza del material que separa los huesos en: fibrosas, cartilaginosas y sinoviales. Las articulaciones fibrosas son aquellas con escasa movilidad (sinartrosis) y están formadas por tejido conectivo de tipo fibroso, no hay cavidad articular; podemos encontrarlas entre los huesos que forman el cráneo. Las articulaciones cartilaginosas son poco móviles o semi-móviles (anfiartrosis), sin cavidad articular y los huesos se mantienen unidos por cartílago; a este tipo pertenece la articulación que se encuentra entre los discos intervertebrales. Por último, las articulaciones sinoviales, son las más numerosas de nuestro organismo y poseen gran movilidad (diartrosis), cavidad articular y superficies óseas recubiertas por cartílago hialino. La articulación sinovial está compuesta por una cápsula externa, una membrana sinovial que reviste la cavidad sinovial y libera dentro de ella el líquido sinovial, cartílago hialino, huesos, tendones y ligamentos (1).

1.3. Diartrosis o articulación sinovial

Son las articulaciones más comunes del esqueleto. Constituyen la unión entre dos o varios huesos separados y revestidos de una capa de cartílago.

Los huesos articulados están unidos por un potente aparato fibroso, constituido por una cápsula, a menudo reforzada por los tendones de los músculos, los ligamentos intra-articulares y los meniscos. La cavidad articular es virtual, es decir, que, en su estado normal, sus bordes se adhieren a la faceta opuesta. Sin embargo, las facetas articuladas y las partes blandas están separadas por una fina película de líquido sinovial, que es un ultrafiltrado del plasma, cuya composición está modificada por las células de la membrana sinovial que bordea la cavidad articular, fuera de las superficies cartilagosas (2). (figura 1)

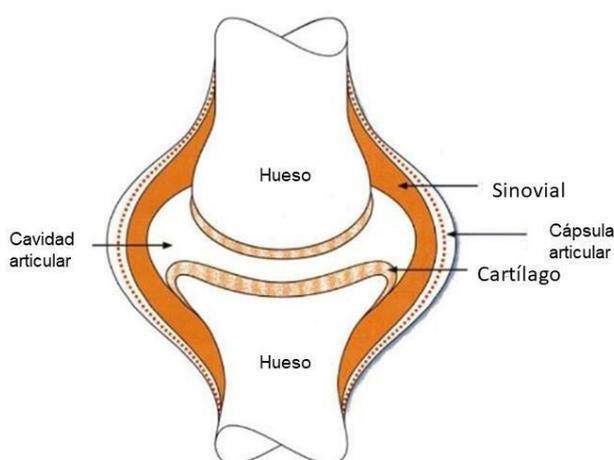


Figura 1: Estructura de una articulación sinovial. Imagen extraída y modificada de Quintero *et al.* 2009 (2).

1.4. Cartílago articular

Es cartílago hialino que reviste las superficies articulares. Presenta un aspecto blanquecino brillante. Su grosor oscila entre 1 y 5 mm. En esencia, el cartílago articular está constituido por una población celular relativamente escasa, un único tipo celular, los condrocitos, que ocupan el 1-2% del volumen total, dispuestos de manera dispersa en la abundante matriz extracelular que sintetiza. Esta matriz extracelular contiene lípidos, sales inorgánicas y un 60-80% de agua que mantienen atrapados los complejos macromoleculares de proteoglicanos y que, a su vez, están retenidos en una rica red de colágeno tipo II dispuesta en varios planos que actúa como un esqueleto fibroso y que, en conjunto, se opone a las fuerzas de

estiramiento y compresión. La interacción agua-proteoglucanos proporciona a la matriz extracelular su característica viscoelasticidad, actuando como un amortiguador hidrodinámico. El colágeno confiere fuerza de tensión y los proteoglucanos retienen agua y permiten la elasticidad y resistencia a la compresión. Es avascular y se nutre por difusión del líquido sinovial durante el movimiento articular (1).

1.5. Membrana sinovial

La membrana sinovial es una fina membrana especializada que se sitúa entre la cavidad articular, a la que limita, y la cápsula articular. Está constituida por dos capas: la íntima (capa sinovial) y la subíntima, tejido conjuntivo laxo subyacente (figura 2) (3,4).

Capa íntima

La capa íntima es la capa funcional de la membrana sinovial, y en condiciones fisiológicas consta de uno hasta cuatro estratos celulares intrincados en una red de matriz extracelular. En esta capa se distinguen las células derivadas de los macrófagos (sinoviocitos de tipo A) de las provenientes de los fibroblastos (sinoviocitos de tipo B). Los sinoviocitos fibroblásticos se caracterizan por una expresión considerable de moléculas de adhesión (3).

Sinoviocitos macrófagos o de tipo A: tienen una función fagocítica. En la membrana sinovial normal existen escasos sinoviocitos macrófagos (10-20%) que, sin embargo, predominan ampliamente (hasta un 80% de las células) en la inflamación, quizá por reclutamiento de los monocitos sanguíneos y los macrófagos de la capa subíntima (3,5).

Sinoviocitos fibroblásticos o de tipo B: contienen escasas vacuolas, pero numerosos retículos endoplásmicos rugosos y vesículas de secreción que reflejan su capacidad de síntesis proteica. Presentan una intensa expresión de moléculas de adhesión que hace que estas células puedan anclarse en

la membrana sinovial sin desprenderse durante los movimientos articulares. Los sinoviocitos fibroblásticos también producen lubricina, elemento imprescindible, para las propiedades lubricantes del líquido sinovial (3,6).

Capa subíntima

Predominan los fibroblastos y los macrófagos, que se acumulan inmediatamente por debajo de la capa superficial y alrededor de los vasos. Estas células no tienen el mismo fenotipo que los de la capa íntima. Los fibroblastos se asemejan a los fibroblastos cutáneos. Existen algunos mastocitos y adipocitos. Además, según su localización en el tejido, la subíntima es de tipo areolar, adiposo o fibroso (3).

Dadas las características de estos tejidos, desequilibrios en su homeostasis pueden provocar, como consecuencia, enfermedades articulares. En este sentido, la OA es la patología crónica más frecuente en las articulaciones.

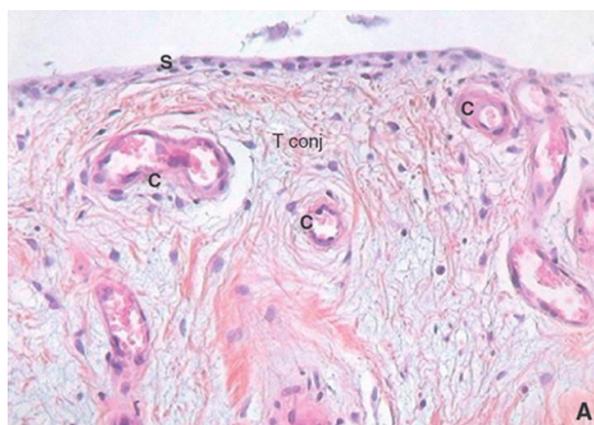


Figura 2: Histología de la membrana sinovial. Tinción con hematoxilina-eosina 20X. S: Sinoviocitos en la capa íntima. C: Tejido conectivo en la capa subíntima, la cual está altamente vascularizada. Extraído y modificado de Ea et al., 2008 (3).

1.6. La artrosis

La artrosis u osteoartritis es una enfermedad multifactorial que afecta el cartílago de las articulaciones sinoviales provocando la degradación de la matriz y la muerte de los condrocitos. Como resultado, se pierde integridad

en el cartílago articular, surgen modificaciones en el hueso subcondral y se afecta la membrana sinovial (7,8).

Esta enfermedad es la artropatía más frecuente en la población, hasta el punto de que más del 70% de los mayores de 50 años tiene signos radiológicos de OA en alguna localización (9). La prevalencia de OA sintomática en España, en una o más localizaciones (columna cervical, lumbar, cadera, rodilla o mano), es del 29,35% y se incrementa con la edad, alcanzando su valor más alto en los mayores de 80 años, siendo más frecuente en mujeres, sobre todo a partir de los 60 años (10). La prevalencia mundial de esta enfermedad aumenta con la edad, es rara en menores de 45 años, y afecta sobre todo a mujeres, aunque la diferencia entre sexos depende principalmente de la localización de la OA y del grupo de edad. Las estimaciones mundiales son que el 9.6% de los hombres y el 18 % de las mujeres mayores de 60 años padecen OA sintomática (9).

Esta enfermedad es, además, la causa más común de incapacidad en personas de edad avanzada, disminuyendo significativamente su calidad de vida (11). Su etiología es compleja, muchos factores juegan un rol en la patogenia de esta condición, incluyendo la edad, factores genéticos, inflamación, trauma, obesidad y otros. Además, estos interactúan entre sí, contribuyendo a alterar la estructura del cartílago, el hueso subcondral y la membrana sinovial, llevando a los cambios macroscópicos que caracterizan a la OA (12). Actualmente, en la OA se observan diferentes fenotipos, de esta forma existe el fenotipo de envejecimiento, el fenotipo inflamatorio, el biomecánico, el hormonal o también llamado osteoporótico y el metabólico (alteración del metabolismo lipídico o glucídico) (11). En la actualidad, la diabetes (DB) es considerada un factor de riesgo adicional para la ocurrencia y la severidad de la OA (13–15). Por otra parte, la relación entre estas dos enfermedades podría sustentarse en el papel que juega el exceso de glucosa en la presencia de productos finales de glicación avanzada, el estrés oxidativo y la inflamación sistémica (15).

Si bien la OA es considerada como un proceso de “desgaste” del cartílago, lo cierto es que es un proceso activo en el cual ocurren muchos cambios a nivel del cartílago, tejido sinovial, y hueso subcondral, tanto estructurales como moleculares (12).

1.7. Tejido sinovial en la artrosis

El tejido sinovial juega un papel muy relevante en la patogenia de la OA. En etapas tardías de la enfermedad, se hace notoria una inflamación de la membrana sinovial con secreción de mediadores inflamatorios que pueden modificar la expresión de la misma. Además, existe una correlación entre el grado de compromiso de la sinovial y la severidad clínica de la enfermedad, y en especial el dolor. Igualmente, se ha demostrado que existe una clara correlación entre la presencia de sinovitis y la progresión de la enfermedad y el daño al cartílago (12).

1.8. Artrosis e Inflamación

La inflamación es una respuesta inmune a patógenos o situaciones de estrés en las células (16), el cual juega un papel importante en la OA (17). La inflamación eleva los niveles de citoquinas pro-inflamatorias que activan el sistema inmune innato compuesto por células fagocíticas como macrófagos o neutrófilos. Estas citoquinas activan a su vez diferentes vías inflamatorias en las células (16).

Como se indicó en apartados anteriores, la inflamación también juega un papel importante en la membrana sinovial, la cual se caracteriza por un tejido altamente vascularizado e hiperplásico (18). Estos procesos pueden finalmente, al no ser controlados, derivar en fibrosis que se caracteriza por la acumulación de células sinoviales fibroblásticas con una síntesis elevada de matriz extracelular, que trae aparejada la formación de una estructura rígida denominada pannus. (19). Una de las consecuencias de estos cambios en la membrana sinovial es un aumento del número de leucocitos y macrófagos en respuesta a la adhesión de las citoquinas a los receptores de membrana de los sinoviocitos (18). Estos receptores son uno de los

principales mecanismos de modulación de las respuestas pro-inflamatorias, tales como los receptores de interleucinas IL-1 (20). Por el contrario, las citoquinas IL-4, IL-10 (20) y enzimas como la hemoxigenasa-1 (HO-1) (21) actúan como mediadores anti-inflamatorios, contrarrestando el efecto catabólico tanto en la sinovial como en el cartílago. El equilibrio entre la liberación de mediadores pro-inflamatorios y pro-catabólicos y las respuestas anti-inflamatorias juega un papel importante en el balance entre la formación y destrucción de la matriz extracelular de los tejidos (20).

Por tanto, las células del tejido sinovial, y en concreto, los macrófagos sinoviales cumplen un rol en el mantenimiento de la homeostasis entre inflamación y resolución de la misma.

1.9. Macrófagos sinoviales

Los macrófagos, junto con los fibroblastos, se encuentran presentes en el revestimiento sinovial de las articulaciones. Están involucrados en la inflamación sinovial, y se ha demostrado que desempeñan un papel destacado en la progresión de la OA (22).

Los macrófagos son células inmunes innatas que expresan MHC (complejo mayor de histocompatibilidad, por sus siglas en inglés) clase II, lo que les da la capacidad de iniciar una respuesta inmune adaptativa a través de la activación de las células T. Los macrófagos del tejido sinovial expresan CD14, CD68, CSF1R, HLA-DR y MARCO. Comprenden distintos subconjuntos de poblaciones celulares heterogéneas, y entre sus funciones se encuentran la eliminación de restos celulares y cuerpos extraños, la vigilancia inmune de los tejidos y la resolución de la inflamación (23).

El microambiente sinovial regula la heterogeneidad de los macrófagos, controla la polarización de mismos en un espectro de función pro-inflamatoria y anti-inflamatoria; los fenotipos extremos son conocidos como M1 y M2. Los macrófagos M1 se caracterizan por su papel pro-inflamatorio, con una alta liberación de IL-1 β , TNF- α , IL-6, expresión inducible de óxido nítrico sintasa (iNOS) y generación de especies reactivas de oxígeno. Este

fenotipo se asocia con la exacerbación de la inflamación sinovial y la destrucción articular. Mientras que los macrófagos M2 se caracterizan por la producción de citoquinas anti-inflamatorias, IL-10, antagonista del receptor IL-1(IL-1Ra) y TGF- β . Por lo que las células M2 se asocian con la resolución de la inflamación de la articulación (figura 3) (23).

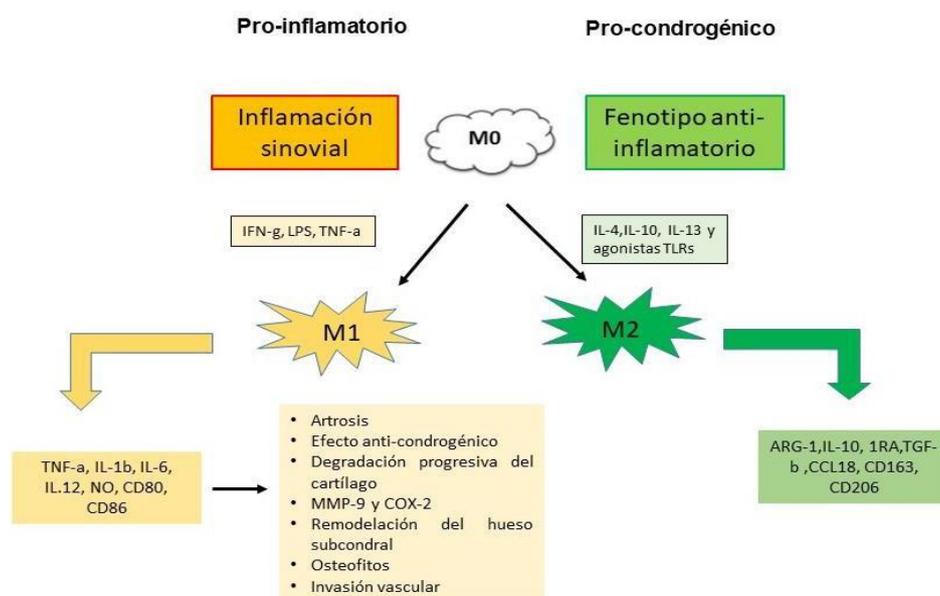


Figura 3: Perfiles de macrófagos en artrosis. Vías pro-inflamatoria y pro-condrogénica. Imagen extraída y modificada de Fernandes *et al.*, 2020 (23).

1.10. Sulfuro de hidrógeno.

El sulfuro de hidrógeno (H₂S) es una pequeña molécula gaseosa que se sintetiza en el organismo de manera endógena en la mayoría de los tejidos, actuando como una molécula de señalización celular que interviene en una gran cantidad de procesos fisiológicos (24). El H₂S, al ser liposoluble, posee la capacidad de atravesar la membrana plasmática sin un transportador específico, lo cual le permite participar 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 gran variedad de objetivos biológicos (25).

Síntesis de H₂S

El H₂S es sintetizado de manera endógena a través de dos vías. Una vía que es resultado de la reducción de la ruta elemental de azufre a H₂S y otra vía de síntesis, a través de tres enzimas: cistationina γ -liasa (conocida como CSE o CTH), cistationina β -sintasa (CBS) y 3-mercaptopiruvato sulfurotransferasa (MPST) (26).

Funciones del H₂S

Uno de los procesos en los que interviene el H₂S es la reducción de la inflamación y la protección de los tejidos frente a lesiones; favoreciendo la resolución de la inflamación, promoviendo la apoptosis de los neutrófilos y estimulando la diferenciación de los macrófagos hacia el fenotipo M2 (24), modula la actividad de Nrf-2 (factor nuclear derivado de eritroide 2, por sus siglas en inglés) y NF- κ B (factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas, por sus siglas en inglés), lo que promueve la reducción de la producción de citoquinas y factores pro-inflamatorios (25).

1.11. Señalización de H₂S en el mantenimiento de la homeostasis M1/M2 en macrófagos

El nivel endógeno de H₂S se ha vinculado con la activación de macrófagos, la polarización y la formación del inflamasoma (27). El H₂S promueve una señalización de tipo anti-inflamatoria, impactando en la activación, polarización de los macrófagos y la formación del inflamasoma a través de distintas vías. Además, es probable que los macrófagos también establezcan el umbral para la activación de la señalización H₂S bajo diversos estímulos (28).

Como se describió anteriormente, los macrófagos muestran diferentes fenotipos funcionales dependiendo del entorno ambiental en el que residen. Así, la señalización mediada por H₂S está implicada en la polarización de macrófagos, de forma que actúa como un regulador crítico para mantener

el equilibrio homeostático M1 / M2 (figura 4) (29). En este sentido, se encontró que el H₂S endógeno atenúa el estrés oxidativo y el daño inflamatorio inducido por LPS inhibiendo la vía de señalización NOX4-ROS en macrófagos (30).

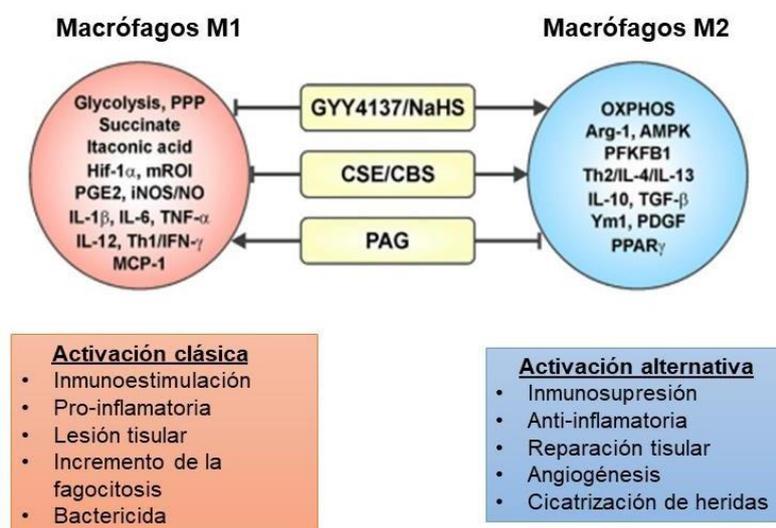


Figura 4: Papel del H₂S en la polarización de los macrófagos. Imagen extraída y modificada de Rahman *et al.*, 2020 (29).

1.12. Papel del H₂S en la artrosis

En lo que respecta a la patología artrósica, existe evidencia de que en pacientes con OA los niveles plasmáticos de H₂S son significativamente más elevados que en los controles (31). Además, se comprobó *in vitro*, la presencia de enzimas asociadas con la síntesis de H₂S, tales como CBS y CSE (24). En otros trabajos, se observó que la biosíntesis de H₂S en las articulaciones artrósicas podría encontrarse reducida (32,33) y en un estudio recientemente publicado (34) se detectó que la reducción en la síntesis enzimática de H₂S observado en los pacientes artrósicos era específica del fenotipo de enfermedad asociada a la DB. Por tanto, diferentes evidencias parecen indicar el papel del H₂S en la OA y concretamente el su fenotipo metabólico, así como sus efectos en la polaridad de macrófagos. Sin embargo, son necesarios más estudios para confirmar estas premisas, y de esta forma determinar si el H₂S podría

participar en la polarización de macrófagos sinoviales residentes o infiltrados observada en la OA metabólica.

2. OBJETIVOS

Objetivo General

Evaluar si el estrés por altos niveles de glucosa podría favorecer la polarización de macrófagos hacia el tipo I, y si la administración de una fuente exógena de H₂S podría atenuar estos efectos.

Objetivos específicos

1. Establecer un modelo *in vitro* de estrés por glucosa en una línea celular de macrófagos, y determinar la expresión proteica de CBS y CSE, las enzimas más importantes involucradas en la síntesis de H₂S, mediante Western blot.
2. Estudiar en el modelo *in vitro* de glucotoxicidad establecido la sensibilidad de macrófagos a estímulos inflamatorios, y el efecto del co-tratamiento con un donador de H₂S de liberación lenta.
 - 2.1. Determinación del fenotipo celular mediante evaluación de la expresión de moléculas correspondientes a los perfiles M1 y M2 por citometría de flujo.
 - 2.2. Cuantificación de la expresión génica y proteica mediadores pro-inflamatorios por qPCR y Western blot, respectivamente, y de liberación al medio extracelular por ELISA.
3. Estudiar vía de señalización a través de las cuales el H₂S modula la respuesta anti-inflamatoria y anti-oxidante.
 - 3.1. Evaluar si el H₂S ejerce sus efectos a través modular la expresión del factor transcripcional Nrf-2, midiendo sus niveles proteicos a través de Western blot.

3.2. Determinar la expresión génica y proteica de HO-1, diana transcripcional clásica de Nrf-2, mediante qPCR y Western blot, respectivamente.

4. Evaluar en biopsias de tejido sinovial de pacientes, la expresión de las enzimas más importantes involucradas en la síntesis de H₂S mediante inmunohistoquímica.

3. METODOLOGÍA

3.1. Cultivo celular

3.1.1. Línea celular de macrófagos

Se empleó la línea celular de monocitos THP-1. Las células crecen en suspensión y se mantuvieron en cultivo en medio RPMI 1640 (Lonza, Suiza) suplementado con 10% v/v de suero bovino fetal (SBF) (Gibco, Life technologies, Inglaterra) inactivado por calor (56 °C 30 minutos) y 1% (v / v) de penicilina / estreptomina (Gibco, Life technologies, Inglaterra) (P/S) para evitar contaminación bacteriana y fúngica en una estufa con CO₂ (5%) a 37 °C.

3.1.2. Activación de células THP-1

Previo a la realización de los experimentos, la línea celular de monocitos fue activada para su transformación a macrófagos (M0). Para ello, las células fueron estimuladas con 500 nM de PMA (acetato miristato de forbol, por sus siglas en inglés), durante 3 horas y luego lavadas con suero salino (35). A continuación, se centrifugaron a 300g durante 10 minutos, y ya activadas a macrófagos, se cultivaron durante 24 horas en placa de 12, 24 y 96 pocillos en RPMI 1640, 2% SFB (Gibco, Life technologies), inactivado por calor y 1% (v / v) de penicilina / estreptomina (Gibco, Life technologies, Inglaterra) con dos diferentes concentraciones de glucosa: 1 g/L (equivalente a condiciones normales de glucosa) y 4,5 g/L (equivalente a niveles altos de glucosa).

3.1.3. Estimulación de los macrófagos

A las 24 horas de la activación con PMA, los macrófagos fueron estimulados mediante el agregado de LPS (1µg/ml; Sigma, Estados Unidos) y/o GYY-4137 (500 µM; Santa Cruz Biotechnology, Germany) en medio RPMI 1640 1 g/L y RPMI 1640 4,5 g/L.

3.2. Determinación de moléculas de superficie por citometría de flujo

Para caracterizar fenotípicamente la población de macrófagos, se determinó la expresión de moléculas de superficie en las células por citometría de flujo. Para ello, las células fueron estimuladas durante 24 horas en placas de 24 pocillos (2.5×10^5 células), levantadas utilizando tripsina (Sigma-Aldrich), lavadas con PBS (Phosphate Buffered Saline) y centrifugadas a 300g durante 10 minutos. Luego fueron incubadas 30 minutos en hielo con los anticuerpos monoclonales conjugados con fluorocromos CD86-PE y CD 206- FITC (Biolegend, Estados Unidos), lavadas con PBS, centrifugadas a 300g durante 10 minutos y resuspendidas en 150 μ L de PBS. Las células marcadas fueron analizadas en un citómetro FACScalibur (Becton Dickinson) adquiriendo 10,000 eventos específicos, utilizando los canales FL-1 y FL-2. Los datos obtenidos fueron analizados utilizando el programa CellQuest (BD). Las regiones de análisis correspondientes a los macrófagos fueron circunscriptas de acuerdo a tamaño y complejidad celular (parámetros FSC y SSC respectivamente). Los resultados se expresaron como intensidad media de fluorescencia (IMF).

3.3. Análisis de la expresión génica

3.3.1. Extracción de ARN

Las células fueron cultivadas en placas de 12 pocillos (5×10^5 células) y estimuladas durante 24 horas. A continuación, se aisló el ARN (ácido ribonucleico) celular utilizando el reactivo TRI Reagent® (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, Estados Unidos), que lisa las células y aísla los ácidos nucleicos. Se eliminó el medio de cultivo de los pocillos y se lavó con PBS. Posteriormente, se agregó TRI Reagent® y luego de incubar durante 10 minutos, se añadió cloroformo (Sigma-Aldrich). Se incubó durante 10 minutos y se centrifugó a 12000 rpm y a 4°C durante 15 minutos. Luego de la centrifugación, recuperamos la fase acuosa en la que se

encuentra el ARN y agregamos isopropanol (Sigma-Aldrich) para favorecer el precipitado del ARN. Posteriormente, se incubó 10 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó a 12000 rpm, a 4°C durante 10 minutos. Al pellet obtenido se le añadió etanol al 75% para favorecer la precipitación del ARN, y se centrifugó a 7500 rpm durante 5 minutos a 4°C. Finalmente, el pellet fue resuspendido en 15 µL de agua libre de ARNasas.

3.3.2. Cuantificación de ARN

El ARN fue cuantificado mediante el espectrofotómetro NanoDROP 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.

3.3.3. Retrotranscripción a ADNc

Para generar el ADN complementario (ADNc) a partir de ARNm la muestra (1000 ng) fue tratada con la enzima transcriptasa reversa. Se utilizó el kit comercial NZY First-Strand cDNA Synthesis Kit (Nzytech, Lisboa, Portugal) que incluye una combinación de hexámeros y oligos dT (NZYRT 2x Master Mix), una mezcla de enzimas (NZYRT Enzyme Mix) que contiene la transcriptasa reversa y un inhibidor de ribonucleasas. Se utilizaron 10 µl de NZYRT 2x Master Mix, 2 µl de NZYRT Enzyme Mix y se llevó a un volumen de 20 µl con H₂O libre de ARNasas. Se incubó a 25°C durante 10 minutos, a 50°C durante 30 minutos y a 85°C durante 5 minutos para inactivar la reacción, colocando posteriormente la muestra a 4°C. Por último, se añadió 1 µl de ribonucleasa NZY Rnase H para eliminar los restos de ARN y se incubó a 37°C durante 20 minutos. El ADNc resultante fue almacenado a -20°C.

3.3.4. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Para poder cuantificar la expresión génica, se cargó una placa de 96 pocillos con un molde de ADN (ácido desoxirribonucleico); dos cebadores específicos (directo y reverso) para la región que se quiere amplificar; dNTPs; MgCl₂, ADN polimerasa termoestable (Taq polimerasa); SYBR

Green (Roche), la muestra y H₂O hasta un volumen final de 10 µl. La reacción se llevó a cabo en un termociclador LightCycler 480 (Roche Diagnostics, Basilea, Suiza). La PCR se realiza en ciclos repetitivos: desnaturalización, hibridación y elongación: activación de la ADN polimerasa 95°C 10 minutos, desnaturalización 94°C 10 segundos, hibridación 55 - 72°C 30 segundos, elongación 72°C 1 min, elongación final 72°C 5 min. Los datos fueron normalizados empleando un control de carga (HouseKeeping). El Housekeeping es un gen que no se modula por los estímulos utilizados. El gen codificante para HPRT fue empleado como marcador de referencia. La secuencia de los cebadores empleados puede verse en la tabla 1.

Tabla 1: Secuencias de cebadores utilizados

Gen	Cebador directo	Cebador reverso
HPRT	TGATAGATCCATTCTATGACTGTAGA	CAAGACATTCTTTCCAGTTAAAGTTG
TBP-1	GCCCATAGTGATCTTTGCAGT	CGCTGGAACCTCGTCTCACTA
HO-1	TCCGATGGGTCCTTACACTC	TAAGGAAGCAGCAAGAGA
INOS	GCTGCCAAGCTGAAATTGA	GATAGCGCTTCTGGCTCTTG
ARG1	TCATCTGGGTGGATGCTCACAC	GAGAATCCTGGCACATCGGGAA
CBS	AGGAGAAGTGTCTGGATGC	TAGGTTGTCTGCTCCGTCTG
CSE	GCATTTCAAAAACGGAATGG	CTCATGCTGTGGATGAGAGG
MPST	ACATCAAGGAGAACCTGGAATC	GATGTGGCCAGGTTCAATG
IL-8	GAGCACTCCATAAGGCACAAA	ATGGTTCCTTCCGGTGGT
IL-6	GATGAGTACAAAAGTCCTGATCCA	CTGCAGCCACTGGTTCTGT
CD86	AGACCTGCCATGCCAATTTG	CGAATCAAACTTGTGCGGC
CD206	AGCCAACACCAGCTCCTCAAGA	CAAAACGCTCGCGCATTGTCCA
CD11C	TGACATTGCATCGAAGCCCTC	TCCGTACCCTCAATGGCAAAG
CD163	TCACAATGAAGATGCTGGCG	CCTGCAAACCACATCAGCTT

3.4. Análisis de la expresión proteica mediante Western blot

3.4.1. Extracción de proteína

Las células fueron cultivadas en placas de 12 pocillos (5×10^5 células) y estimuladas durante 24 horas. A continuación, se extrajeron las proteínas totales citoplasmáticas según un protocolo estandarizado con tampón de lisis Tris-HCl (0.2 M de Tris-HCl pH 6.8, 2 % de SDS (dodecil sulfato sódico), 20 % de glicerol) al que se le añadió un inhibidor de proteasas (Thermo Fisher, EE. UU) a una concentración de $1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$. Para ello, se añadieron 50 μl de tampón de lisis por pocillo, los extractos proteicos se recogieron mediante raspado y se facilitó la lisis hirviendo la muestra 10 minutos a 100°C . Tras lo cual, se centrifugó a 12.500 rpm durante 5 minutos a 4°C para así eliminar los restos celulares no lisados. Por último, se recogió el sobrenadante donde se encontraban contenidas las proteínas y se guardó a -80°C hasta su uso.

3.4.2. Electroforesis

Para la realización de la electroforesis se añadió en primer lugar tampón de carga (10 % SDS, 200mM Tris-HCl pH 6.8, 50 % glicerol, 0.1 % azul de bromofenol y 10 % de β - mercaptetanol (Thermo Fisher, EE. UU) a las muestras y se calentaron a 100°C perdiendo de esa manera su conformación tridimensional, facilitando el acceso al SDS del tampón de carga. Posteriormente, las muestras se corrieron en un gel de acrilamida/bisacrilamida (SDS-PAGE) al 10% (v/v) el gel separador y al 4% (v/v) el gel concentrador, para así facilitar la separación de las proteínas según su peso molecular. Se aplicó una corriente de 80 V mientras las muestras se encontraban en el gel concentrador y a 120 V cuando entraron en el separador.

3.4.3. Inmunotransferencia

Las proteínas separadas en el gel se transfirieron a membranas de fluoruro de polivinilideno (PVDF). Estas membranas fueron activadas previamente con lavados alternos de metanol al 100 % (v/v) (ThermoFisher, EEUU) y

agua destilada para luego mantenerla en tampón de transferencia (glicina (0,001 g/ml), Tris-base (0,002 g/ml), SDS (0,001 g/ml), metanol (10 % (v/v) (ThermoFisher, EEUU). La membrana se mantuvo 15 minutos en el tampón de transferencia a 4°C. Posteriormente, la transferencia se realizó a 20 V durante 30 minutos empleando un trans-blot (Bio-Rad, EEUU). A continuación, se hizo una tinción de la membrana con rojo Ponceau (Sigma-Aldrid, España) para comprobar el éxito de la transferencia. Para eliminar el rojo Ponceau, la membrana se lavó varias veces con agua destilada.

3.4.4. Inmunodetección

Previo a la incubación de la membrana con los anticuerpos primarios, se bloqueó la misma con leche al 5% en tampón de lavado en Tween® 20 al 0.05% (tricina 2mM, NaCl 150 mM, pH final de 7.5.) durante 40 minutos en agitación, bloqueando así los sitios de unión inespecíficos. En esa hora, se prepararon los anticuerpos primarios a razón de una dilución 1:1000 (v/v) en leche. Las membranas se incubaron en unas bolsas de plástico selladas conteniendo dentro la dilución del anticuerpo primario durante toda la noche a 4°C en rotación.

Tabla 2: Anticuerpos primarios para Western blot

Anticuerpo	Dilución	Casa comercial
Nrf-2 (ratón)	1:200	Santa Cruz
HO-1 (conejo)	1:1000	Enzo
Tubulina (ratón)	1:2000	Sigma-Aldrich
CBS (ratón)	1:200	Sigma-Aldrich
CSE (ratón)	1:200	Sigma-Aldrich

Al día siguiente, se lavaron las membranas 3 veces durante 5 minutos cada uno con tampón de lavado, y a continuación se incubaron con los anticuerpos secundarios anti-ratón o anti-conejo (Sigma-Aldrich) según correspondiese, a una dilución 1:1000 en tampón de bloqueo durante 1

hora a temperatura ambiente. Terminado el tiempo de incubación, se realizaron 5 lavados de las membranas de 5 minutos cada uno en tampón de lavado. Finalmente, se procedió al revelado de la membrana usando el sustrato a base de luminol (50% v/v) y solución de peróxido (50% v/v) (Merck KGaA, Alemania) basándonos en la quimioluminiscencia en la cámara de revelado Amersham Imager 600 (GE HealthCare, United Kingdom). La cuantificación de la intensidad de las bandas se realizó con un programa informático Image Quant 5.2 (GE Healthcare, Estados Unidos), normalizando las proteínas analizadas con la expresión de tubulina que se utilizó como control.

3.5. Determinación de IL-6

Las células fueron cultivadas y estimuladas en placas de 96 pocillos durante 24 horas. Luego, se centrifugó la placa, se retiró el sobrenadante y se transfirió a una nueva placa. Los sobrenadantes se guardaron a -80°C . La IL-6 presente en los sobrenadantes se detectó mediante la técnica ELISA siguiendo las instrucciones del kit comercial DuoSet ELISA IL-6 (R&Dsystems, Estados Unidos). El rango de trabajo estuvo comprendido entre 9.38 y 600 pg/mL. Finalmente, se midió la absorbancia media a 450 nm en NanoQuant Infinite M200 (Tecan, Suiza).

3.6. Análisis de la capacidad de Proliferación

Las células fueron cultivadas y estimuladas en placas de 96 pocillos durante 24 horas. Para valorar la capacidad de proliferación de los macrófagos ante los diferentes estímulos se utilizó el kit comercial "BrdU Cell proliferation assay Kit" (Cell signaling technology), siguiendo las instrucciones del fabricante. La técnica se basa en la detección de la 5-bromo-2'-desoxiuridina (BrdU) incorporada en el ADN durante la proliferación celular. Las células fueron cultivadas en un medio que contiene BrdU, un análogo de pirimidina, que se incorpora en lugar de timidina en el ADN recién sintetizado de las células en proliferación. Luego de eliminar el medio marcado, las células fueron fijadas y el ADN

desnaturalizado utilizando una solución de fijación/desnaturalización. Posteriormente, se agregó un anticuerpo primario para detectar la BrdU incorporada y luego un anticuerpo secundario acoplado a HRP. A continuación, se agregó TMB obteniéndose una solución coloreada. Se midió la absorbancia de la solución; la magnitud de la absorbancia es proporcional a la cantidad de BrdU incorporado por las células y a la magnitud de la proliferación celular.

3.7. Inmunohistoquímica (IHQ)

Se analizó la expresión de la enzima CSE en cortes histológicos de tejido sinovial de pacientes artrósicos sin diagnóstico de diabetes (edad media:74,9 años;4 mujeres, 5 varones) y de pacientes artrósicos diagnosticados con diabetes (edad media:72,3 años;1 mujer, 6 varones).

Para la realización de la técnica, se colocaron los cortes histológicos en un incubador a 60°C durante 10 minutos para lograr su desparafinado inicial. Luego se aclararon y rehidrataron las muestras, realizando dos incubaciones de 5 minutos en xileno, dos incubaciones de 5 minutos en etanol 100% (v/v), dos incubaciones de 5 minutos en etanol 96% (v/v), una incubación de 3 minutos en etanol 75% (v/v) y un pasaje por agua. Posteriormente, se realizó un desenmascaramiento antigénico mediante tratamiento por calor con tampón EDTA 1X pH 9 (Dako, UK), tras lo cual se realizó un lavado de 5 minutos con PBST (PBS con 0.2% de Tween® 20). A continuación, se bloqueó la actividad de la peroxidasa endógena utilizando una solución comercial durante 10 minutos (Dako) y se realizaron 3 lavados durante 5 minutos con PBST.

Las muestras se incubaron con el anticuerpo primario a 4 °C durante toda la noche en una dilución 1:400 en PBST. El control negativo consistió en PBST sin anticuerpo primario. Pasado el tiempo de incubación, se realizaron tres lavados de 5 minutos con PBST y las muestras se incubaron durante 30 minutos con el anticuerpo secundario específico marcado con HRP del Kit EnVision de revelado (Dako). Tras lo cual, se realizaron tres

lavados de 10 minutos con PBST y las secciones se incubaron con diaminobencidina (DAB, Dako REAL™) durante 3 minutos. A continuación, las secciones se lavaron y contra tiñeron con hematoxilina durante 1 minuto. Por último, las secciones se lavaron y deshidrataron en concentraciones crecientes de etanol: etanol 75% v/v durante 15 segundos, etanol 96% v/v durante 2 minutos, etanol 100% durante 5 minutos. Finalmente, se incubaron en xileno durante 3 minutos y se montaron con DePeX.

La intensidad de la señal fue cuantificada utilizando el software ImageJ (version 1.37a). Los resultados se expresaron como % de señal positiva.

3.8. Análisis estadístico

Para llevar a cabo el análisis estadístico se utilizó la versión 8 del software GraphPad PRISM (La Jolla, USA). Las comparaciones entre condiciones de los experimentos celulares se analizaron mediante la prueba de Mann-Whitney. Las diferencias fueron consideradas significativas cuando $p \leq 0.05$.

Para el análisis de los resultados de la técnica inmunohistoquímica se empleó la prueba no paramétrica de Mann-Whitney para comparar diferentes pacientes. Se consideró significativa la diferencia con el valor $p \leq 0.05$.

4. RESULTADOS

4.1. Evaluación de la maquinaria de síntesis enzimática de H₂S en macrófagos

4.1.1. Análisis de la expresión génica de CBS, CSE y MPST

En primer lugar, se diferenció la línea celular de monocitos TPH-1 a macrófagos maduros mediante tratamiento con PMA. Los macrófagos fueron incubados bajo condiciones normales (GN) o alta de glucosa (GA), en la presencia o ausencia de LPS, y a continuación se evaluó la expresión génica de las tres enzimas más relevantes para la síntesis de H₂S. Como se puede observar en la figura 5, la expresión de las 3 enzimas encargadas de la síntesis de H₂S se redujo significativamente en condiciones de alta glucosa comparada con la expresión a una concentración normal de glucosa (*p<0.05 vs Glucosa Normal).

Al estimular los macrófagos con LPS, se observó una tendencia a la disminución de la expresión de CBS y MPST en aquellas células incubadas en condiciones de alta glucosa en comparación con el mismo estímulo en una concentración normal de glucosa. Sin embargo, en el caso de la enzima CSE esta disminución de la expresión fue más patente, alcanzando diferencias significativas entre ambos tratamientos (#p<0.05 vs glucosa normal + LPS).

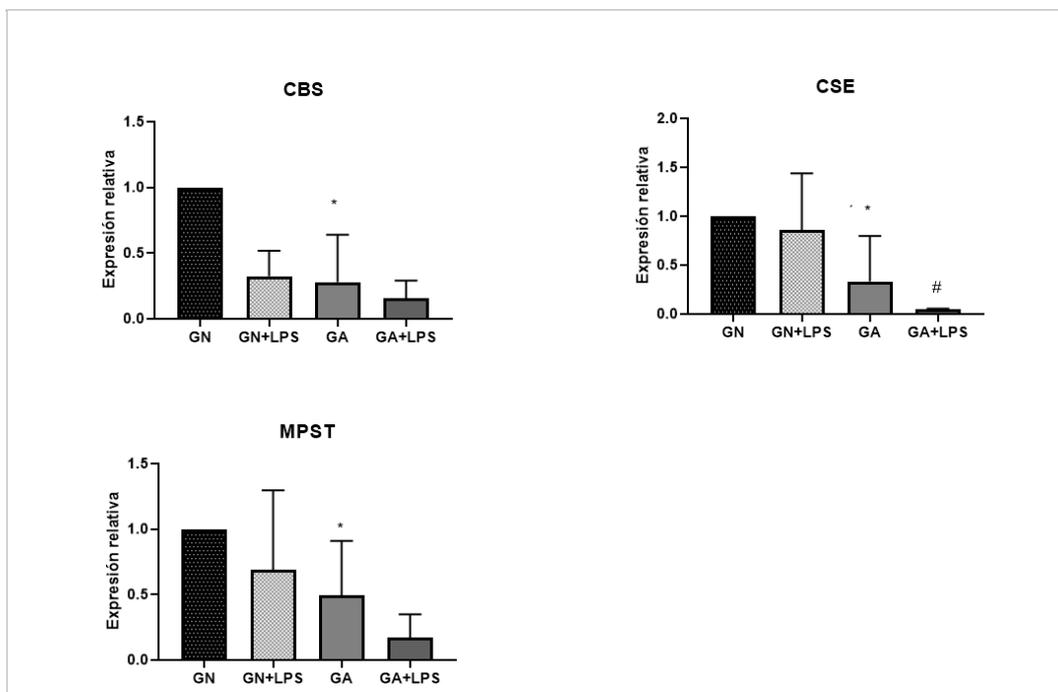


Figura 5: Expresión génica de CBS, CSE, MPST. Los macrófagos fueron estimulados durante 24 horas con LPS bajo distintas concentraciones de glucosa. Luego se determinó la expresión génica de CBS, MPST y CSE mediante qPCR. Los resultados se expresan con la media \pm SD de los 4 experimentos. Se observó una reducción significativa en la expresión de las 3 enzimas relevantes para la síntesis de H₂S (* p <0.05 vs Glucosa Normal). Se detectó además una disminución de la expresión de las 3 enzimas en las condiciones tratadas con LPS, resultando significativa para CSE en las células incubadas en una concentración de glucosa alta (# p <0.05 vs Glucosa Normal + LPS).

4.1.2. Análisis de la expresión proteica de CBS y CSE

Una vez observada la tendencia a una menor expresión de estas enzimas relevantes para la síntesis de H₂S en una concentración alta de glucosa, se procedió a confirmar los hallazgos evaluando la expresión proteica de dos de estas enzimas (CBS y CSE) mediante Western blot. Para ello, los macrófagos se estimularon con LPS durante 24 horas bajo las distintas concentraciones de glucosa (figura 6).

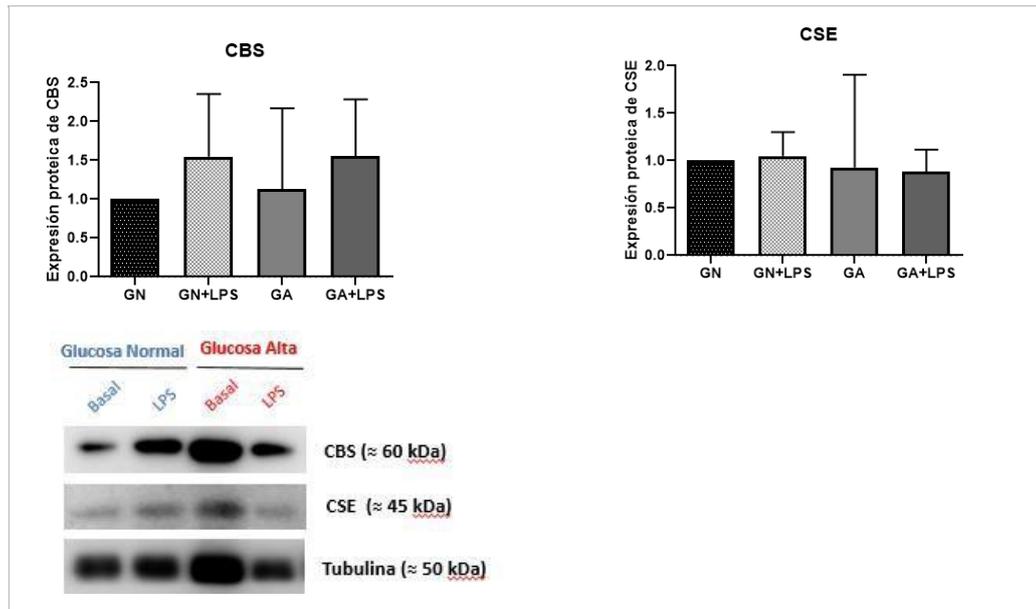


Figura 6: Expresión proteica de CBS y CSE. Los macrófagos fueron estimulados durante 24 horas con LPS bajo distintas concentraciones de glucosa. Luego se determinó la expresión proteica de CBS y CSE mediante Western blot. Los resultados se expresan con la media \pm SD de los 3 experimentos.

Aunque no resultó significativa, puede observarse una tendencia a la reducción de la expresión de CSE en los macrófagos estimulados con LPS bajo una concentración alta de glucosa. A partir de estos hallazgos, y dado el papel de H_2S en la polarización de macrófagos descrito en la literatura previa y el efecto que la glucotoxicidad ejerce sobre ella, nos propusimos estudiar si la adición de un liberador lento de H_2S , GYY-4137, podría modular el fenotipo de estas células diferentemente estimuladas.

4.2. Caracterización fenotípica de macrófagos y efecto de la adición de una fuente exógena de H_2S

4.2.1. Evaluación de la expresión génica de marcadores vinculados a los perfiles M1 y M2

En un primer lugar, y para caracterizar en detalle el fenotipo de macrófago resultante tras su estimulación con LPS bajo los distintos ambientes (concentración alta y normal de glucosa), se analizó la expresión génica de marcadores de membrana característicos de los diferentes perfiles de

macrófagos, tipo M1 y M2. Las células fueron sometidas durante 24 horas a los diferentes estímulos y luego se evaluó la expresión de genes vinculados a los distintos perfiles mediante qPCR (figuras 7 y 8).

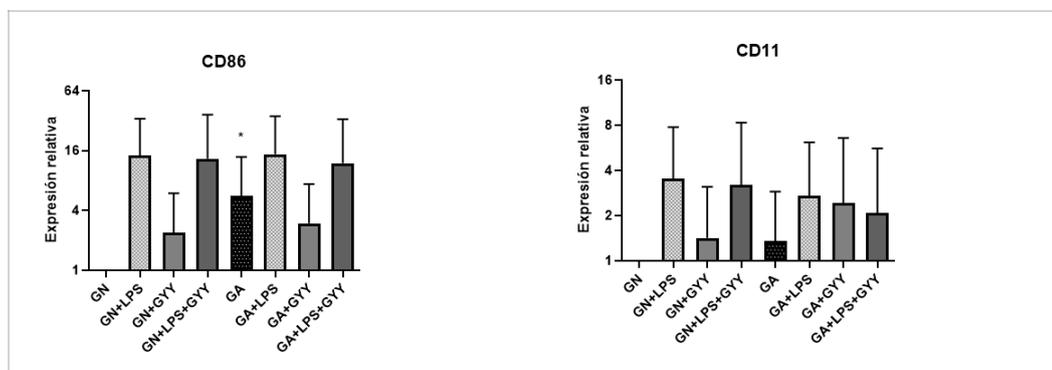


Figura 7: Niveles de expresión génica de marcadores vinculados a M1. Los macrófagos fueron estimulados durante 24 horas en presencia de LPS, GYY-4137, LPS+GYY-4137 bajo distintas concentraciones de glucosa. Luego se determinó la expresión génica de CD86 y CD11 mediante qPCR. Los resultados se expresan con la media \pm SD de los 4 experimentos. Los niveles de expresión génica de CD86 se incrementaron significativamente en condiciones de glucosa alta. (* $p < 0.05$ vs Glucosa Normal).

En relación a los niveles de expresión génica de marcadores vinculados a M1 (CD86 y CD11), se observaron diferencias significativas en los niveles basales de expresión de CD86 (* $p < 0.05$ vs Glucosa Normal) entre macrófagos bajo una concentración normal de glucosa y macrófagos en una concentración de glucosa alta. Observándose una mayor expresión de CD86 en macrófagos sometidos a una alta concentración de glucosa. Mientras que para CD11 no se observaron variaciones significativas entre los diferentes tratamientos. Aunque si detectamos que aquellas condiciones tratadas con GYY-4137 mostraban una tendencia hacia una menor expresión de ambos marcadores.

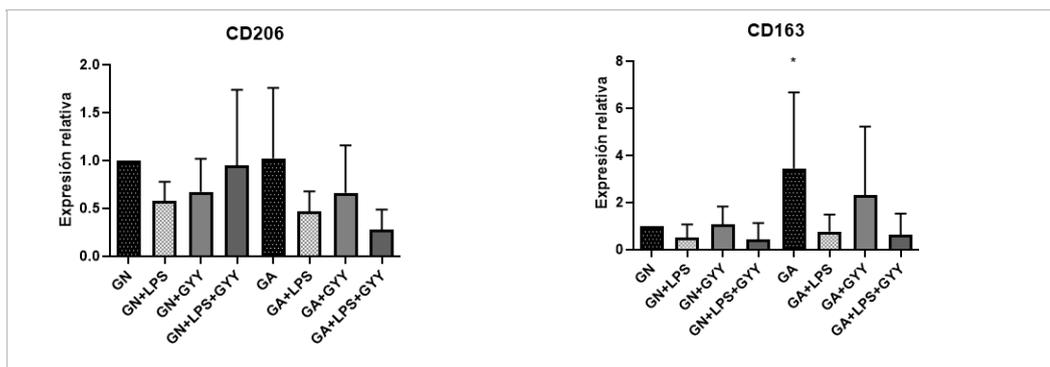


Figura 8: Niveles de expresión génica de marcadores vinculados a M2. Los macrófagos fueron estimulados durante 24 horas en presencia de LPS, GYY-4137, LPS+GYY-4137 bajo distintas concentraciones de glucosa. Luego se determinó la expresión génica de CD206 y CD163 mediante qPCR. Los resultados se expresan con la media \pm SD de los 4 experimentos. Los niveles de expresión génica de CD163 se incrementaron significativamente en condiciones de alta glucosa. (* $p < 0.05$ vs Glucosa Normal).

Por otra parte, cuando se analizaron los niveles de expresión génica de marcadores vinculados a M2 (CD206 y CD163), no se observaron variaciones significativas en la expresión de CD206 entre los distintos tratamientos. Por el contrario, se observaron diferencias significativas en los niveles basales de expresión de CD163 entre los macrófagos incubados en bajos y altos niveles de glucosa, observándose una mayor expresión a una concentración elevada de glucosa (* $p < 0.05$ vs Glucosa Normal).

4.2.2. Caracterización fenotípica de los macrófagos por citometría de flujo

Una vez analizada la expresión génica de marcadores de membrana clásicos de los perfiles de macrófagos, se procedió a confirmar los resultados analizando la expresión proteica de los marcadores CD86 y CD206, característicos de los diferentes perfiles de macrófagos, M1 y M2, respectivamente.

Con este fin, las células se cultivaron durante 24 horas con los diferentes estímulos y luego se evaluaron por citometría de flujo las proteínas presentes en la membrana celular. Para esto se utilizaron anticuerpos

contra CD86, marcador característico del perfil M1, y CD206, marcador característico del perfil M2, marcados con fluorocromos (figura 9). Como en anteriores experimentos, los estímulos aplicados a los macrófagos fueron LPS en la presencia o no de GYY-4137, incubados en medio de cultivo con las diferentes concentraciones de glucosa (Glucosa Alta, Glucosa Normal).

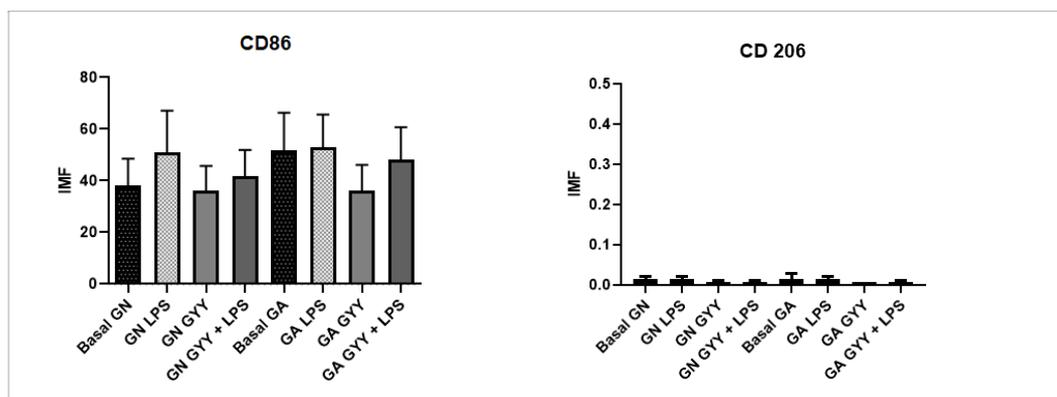


Figura 9: Efecto de los diferentes estímulos sobre la expresión de proteínas de membrana. Los macrófagos fueron estimulados durante 24 horas con LPS, GYY-4137 o LPS combinado con GYY-4137 en distintas concentraciones de glucosa. Luego se evaluaron los niveles de expresión de marcadores M1 y M2 mediante citometría de flujo. Los resultados se expresaron como intensidad media de fluorescencia (IMF).

Como se puede observar en la figura 9, no se detectó un aumento significativo de la expresión basal de CD86 en membrana en macrófagos en condiciones de alta glucosa comparándolos con aquellos en condiciones normales de glucosa. Sin embargo, si se observó una tendencia a una disminución de la expresión de CD86 en membrana en aquellos macrófagos en condiciones de alta glucosa tratados con GYY-4137. Además, y como se puede observar en la figura 9, se detectó una mínima expresión de CD206 a nivel de membrana.

4.2.3. Evaluación de la proliferación celular

Finalmente, para caracterizar el fenotipo celular se evaluó la capacidad de proliferación de los macrófagos sometidos a los diferentes estímulos y concentraciones de glucosa (figura 10).

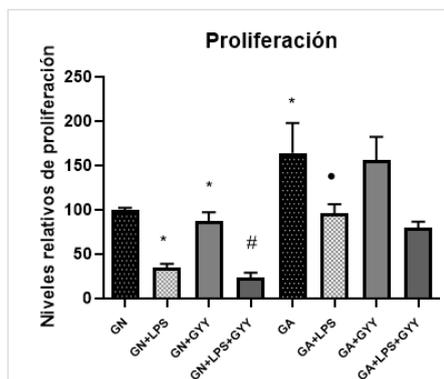


Figura 10: Evaluación de la proliferación celular. Efecto de los diferentes estímulos en la proliferación celular. Los macrófagos fueron estimulados durante 24 horas con LPS, GYY-4137 o LPS combinado con GYY-4137 bajo distintas concentraciones de glucosa. Luego se evaluaron los niveles de proliferación relativa mediante el kit de BrdU Cell proliferation assay (Cell signaling technology). Los resultados se encuentran expresados como la media \pm SD de 4 experimentos. Los niveles de proliferación fueron modulados por los diferentes estímulos. (* $p < 0.05$ vs Glucosa Normal, # $p < 0.05$ vs Glucosa Normal+LPS, • $p < 0.05$ vs Glucosa Alta).

Al estudiar el efecto de los diferentes tratamientos se observó un incremento significativo en la proliferación basal de aquellos macrófagos expuestos a una alta concentración de glucosa comparado a condiciones normales (* $p < 0.05$ vs Glucosa Normal). También se detectó una disminución en la proliferación al estimular las células con LPS tanto en concentración normal como de alta glucosa comparado con su respectivo basal (* $p < 0.05$ vs Glucosa Normal, • $p < 0.05$ vs Glucosa Alta). A destacar, el co-tratamiento de los macrófagos con GYY-4137 claramente redujo la proliferación celular tanto en condiciones basales (* $p < 0.05$ vs Glucosa Normal) como en aquellas células estimuladas con LPS (# $p < 0.05$ vs Glucosa Normal +LPS), e igualmente bajo condiciones altas como normales de glucosa, aunque alcanzando solamente la significación para este último.

4.3. Respuesta inflamatoria en macrófagos

4.3.1 Niveles relativos de expresión génica de los mediadores pro-inflamatorios IL-6, IL-8 e iNOS

A continuación, se procedió a evaluar el perfil inflamatorio de los macrófagos bajo los diferentes estímulos y condiciones estudiadas. Para ellos las células fueron de nuevo tratadas durante 24 horas con el estímulo pro-inflamatorio LPS en presencia o ausencia de GYY-4137 en condiciones de baja o alta concentración de glucosa.

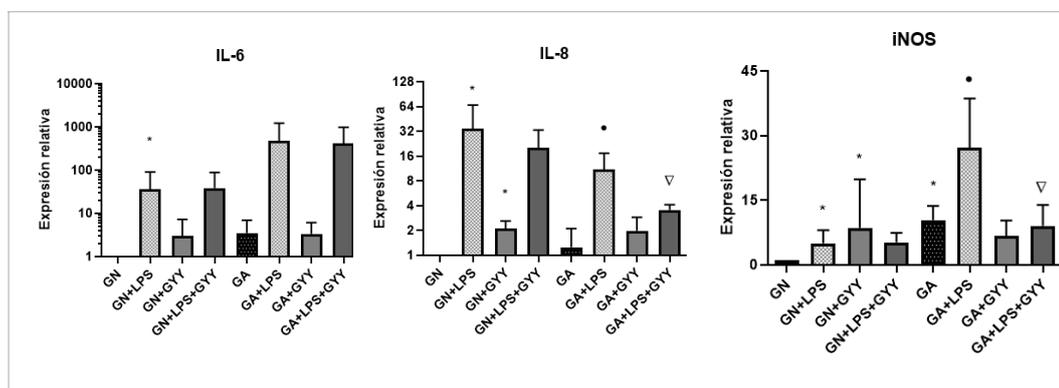


Figura 11: Análisis de la expresión génica de mediadores pro-inflamatorios. Los macrófagos fueron estimulados durante 24 horas en presencia de LPS, GYY-4137, LPS+GYY-4137 a distintas concentraciones de glucosa. Luego se determinó la expresión génica de IL-6, IL-8 e iNOS mediante qPCR. Los resultados se expresan con la media \pm SD de los 4 experimentos. Los niveles de proliferación fueron modulados por los diferentes estímulos (* $p < 0.05$ vs Glucosa Normal, • $p < 0.05$ vs Glucosa Alta, $\nabla p < 0.05$ vs Glucosa Alta +LPS)

Los resultados obtenidos, representados en la figura 11 muestran que las células estimuladas con LPS incrementan su capacidad pro-inflamatoria. LPS incrementó claramente la expresión de IL-6, siendo este aumento exacerbado bajo condiciones altas de glucosa. Sin embargo, aunque no significativamente, el co-tratamiento con GYY-4137 atenuó los niveles de expresión génicos de esta citoquina. En relación a IL-8, observamos resultados similares a los detectados con IL-6, aunque en este caso las mayores modulaciones se detectaron en los macrófagos estimulados con LPS bajo condiciones normales de glucosa. Además, una vez más,

detectamos que GYY-4137 redujo la expresión inducida por LPS para este mediador pro-inflamatorio.

Finalmente, con respecto a la expresión de iNOS, se observó que la incubación de los macrófagos con altos niveles de glucosa incrementó de manera significativa los niveles basales de expresión de la enzima (* $p < 0.05$ vs Glucosa Normal). Como era de esperar, la estimulación con LPS también incrementó de manera significativa la expresión de iNOS, tanto bajo una concentración normal de glucosa como en condiciones de alta glucosa (* $p < 0.05$ vs Glucosa Normal, • $p < 0.05$ vs Glucosa Alta). Por otro lado, la expresión de iNOS en aquellas células estimuladas con LPS en la presencia de GYY-4137 disminuyó, aunque solamente de manera significativa en condiciones incubadas con altos niveles de glucosa ($\nabla p < 0.05$ vs Glucosa Alta+LPS). La síntesis de NO está mediada principalmente por la regulación en la expresión de iNOS; esta enzima es responsable de la producción de NO a partir de L-arginina. La enzima arginasa 1, con elevada expresión en macrófagos M2, compite con iNOS por el sustrato L-arginina reduciendo su disponibilidad y como consecuencia, la producción de NO (28,36). Curiosamente, la expresión de arginasa 1 fue indetectable en nuestros estudios (resultados no mostrados).

4.3.2 Niveles de IL-6 liberados al medio extracelular

Para confirmar los resultados obtenidos a nivel de expresión génica, se evaluaron los niveles de IL-6 liberados al medio extracelular mediante ELISA como se muestra en la figura 12. Como era de esperar, LPS incrementó la secreción de IL-6 de manera significativa en aquellas células incubadas en altos niveles de glucosa (• $p < 0.05$ vs Glucosa Alta). Además, los macrófagos co-tratados con GYY-4137 atenuaron este efecto, mostrando una reducción significativa de la liberación de IL-6 inducida por LPS bajo estas condiciones ($\bar{p} < 0.05$ vs Glucosa Alta +LPS).

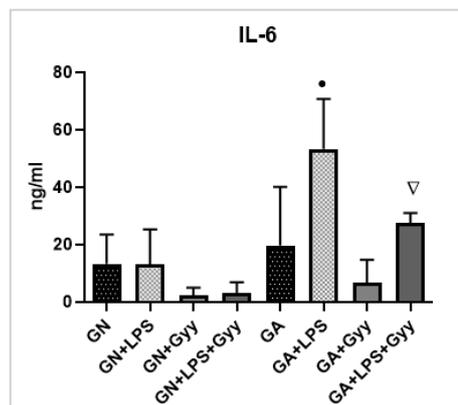


Figura 12: Análisis de los niveles de IL-6 secretados al medio de cultivo. Los macrófagos se estimularon durante 24 horas en presencia de LPS, GYY, LPS+GYY-4137 bajo las distintas concentraciones de glucosa. A continuación, se determinó la liberación de IL-6 mediante la técnica ELISA. Los resultados se expresan con la media \pm SD de un total de 4 experimentos realizados. La estimulación de los macrófagos con LPS en un medio con niveles altos de glucosa incrementó significativamente la producción de IL-6 (• p <0.05 vs Glucosa Alta). Por otro lado, el co-tratamiento con GYY-4137 disminuyó significativamente la producción de IL-6 (▽ p <0.05 vs Glucosa Alta +LPS).

4.4. Evaluación del sistema anti-oxidante Nrf-2/HO-1

4.4.1 Efecto en la expresión proteica de Nrf-2

Se ha descrito que una de las vías mediante las cuales H_2S ejerce sus efectos beneficiosos es a través de activar la vía anti-oxidante Nrf-2/HO-1. Nrf-2 es un factor de transcripción que juega un papel importante en la respuesta contra la inflamación y el estrés oxidativo, aumentando la expresión de proteínas anti-oxidantes, como HO-1, que protegen contra el daño oxidativo provocado por lesiones e inflamación. Por este motivo, se investigó en primer lugar la expresión proteica de este factor bajo las diferentes condiciones experimentales.

Como se observa en la figura 14, el tratamiento con GYY-4137 incrementó la expresión proteica de Nrf-2 en aquellos macrófagos incubados con altas niveles de glucosa, tanto en presencia como ausencia de LPS. No obstante, no se alcanzaron diferencias significativas.

4.4.2. Efecto en la expresión génica de HO-1

A continuación, analizamos la expresión génica de la enzima HO-1, diana transcripcional de Nrf-2, la cual juega un papel importante en la respuesta contra la inflamación y el estrés oxidativo en la articulación (figura 13). Para ello, los macrófagos fueron estimulados como ya se describió en resultados anteriores. Como se puede observar en la figura 13, la expresión génica de HO-1 disminuyó significativamente en presencia de una elevada concentración de glucosa (* $p < 0.05$ vs Glucosa Normal).

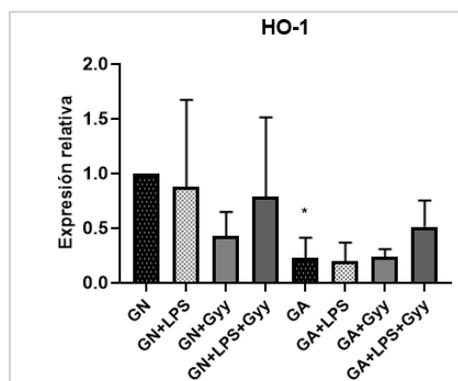


Figura 13: Análisis de la expresión génica de HO-1. Los macrófagos fueron estimulados durante 24 horas con LPS bajo distintas concentraciones de glucosa. Luego se determinó la expresión génica de HO-1 mediante qPCR. Los resultados se expresan con la media \pm SD de los 4 experimentos. La expresión génica de HO-1 disminuyó significativamente (* $p < 0.05$ vs Glucosa Normal).

4.4.3. Efecto en la expresión proteica de HO-1

Para confirmar los resultados previos, se investigó la expresión proteica de la enzima HO-1. Por lo que se estudió su expresión frente a los diferentes estímulos y concentraciones de glucosa. En la figura 14 puede observarse una mayor expresión de HO-1 en aquellas células tratadas con LPS+GYY-4137, aunque no se obtuvo la significación estadística debida a la alta variabilidad entre datos.

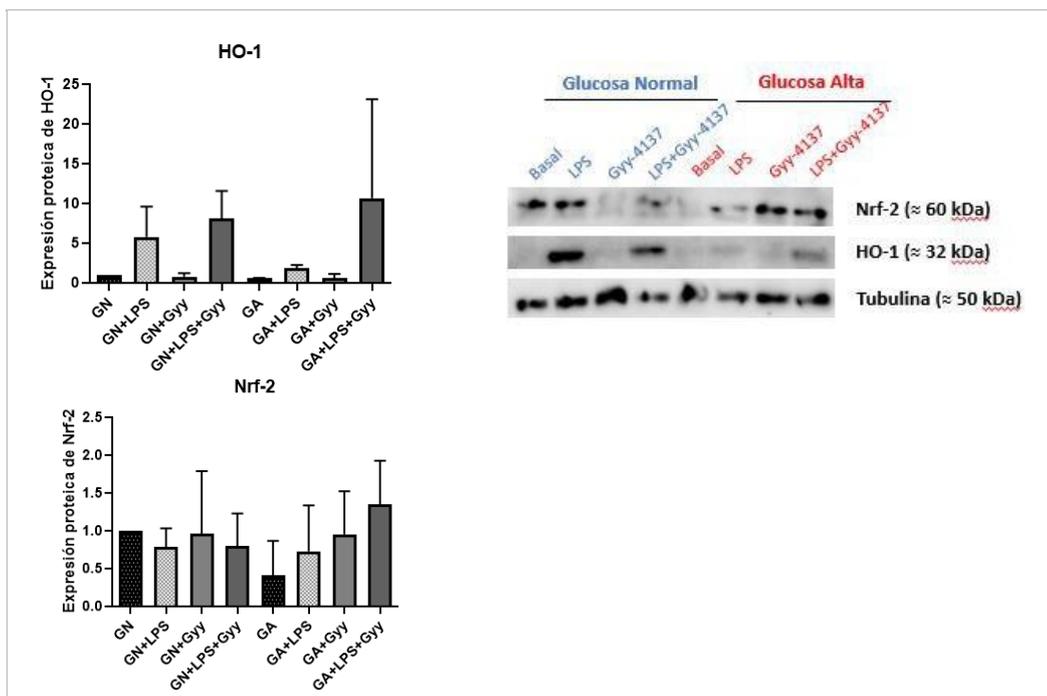


Figura 14: Análisis de la expresión proteica de HO-1/Nrf-2. Los macrófagos fueron estimulados durante 24 horas con LPS, GYY-4137 o LPS combinado con GYY-4137 bajo distintas concentraciones de glucosa. Luego se determinó la expresión proteica de HO-1 y de Nrf-2 mediante la técnica Western blot. Se observa una mayor expresión de HO-1 en aquellas células tratadas con LPS+GYY-4137. El tratamiento con GYY-4137 incrementó la expresión proteica de Nrf-2 en aquellos macrófagos incubados con altas niveles de glucosa, tanto en presencia como ausencia de LPS. Los resultados se expresan con la media \pm SD de 3 experimentos realizados.

4.5. Expresión de CSE en la membrana sinovial en pacientes OA y OA diabéticos.

Con la finalidad de conocer si existían diferencias en la expresión de la enzima sintetizadora de H_2S , CSE en los tejidos de pacientes, se realizó la técnica inmunohistoquímica en muestras sinoviales procedentes de pacientes OA y pacientes OA diabéticos (figura 15).

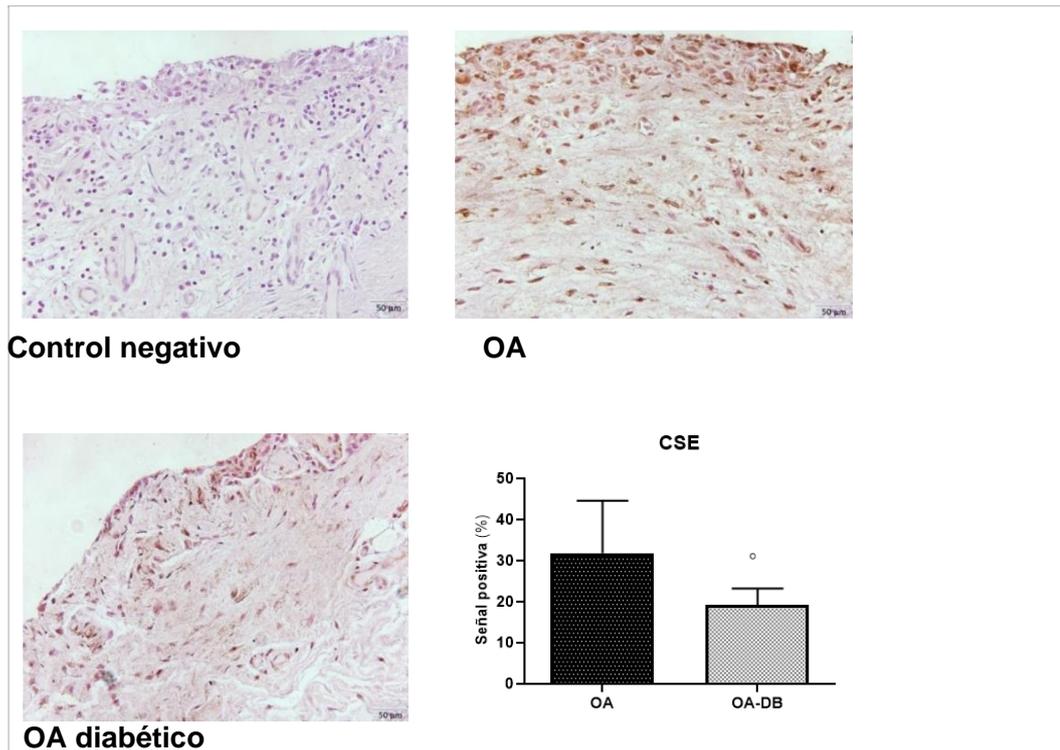


Figura 15: Análisis de la expresión de CSE en muestras humanas de tejido sinovial.

Se muestran imágenes representativas inmunohistoquímicas para CSE realizadas en biopsias de membrana sinovial de pacientes OA (n=9) y OA diabético (OA-DB (n=7), además de un control negativo de técnica (muestra incubado sin anticuerpo). Con color marrón se muestra la señal positiva para la expresión de CSE (magnificación de 20x). La gráfica muestra el porcentaje de células positivas para CSE.

Tras el análisis de la expresión de CSE en los tejidos de los pacientes, se detectó una reducción significativa en el grupo OA diabético con respecto al del grupo OA sin antecedentes de diabetes ($p < 0.05$).

5. DISCUSIÓN

La OA es la patología más frecuente que afecta a las articulaciones. Esta enfermedad no tiene cura, y los tratamientos actuales son insuficientes para prevenir su desarrollo, centrándose principalmente en el tratamiento del dolor. Asimismo, un número creciente de evidencias indica que la inflamación contribuye al desarrollo de la OA y que el sistema inmune juega un papel importante en esta patología (16). En ese sentido, los macrófagos desempeñan diversos papeles en la inflamación y reparación de tejidos (23), habiéndose identificado dos estados de polarización de estas células cuando se enfrentan a diferentes estímulos. En la fase inflamatoria, los macrófagos tipo M1, activados clásicamente, producen altos niveles de citoquinas y quimiocinas pro-inflamatorias. Por otro lado, los macrófagos M2, activados alternativamente, son necesarios para la resolución de la inflamación (37). En este aspecto, comprender los cambios fenotípicos de la polarización de los macrófagos y la función de cada subtipo es de gran valor por su posible implicación clínica. Estudios recientes proporcionaron evidencia convincente de que la señalización mediante H₂S está implicada en el dictado de polarizaciones de macrófagos. Por lo que el H₂S se presenta ahora como una potencial diana terapéutica al intervenir en las vías de señalización de los macrófagos.

En trabajos previos en el grupo se detectó que la síntesis de este gas es defectuosa en pacientes artrósicos y especialmente en su fenotipo metabólico (32,34). Asimismo, también observaron mediante diferentes modelos *in vivo* e *in vitro* que la inducción de la síntesis de este gas presenta efectos protectores frente a distintos procesos patológicos teniendo lugar en la articulación (34,38) Para profundizar en estos hallazgos, y determinar si H₂S también juega un papel clave en la inflamación mediada por macrófagos en la artrosis metabólica, en este trabajo detectamos que un estrés por altos niveles de glucosa (simulando

un fenotipo metabólico) puede favorecer la polarización de macrófagos hacia el tipo M1, mientras que la administración de una fuente exógena de H₂S atenúa estos efectos.

En mamíferos, la biosíntesis de H₂S se produce principalmente a través de la actividad catabólica de las enzimas: CBS, CSE y MPST (24,39). Perturbaciones en la biosíntesis de H₂S se encuentran ligadas a procesos patológicos. Principalmente, la disminución de la producción de H₂S se vincula con una actividad reducida o una menor expresión de CSE, CBS, MPST o de una combinación de ellas (32). En este estudio, al incubar macrófagos en condiciones de glucosa alta comprobamos que presentaban una disminución significativa de la expresión de las 3 enzimas relevantes para la síntesis de H₂S, en línea con los resultados obtenidos por otros estudios (34). Asimismo, la activación de los macrófagos con LPS en estas condiciones indujo también una disminución de la expresión de las 3 enzimas, siendo esta reducción estadísticamente significativa para CSE.

El deterioro local de la biosíntesis de H₂S se considera un evento clave en la patogénesis de las complicaciones relacionadas con la diabetes(34). Por ejemplo, en otros estudios se ha descrito que la expresión reducida de CSE y/o CBS favorece el desarrollo/progresión de la cardiopatía diabética(40). Así mismo, en nuestro trabajo, al comparar la expresión de CSE en tejidos sinoviales de pacientes OA y pacientes OA DB, se obtuvo como resultado una menor expresión en OA DB. Estos resultados estarían sugiriendo que los mecanismos de defensa anti-oxidante y anti-inflamatorios del organismo podrían encontrarse defectuosos en los pacientes diabéticos.

En la inflamación, los macrófagos activados liberan un gran número de mediadores inflamatorios como NO, PGE₂, TNF- α , e IL-6, así como también enzimas reguladoras (iNOS y COX-2)(41–43). Nuestros resultados muestran que aquellos macrófagos activados con LPS en presencia de una concentración alta de glucosa exhiben un mayor perfil de

tipo pro-inflamatorio. Este hecho se observó a través de una mayor expresión génica de CD86 (característico del perfil M1) y un incremento de la expresión de iNOS (enzima responsable de la producción de NO a partir de L-arginina), y concretamente de su expresión inducible, la cual se encuentra asociada frecuentemente a procesos inflamatorios (37,44). Así mismo, se incrementó la expresión de IL-6, citoquina con función pro-inflamatoria.

Por otro lado, ante el mismo estímulo se incrementó la expresión de CD163, (marcador de M2). Si bien se han descrito diferentes fenotipos que no se ajustan a categorías simples de macrófagos pro o anti-inflamatorios, sino que existen fenotipos intermedios entre M1 y M2; el aumento de la expresión de CD163 puede deberse a una respuesta a un ambiente inflamatorio. Se ha descrito en la literatura que CD163, un receptor recolector (scavenger) específico de monocitos y macrófagos (especialmente macrófagos M2)(45), está sujeto a un proceso de clivaje de la superficie celular durante la activación celular generándose la forma soluble de CD163 (sCD163) (46,47), su clivaje estaría asociado al control de la activación celular disminuyendo la inflamación. Numerosos estímulos inducen el clivaje de CD163, tales como la activación mediada por receptores tipo toll (TLR), receptores Fcγ o mediadores de estrés oxidativo (46,47). Además, la forma soluble de CD163 (sCD163) fue identificada recientemente como un marcador de riesgo de desarrollar DB tipo 2 y en macrófagos se asoció fuertemente con la resistencia a la insulina y con variables del síndrome metabólico.(48,49)

A partir de estos resultados, y dado el papel de H₂S en la polarización de macrófagos, se estudió el efecto de la adición de un liberador lento de H₂S, GYY-4137 sobre el fenotipo de los macrófagos ante los distintos estímulos. En este sentido, los resultados muestran que al introducir un liberador lento de H₂S (GYY-4137), se produjo una disminución significativa de la expresión de CD86 (marcador M1) de membrana en aquellos macrófagos

en condiciones de glucosa alta. Además, el co-tratamiento con GYY-4137 atenuó tanto los niveles de expresión génicos de IL-6, IL-8 como los niveles de IL-6 liberados al medio extracelular.

De manera consistente, bajo este tratamiento también disminuyó la expresión de iNOS de manera significativa en aquellas células estimuladas con LPS e incubadas con altos niveles de glucosa ($\nabla p < 0.05$ vs Alta Glucosa+LPS). La síntesis de NO está mediada principalmente por la regulación en la expresión de iNOS; esta enzima es responsable de la producción de NO a partir de L-arginina (50). La síntesis de NO y de especies reactivas de nitrógeno en macrófagos M1 resulta indispensable para la actividad antimicrobiana y la secreción de citoquinas inflamatorias tales como IL-6, TNF- α e interferones (37,44). En cuanto a los macrófagos M2, estos expresan niveles elevados de arginasa 1, enzima que compite con iNOS por el sustrato L-arginina reduciendo su disponibilidad y como consecuencia, la producción de NO (28,36). Sin embargo, no se obtuvo expresión de arginasa 1 en nuestro trabajo.

Al estudiar la proliferación celular, se observó un incremento significativo en la proliferación basal de aquellos macrófagos sometidos a una alta concentración de glucosa. Este aumento en la proliferación podría estar indicando una mayor activación de los macrófagos a altas concentraciones de glucosa. En cambio, el estímulo con LPS disminuyó la proliferación de estas células, como otros autores ya habían observado anteriormente (51). En macrófagos, el H₂S envía una señal de tipo anti-inflamatoria generando un impacto sobre su activación y polarización a través de diferentes mecanismos (52), esto explicaría que en este trabajo al administrar de manera exógena de H₂S mediante el tratamiento con GYY-4137 se observara una disminución en la proliferación, en relación a los niveles basales y en comparación con aquellas células tratadas con LPS (53,54).

En su conjunto, estos hallazgos podrían indicar que el tratamiento de macrófagos con una fuente exógena de H₂S favorece un cambio en su fenotipo hacia un perfil menos inflamatorio.

Se ha descrito que una de las vías mediante las cuales H₂S ejerce sus efectos beneficiosos es a través de activar la vía anti-oxidante Nrf-2/HO-1, la cual desempeña un papel en la eliminación de los factores de estrés ambientales y endógenos del cuerpo(55) pero también en la respuesta a la inflamación y el estrés oxidativo en la articulación (56). Así mismo, se ha señalado que H₂S no es solo inductor de esta vía de señalización, sino además un objetivo de la actividad transcripcional de Nrf-2 (34).

Nrf-2 es un sensor de estrés oxidativo y factor de transcripción clave que protege las células de sustancias extrañas y daño oxidativo. Bajo condiciones fisiológicas, Nrf-2 está presente principalmente en el citoplasma; sin embargo, cuando el nivel de ROS es elevado, la transcripción de proteínas anti-oxidantes, incluyendo HO-1, es potenciada por Nrf-2 (57,58). El incremento de la expresión de HO-1 es importante para la protección celular en condiciones de estrés oxidativo e inflamación. En un estudio reciente se observó que la expresión de proteínas anti-oxidantes aumenta después de la activación de la vía Nrf2 / HO-1, que a su vez reduce la inflamación y el estrés oxidativo en estudios *in vitro* empleando macrófagos (59).

No obstante, los resultados de este estudio mostraron que la expresión génica de HO-1 y de Nrf-2 disminuyó significativamente en presencia de una elevada concentración de glucosa. Estos resultados se corresponden con trabajos previos en los que se observó una disminución de los niveles de expresión de Nrf-2 y HO-1 en cartílago de pacientes OA DB (60) sumada a una menor actividad promotora y una disminución de los niveles de HO-1 a niveles altos de glucosa (61). El eje Nrf-2/HO-1 sería disfuncional en condrocitos de pacientes OA DB, esto explicaría una mayor respuesta inflamatoria en estos pacientes (60). De este modo, el deterioro de la vía

Nrf-2 / HO-1 bajo condiciones de estrés por glucosa observado en nuestro trabajo, podría favorecer la activación de respuestas catabólicas en macrófagos.

La disminución de la expresión de Nrf-2 en condiciones de glucosa alta se revirtió con el tratamiento con GYY-4137, al igual que otros autores habían observado anteriormente en condrocitos artrósicos (34). Estudios previos muestran que el pretratamiento con GYY de macrófagos de ratón estimulados con LPS reduce la secreción de mediadores pro-inflamatorios (62). Además, en sinoviocitos humanos y en condrocitos articulares, GYY-4137 provocó una disminución de la producción de NO₂, PGE₂, TNF- α , e IL-6 (63) así como también en condrocitos humanos aislados de tejidos artrósicos (24,64).

En su conjunto, los hallazgos obtenidos en este trabajo sugieren que el estrés por altos niveles de glucosa favorece la polarización de macrófagos *in vitro* hacia el tipo M1 (pro-inflamatorio) que se evidencia por una mayor expresión de CD86, iNOS y de citoquinas pro-inflamatorias como IL-6. El co-tratamiento con GYY-4137, un donador de H₂S de liberación lenta, provoca una disminución significativa de la expresión de estos marcadores, dando como resultado un fenotipo menos inflamatorio.

Por último, mencionar que el estudio tiene algunas limitaciones, como el número de experimentos realizados *in vitro* y el tamaño de muestra de biopsias de pacientes, los cuales indudablemente han influido sobre el poder estadístico de los análisis realizados. Por otra parte, la cantidad de marcadores evaluados para definir el perfil de los macrófagos a de ampliarse en futuros experimentos para así extraer conclusiones más robustas. Finalmente, los ensayos se han realizado en una línea celular en lugar de un cultivo de macrófagos primarios, lo cual aportaría un contexto más cercano a lo que ocurre *in vivo*.

6. CONCLUSIONES

Teniendo en cuenta los objetivos inicialmente propuestos para este estudio, podemos concluir que:

- Los macrófagos expuestos a una concentración de glucosa alta *in vitro* presentan una disminución de la expresión de las 3 enzimas relevantes para la síntesis de H₂S.
- Los macrófagos activados con LPS en presencia de una concentración alta de glucosa exhiben un mayor perfil de tipo pro-inflamatorio, caracterizado por el incremento en la expresión génica de CD86 (característico del perfil M1), iNOS (enzima responsable de la producción de NO a partir de L-arginina) e IL-6 (citoquina con función pro-inflamatoria).
- La expresión génica de HO-1 y de Nrf-2 disminuye significativamente en presencia de una elevada concentración de glucosa mostrando un posible deterioro de la vía Nrf-2/HO-1. La adición de una fuente de H₂S exógena revierte la expresión de Nrf-2.
- Los resultados obtenidos al comparar biopsias de pacientes OA vs OA DB, muestran una disminución de la síntesis de CSE, enzima relevante para la síntesis de H₂S, en sinoviales de OA DB; evidenciando un posible deterioro en la biosíntesis local de H₂S en estos pacientes.

Por lo tanto, nuestros resultados sugieren que existe una desregulación de la síntesis de H₂S en el tejido sinovial de pacientes OA con diabetes, la cual parece estar asociada a la exposición de los macrófagos tisulares a altos niveles de glucosa. La administración de H₂S a través de donadores de este gas, como es GYY-4137, podría resultar de utilidad para regular las respuestas catabólicas en la articulación a través de atenuar la polarización de macrófagos hacia un perfil más pro-inflamatorio. Este efecto podría ser mediado, al menos parcialmente, mediante la activación del sistema Nrf-

2/HO-1, abriendo así nuevas vías a explorar en el tratamiento de la OA en pacientes diabéticos.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Reumatología SE de. Artrosis, Fisiopatología, diagnóstico y tratamiento. Ed. Médica Panamericana; 2010. 580 p.
2. Quintero M, Mitrovic DR, Monfort J. Osteoartrosis: Biología, fisiopatología, clínica y tratamiento. Ed. Médica Panamericana; 2009. 444 p.
3. Ea HK, Bazille C, Lioté F. Histología y fisiología de la membrana sinovial. EMC - Apar Locomot. 1 de enero de 2008;41(4):1-6.
4. Smith MD. The normal synovium. Open Rheumatol J. 2011;5:100-6.
5. Athanasou NA. Synovial macrophages. Ann Rheum Dis. mayo de 1995;54(5):392-4.
6. Jay GD, Britt DE, Cha CJ. Lubricin is a product of megakaryocyte stimulating factor gene expression by human synovial fibroblasts. J Rheumatol. marzo de 2000;27(3):594-600.
7. Loeser RF. Aging and Osteoarthritis: The Role of Chondrocyte Senescence and Aging Changes in the Cartilage Matrix. Osteoarthr Cartil OARS Osteoarthr Res Soc. agosto de 2009;17(8):971-9.
8. Vaamonde-García C, Riveiro-Naveira RR, Valcárcel-Ares MN, Hermida-Carballo L, Blanco FJ, López-Armada MJ. Mitochondrial dysfunction increases inflammatory responsiveness to cytokines in normal human chondrocytes. Arthritis Rheum. 2012;64(9):2927-36.
9. SOCIEDAD ESPAÑOLA DE REUMATOLOGÍA. Manual SER de enfermedades reumáticas. 6ª EDICIÓN. Elsevier; 2014.
10. Blanco FJ., Silva-Díaz M, Quevedo Vila V, Seoane-Mato D, Fernando Pérez Ruiz, Juan-Mas A, et al. Prevalencia de artrosis sintomática en España: Estudio EPISER2016. Reum Clin. 2020;17(8):461-70.
11. Blanco FJ. La artrosis y la aterosclerosis de la articulación. Reumatol Clínica. 1 de septiembre de 2018;14(5):251-3.
12. Wainstein E G. Patogénesis de la artrosis. Rev Médica Clínica Las Condes. 1 de septiembre de 2014;25(5):723-7.
13. Louati K., Vidal C, Vidal F., Sellam J. Association between diabetes mellitus and osteoarthritis: systematic literature review and meta-analysis. RMD Open. 2015;1(e000077 3).

14. Schett G., Kleyer A., Perricone C., Sahinbegovic E., Iagnocco A., Zwerina J., et al. Diabetes Is an Independent Predictor for Severe Osteoarthritis: Results from a longitudinal cohort study. *Diabetes Care*. 2013;36(2):403-9.
15. Berenbaum F. Diabetes-induced osteoarthritis: from a new paradigm to a new phenotype. *Ann Rheum Dis*. 2011;
16. Shen J, Abu-Amer Y, O'Keefe RJ, McAlinden A. Inflammation and epigenetic regulation in osteoarthritis. *Connect Tissue Res*. enero de 2017;58(1):49-63.
17. Lopes EBP, Filiberti A, Husain SA, Humphrey MB. Immune Contributions to Osteoarthritis. *Curr Osteoporos Rep*. diciembre de 2017;15(6):593-600.
18. Mathiessen A, Conaghan PG. Synovitis in osteoarthritis: current understanding with therapeutic implications. *Arthritis Res Ther*. 2 de febrero de 2017;19(1):18.
19. Matsuo Y, Saito T, Yamamoto A, Kohsaka H. Origins of fibroblasts in rheumatoid synovial tissues: Implications from organ fibrotic models. *Mod Rheumatol*. 2018;
20. Wojdasiewicz P, Poniatowski ŁA, Szukiewicz D. The Role of Inflammatory and Anti-Inflammatory Cytokines in the Pathogenesis of Osteoarthritis. *Mediators Inflamm*. 30 de abril de 2014;2014:e561459.
21. Regulation of inflammation by the antioxidant haem oxygenase 1 | *Nature Reviews Immunology* [Internet]. [citado 9 de enero de 2023]. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/s41577-020-00491-x>
22. Zhang H, Lin C, Zeng C, Wang Z, Wang H, Lu J, et al. Synovial macrophage M1 polarisation exacerbates experimental osteoarthritis partially through R-spondin-2. *Ann Rheum Dis*. octubre de 2018;77(10):1524-34.
23. Fernandes TL, Gomoll AH, Lattermann C, Hernandez AJ, Bueno DF, Amano MT. Macrophage: A Potential Target on Cartilage Regeneration. *Front Immunol*. 2020;11:111.
24. Fox B, Schantz JT, Haigh R, Wood ME, Moore PK, Viner N, et al. Inducible hydrogen sulfide synthesis in chondrocytes and mesenchymal progenitor cells: is H₂S a novel cytoprotective mediator in the inflamed joint? *J Cell Mol Med*. abril de 2012;16(4):896-910.
25. Wallace JL, Wang R. Hydrogen sulfide-based therapeutics: exploiting a unique but ubiquitous gasotransmitter. *Nat Rev Drug Discov*. mayo de 2015;14(5):329-45.
26. Martelli A., Testai L., Breschi MC., Blandizzi C., Viridis A., Taddei S., et al. Hydrogen Sulphide: Novel Opportunity for Drug Discovery. *Wiley Online Libr* [Internet]. 2010; Disponible en: wileyonlinelibrary.com
27. Lin Z, Altaf N, Li C, Chen M, Pan L, Wang D, et al. Hydrogen sulfide attenuates oxidative stress-induced NLRP3 inflammasome activation via S-sulfhydrating c-Jun at Cys269 in

macrophages. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* septiembre de 2018;1864(9 Pt B):2890-900.

28. Sun F, Luo J, Yue T, Wang F, Yang C, Zhang S, et al. The role of hydrogen sulphide signalling in macrophage activation. *Immunology.* enero de 2021;162(1):3-10.
29. Rahman MdA, Glasgow JN, Nadeem S, Reddy VP, Sevalkar RR, Lancaster JR, et al. The Role of Host-Generated H₂S in Microbial Pathogenesis: New Perspectives on Tuberculosis. *Front Cell Infect Microbiol* [Internet]. 2020 [citado 27 de julio de 2022];10. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcimb.2020.586923>
30. Wang XL, Pan LL, Long F, Wu WJ, Yan D, Xu P, et al. Endogenous Hydrogen Sulfide Ameliorates NOX4 Induced Oxidative Stress in LPS-Stimulated Macrophages and Mice. *Cell Physiol Biochem Int J Exp Cell Physiol Biochem Pharmacol.* 2018;47(2):458-74.
31. Muniraj N, Stamp LK, Badiei A, Hegde A, Cameron V, Bhatia M. Hydrogen sulfide acts as a pro-inflammatory mediator in rheumatic disease. *Int J Rheum Dis.* febrero de 2017;20(2):182-9.
32. Burguera EF, Vela-Anero Á, Gato-Calvo L, Vaamonde-García C, Meijide-Faílde R, Blanco FJ. Hydrogen sulfide biosynthesis is impaired in the osteoarthritic joint. *Int J Biometeorol.* junio de 2020;64(6):997-1010.
33. Vela-Anero Á, Gato L, Ruiz-Romero C, Meijide-Faílde R, Blanco F, Fernandez Burguera E. Endogenous hydrogen sulfide production is reduced in OA cartilage. Possible contribution to the pathogenesis of OA. En 2015. p. A311.
34. Piñeiro-Ramil M, Burguera EF, Hermida-Gómez T, Caramés B, Oreiro-Villar N, Meijide-Faílde R, et al. Reduced Levels of H₂S in Diabetes-Associated Osteoarthritis Are Linked to Hyperglycaemia, Nrf-2/HO-1 Signalling Downregulation and Chondrocyte Dysfunction. *Antioxidants.* 25 de marzo de 2022;11(4):628.
35. Chen, C., You Q., Hu L., Gao J., Meng Q., Liu W., et al. The Antioxidant Procyanidin Reduces Reactive Oxygen Species Signaling in Macrophages and Ameliorates Experimental Colitis in Mice. *Front Immunol.* 2018;8(1910).
36. Gordon S., Martinez FO. Alternative activation of macrophages: mechanism and functions. *Immunity.* *Immunity* de 2010;32:593-604.
37. Sica A, Mantovani A. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *J Clin Invest.* marzo de 2012;122(3):787-95.
38. Vaamonde-García, Elena F. Burguera, Ángela Vela-Anero, Tamara Hermida-Gómez, Purificación Filgueira-Fernández, Jennifer A. Fernández-Rodríguez, et al. Intraarticular Administration Effect of Hydrogen Sulfide on an In Vivo Rat Model of Osteoarthritis. *Int J Mol Sci.* 2020;21(7421).

39. Chadwick R, Powell, Kearsley M, Dillon, John B, Matson. A Review of Hydrogen Sulfide (H₂S) Donors: Chemistry and Potential Therapeutic Applications. *Biochem Pharmacol.* 2018;149:110-23.
40. Zhao S., Li X., Li X., Wei X., Wang H. Hydrogen Sulfide Plays an Important Role in Diabetic Cardiomyopathy. *Front Cell Dev Biol.* 2021;18(9):627336.
41. Linton MF, Fazio S. Macrophages, inflammation, and atherosclerosis. *Int J Obes Relat Metab Disord J Int Assoc Study Obes.* diciembre de 2003;27 Suppl 3:S35-40.
42. Chawla A, Nguyen KD, Goh YPS. Macrophage-mediated inflammation in metabolic disease. *Nat Rev Immunol.* 10 de octubre de 2011;11(11):738-49.
43. McInnes IB, Schett G. The pathogenesis of rheumatoid arthritis. *N Engl J Med.* 8 de diciembre de 2011;365(23):2205-19.
44. Gautier EL, Yvan-Charvet L. Understanding macrophage diversity at the ontogenic and transcriptomic levels. *Immunol Rev.* noviembre de 2014;262(1):85-95.
45. Knudsen TB, Gustafson P, Kronborg G, Kristiansen TB, Moestrup SK, Nielsen JO, et al. Predictive value of soluble haemoglobin scavenger receptor CD163 serum levels for survival in verified tuberculosis patients. *Clin Microbiol Infect.* 1 de septiembre de 2005;11(9):730-5.
46. Sulahian TH, Pioli PA, Wardwell K, Guyre PM. Cross-linking of Fcγ₂R triggers shedding of the hemoglobin-haptoglobin scavenger receptor CD163. *J Leukoc Biol.* julio de 2004;76(1):271-7.
47. Timmermann M, Högger P. Oxidative stress and 8-iso-prostaglandin F₂(α) induce ectodomain shedding of CD163 and release of tumor necrosis factor-α from human monocytes. *Free Radic Biol Med.* 1 de julio de 2005;39(1):98-107.
48. Møller HJ, Frikke-Schmidt R, Moestrup SK, Nordestgaard BG, Tybjaerg-Hansen A. Serum soluble CD163 predicts risk of type 2 diabetes in the general population. *Clin Chem.* febrero de 2011;57(2):291-7.
49. Parkner T, Sørensen LP, Nielsen AR, Fischer CP, Bibby BM, Nielsen S, et al. Soluble CD163: a biomarker linking macrophages and insulin resistance. *Diabetologia.* junio de 2012;55(6):1856-62.
50. Bronte V., Zanovello P. Regulation of immune responses by L-arginine metabolism. *Nat Rev Immunol.* 2005;5:641-54.
51. Liu L, Lu Y, Martinez J, Bi Y, Lian G, Wang T, et al. Proinflammatory signal suppresses proliferation and shifts macrophage metabolism from Myc-dependent to HIF1α-dependent. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 9 de febrero de 2016;113(6):1564-9.
52. Sun F, Luo JH, Yue TT, Wang FX, Yang CL, Zhang S, et al. The role of hydrogen sulphide signalling in macrophage activation. *Immunology.* enero de 2021;162(1):3-10.

53. Sakuma S., Minamino S., Takase M., Ishiyama Y., Hosokura H., Kohda T., et al. Hydrogen sulfide donor GYY4137 supresses proliferation of human colorectal cancer Caco-2 cells by inducing both cell cycle arrest and cell death. *Heliyon*. 2019;5.
54. Perry M., Hui C., Whiteman M., Wood M., Adcock I., Kirkham P., et al. Hydrogen Sulfide Inhibits Proliferation and Release of IL-8 from Human Airway Smooth Muscle Cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2011;45:746-52.
55. Zhang X, Yu Y, Lei H, Cai Y, Shen J, Zhu P, et al. The Nrf-2/HO-1 Signaling Axis: A Ray of Hope in Cardiovascular Diseases. *Cardiol Res Pract*. 2020;2020:5695723.
56. Guillén M., Megías J., Gomar F., Alcaraz M. Haem oxygenase-1 regulates catabolic and anabolic precesses in osteoarthritic chondrocytes. *J Pathol*. 2008;214:515-22.
57. Chen Z, Zhong H, Wei J, Lin S, Zong Z, Gong F, et al. Inhibition of Nrf2/HO-1 signaling leads to increased activation of the NLRP3 inflammasome in osteoarthritis. *Arthritis Res Ther*. 2019;21:300.
58. Poulet B, Beier F. Targeting oxidative stress to reduce osteoarthritis. *Arthritis Res Ther*. 27 de enero de 2016;18:32.
59. Luo JF, Shen XY, Lio CK, Dai Y, Cheng CS, Liu JX, et al. Activation of Nrf2/HO-1 Pathway by Nardochinoid C Inhibits Inflammation and Oxidative Stress in Lipopolysaccharide-Stimulated Macrophages. *Front Pharmacol [Internet]*. 2018 [citado 25 de julio de 2022];9. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphar.2018.00911>
60. Vaamonde-Garcia C, Courties A, Pigenet A, Laiguillon MC, Sautet A, Houard X, et al. The nuclear factor-erythroid 2-related factor/heme oxygenase-1 axis is critical for the inflammatory features of type 2 diabetes-associated osteoarthritis. *J Biol Chem*. 2017;292(35):14505-15.
61. Chang, S., Barbosa-Tessmann, I., Chen, C., Kilberg, M. S., Agarwal, A. Glucose deprivation induces heme oxygenase-1 gene expression by a pathway independent of the unfolded protein response. *J Biol Chem*. 2002;277:1933-40.
62. Whiteman M., Li L., Rose P., Tan CH., Parkinson DB., Moore PK. The effect of hydrogen sulfide donors on lipopolysaccharide induced formation of inflammatory mediators in macrophages. *Antioxid Redox Signal*. 2010;12(10):1147-54.
63. Li, L., Fox, B., Keeble, J., Salto-Tellez, M., Winyard, P. G., Wood, M. E. The complex effects of the slow releasing hydrogen sulfide donor GYY4137 in a model of acute joint inflammation and in human cartilage cells. *J Cell Mol Med*. 2013;17:365-76.
64. Rose P, Dymock BW, Moore PK. GYY4137, a novel water-soluble, H₂S-releasing molecule. *Methods Enzymol*. 2015;554:143-67.

8. ANEXO I: COPIA DEL MODELO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO 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 10 ml de sangre, siendo extraída esta última siguiendo el procedimiento rutinario para efectuar análisis estándar de sangre.

RIESGOS. -

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

COMPENSACIÓN. -

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

CONFIDENCIALIDAD. -

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

Para garantizar la confidencialidad de su identidad (asegurar que la información de su muestra de sangre no se relaciona con su identidad), su muestra sólo irá identificada desde el mismo momento de la extracción con un código.

Sólo este código, y nunca su identidad aparecerá en las bases de datos donde figure la información clínica o genética referida a usted. La relación entre su código y su identidad quedará custodiada por el personal autorizado del equipo investigador, adoptándose las medidas necesarias

para que tal información no esté disponible salvo para el personal autorizado, el cual tiene el deber legal de guardar secreto.

De esta manera podemos asegurar que cualquier información que se obtenga a partir de su muestra de sangre permanezca confidencial. Es importante que entienda que existe la posibilidad de que sus datos y parte de su muestra sean transferidos a otros equipos de investigación que trabajen en el mismo campo. En tal caso, se asegurará que estos datos sean tratados con la misma confidencialidad descrita anteriormente. Por otro lado, es posible que los resultados de las investigaciones sean publicados en la literatura científica, pero entendiendo estos resultados como los obtenidos de la totalidad de las muestras, no los resultados individuales. Si este fuera el caso, su identidad permanecerá completamente confidencial y nunca formará parte de ninguna publicación.

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

NUEVOS HALLAZGOS Y RESULTADOS. -

Como ya se ha descrito, se adoptarán estrictas medidas de seguridad para garantizar la confidencialidad de los resultados de los estudios realizados. La evaluación de los resultados se hará sólo por grupos (por ejemplo, hombres / mujeres, grupos de edad, etc.) y no de forma individual. Debe comprender que los resultados de valor que se pudieran obtener provendrían del estudio de múltiples muestras, y en ningún caso de la suya exclusivamente.

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

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

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

PARTICIPACIÓN VOLUNTARIA. -

- Su participación en el proyecto de investigación es totalmente voluntaria.
- Si firma el consentimiento informado, confirmará que desea participar.
- Puede negarse a participar o retirar su consentimiento en cualquier momento posterior a la firma sin tener que explicar los motivos.
- Si decide retirar su consentimiento, su muestra será destruida y sólo se guardará la información obtenida hasta ese momento.
- Su no-participación o retirada posterior del consentimiento no afectará en modo alguno a su asistencia médica presente o futura.

OBTENCIÓN DE INFORMACIÓN ADICIONAL. -

Usted puede contactar con cualquier miembro del Servicio de Reumatología del C.H.U. A Coruña si le surge cualquier duda sobre su participación en este proyecto o sobre sus derechos como paciente, en el teléfono 981176399. En todo momento se pondrán los medios necesarios para facilitarle la información más adecuada.

9. AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer en primer lugar a mi familia por su apoyo y confianza. A mi tutor Carlos Vaamonde García por su ayuda, paciencia y dedicación. Agradezco también a los docentes y a la coordinadora de este máster, Silvia María Díaz Prado por la buena predisposición durante el curso. Gracias a la Xunta de Galicia por concederme la beca para cursar el máster. Finalmente, agradezco a mis compañeras por los buenos momentos compartidos.