



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

Grado en Biología

Dpto. de Biología

Memoria do traballo de Fin de Grado

Estudio *in vitro* del efecto del RSV en la expresión de la enzima antioxidante superóxido dismutasa-2 en sinoviocitos de rata en cultivo.

Estudio *in vitro* do efecto do RSV na expresión da enzima antioxidante superóxido dismutase-2 en sinoviocitos de rata en cultivo.

In vitro study of the effect of RSV in the expression of antioxidant enzyme superoxide dismutase-2 in cultured rat sinoviocytes

Daniel García Sánchez

Junio, 2017

Directores:

Dr. María José López Armada

Dr. Antonio Manuel Castro Castro



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

Facultad de Ciencias

Departamento de Biología

Trabajo de Fin de Grado

D. Antonio Manuel Castro Castro, Profesor Titular de Universidad del Departamento de Biología de la Universidad de A Coruña, y Dña María José López Armada, doctora nombrada por el Área de Envejecimiento, Inflamación, Medicina Regenerativa, emplazada en el Instituto de Investigación Biomédica (INIBIC),

Informan,

Que el presente Trabajo de Fin de Grado presentado por Daniel García Sánchez y con título “Estudio *in vitro* del efecto del RSV en la expresión de la enzima antioxidante superóxido dismutasa-2 en sinoviocitos de rata en cultivo” ha sido realizado bajo nuestra dirección y, considerándolo finalizado, autorizamos su envío y presentación al tribunal calificador.

Y, para que así conste, expedimos el presente informe en A Coruña a 20 de junio de 2017.

Fdo. Antonio Manuel Castro Castro

Fdo. María José López Armada

Resumen

La artritis reumatoide es una enfermedad crónica, autoinmune, inflamatoria y sistémica que afecta a un 1% de la población mundial. La enfermedad está promovida por el exceso de producción de especies reactivas de oxígeno e inducido, entre otras, por citoquinas como el factor de necrosis tumoral (TNF- α) o la interleucina-1 β (IL-1 β), que generan un estrés oxidativo en las células de la articulación, las cuales aumentan sus niveles de enzimas como la superóxido dismutasa-2 (SOD2) para intentar combatir este estrés. El resveratrol es un polifenol natural al que se le atribuyen numerosos beneficios, incluidos efectos antiinflamatorios y antioxidantes. El objetivo del presente estudio fue valorar el efecto del resveratrol sobre los niveles de la SOD2 en sinoviocitos de rata en cultivo. Para ello se realizó un cultivo de sinoviocitos de rata, que fueron sometidos a diferentes condiciones, y se llevaron a cabo las técnicas de western-blot e inmunofluorescencia, para medir los niveles de la enzima SOD2 en las diferentes condiciones testadas. Los resultados se vio una disminución de los niveles de la enzima en aquellas células preincubadas con resveratrol antes de ser expuestos a citoquinas proinflamatorias, poniéndose de manifiesto la actividad antiinflamatoria y antioxidante del resveratrol.

Palabras clave: Artritis reumatoide, Superóxido dismutasa-2, resveratrol, TNF- α , IL-1 β .

Resumo

A artrite reumatoide é unha enfermidade crónica, autoinmune, inflamatoria e sistémica que afecta o 1% da población mundial. A enfermidade é promovida polo exceso de produción de especies reactivas de osíxeno e inducido, entre outros, por citoquinas como o factor de necrose tumoral (TNF- α) ou a interleucina-1 β (IL-1 β), que xeran estrés oxidativo nas células da articulación, que aumentan os seus niveis de enzimas como a superóxido dismutase-2 (SOD2) para tratar de combater este estrés. O resveratrol é un polifenol natural, que é atribuída numerosos beneficios, incluíndo efectos antiinflamatorios e antioxidativos. O obxectivo deste estudo foi avaliar o efecto do resveratrol sobre os niveis de SOD2 en sinoviocitos de rato cultivada. Para isto se fixo un cultivo de sinoviocitos de rato, que foron sometidos a condicións distintas, e foron realizadas técnicas de western-blot e inmunofluorescencia, para medir os niveis de SOD2 nas diferentes condicións examinadas. Os resultados era unha diminución dos niveis de enzimas nas células preincubadas có resveratrol antes de ser expostos a citoquinas proinflamatorias, confirmando así a actividade antiinflamatoria e antioxidativa do resveratrol.

Palabras clave: Artrite reumatoide, Superóxido dismutase-2, resveratrol, TNF- α , IL-1 β .

Abstract

Rheumatoid arthritis is a chronic, autoimmune, inflammatory and systemic disease affecting the 1% of the world's population. It is promoted by the excess production of reactive oxygen species induced by, among other, cytokines such as tumor necrosis factor (TNF- α) or interleukin-1 β (IL-1 β), which generates an oxidative stress in the joint cells. These increase, in these cells, the levels of enzymes such as superoxide dismutase-2 (SOD2) to fight against this stress. Resveratrol is a natural polyphenol that has numerous benefits, including anti-inflammatory and anti-oxidative effects. The aim of the present study was to evaluate the effect of resveratrol on the levels of SOD2 in rat synoviocytes in culture. For this purpose a culture of rat synoviocytes was performed, which were subjected to different conditions, and western-blot and immunofluorescence techniques were performed to measure the levels of the SOD2 enzyme under the different tested conditions. The results showed a decrease in enzyme levels in those cells preincubated with resveratrol before being exposed to proinflammatory cytokines, showing the anti-inflammatory and anti-oxidative activity of resveratrol.

Key words: Rheumatoid arthritis, Superoxide dismutase-2, resveratrol, TNF- α , IL-1 β .

Índice

1. Introducción	1
1.1. La artritis reumatoide	1
1.2. Estrés oxidativo	3
1.3. El resveratrol.....	4
2. Objetivo	5
3. Material y métodos	5
3.1. Cultivo de células sinoviales de rata	4
3.1.1. Estimulación celular.....	7
3.2. Western-blot	8
3.2.1. Cultivo celular	8
3.2.2. Extracción y cuantificación de proteínas	8
3.2.3. Electroforesis de proteínas, transferencia a membranas a inmunodetección (Western-blot)	8
3.2.3.1. <i>Migración de las proteínas</i>	9
3.2.3.2. <i>Transferencia semi-húmeda</i>	10
3.3. Inmunofluorescencia	10
3.3.1. Cultivo celular	10
3.3.2. Técnica	11
4. Resultados	11
4.1. Análisis de la expresión de SOD por western-blot.	11
4.2 Análisis de la expresión de SOD por inmunofluorescencia	14
5. Discusión	16
6. Conclusión	17
6.1. Conclusión	17
6.2. Conclusion.....	17
7. Bibliografía	17

1. Introducción

1.1. La artritis reumatoide

La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad crónica, inflamatoria, sistémica y de carácter autoinmune que daña principalmente las articulaciones. Afecta a entre el 0,3% y 1,2% de la población mundial, siendo tres veces más frecuente en las mujeres, y aumentando el riesgo de aparición con la edad (1). Como ya se ha mencionado, también se incluye entre las enfermedades autoinmunes, ya que está caracterizada por la producción de anticuerpos que reconocen autoantígenos característicos de las articulaciones, la presencia de diferentes tipos de linfocitos (linfocitos T CD4 y CD8, linfocitos B, etc.), y la participación de numerosas citoquinas que le proporcionan un marcado carácter inflamatorio asociado con un incremento del estrés oxidativo. Los síntomas locales de la enfermedad incluyen la destrucción de la articulación, debido al proceso inflamatorio y la proliferación celular (Figura 1), mientras que a nivel sistémico va acompañada de pueden ser fatiga, fiebre y anemia; asimismo la AR puede afectar a otros tejidos llegando a producir nódulos subcutáneos, fibrosis pulmonar o vasculitis (2).

Precediendo a los factores clínicos detectables de la enfermedad, está la producción de autoanticuerpos como el factor reumatoide y anticuerpos antipeptidos citrulinados debido a una brecha en el sistema inmune. La transición a los factores clínicos de inflamación y daño en la articulación no es del todo clara pero puede deberse a traumas menores, infecciones, actuación hormonal o factores psicológicos. El riesgo a padecer la AR y el grado de severidad de la misma parecen estar influenciados por la alteración en algunos *loci*, como el del complejo mayor de histocompatibilidad, o aquellos que codifican para citoquinas y sus receptores, entre otros. Además, factores externos como el tabaco, aumentan el riesgo a sufrir AR (3, 4).

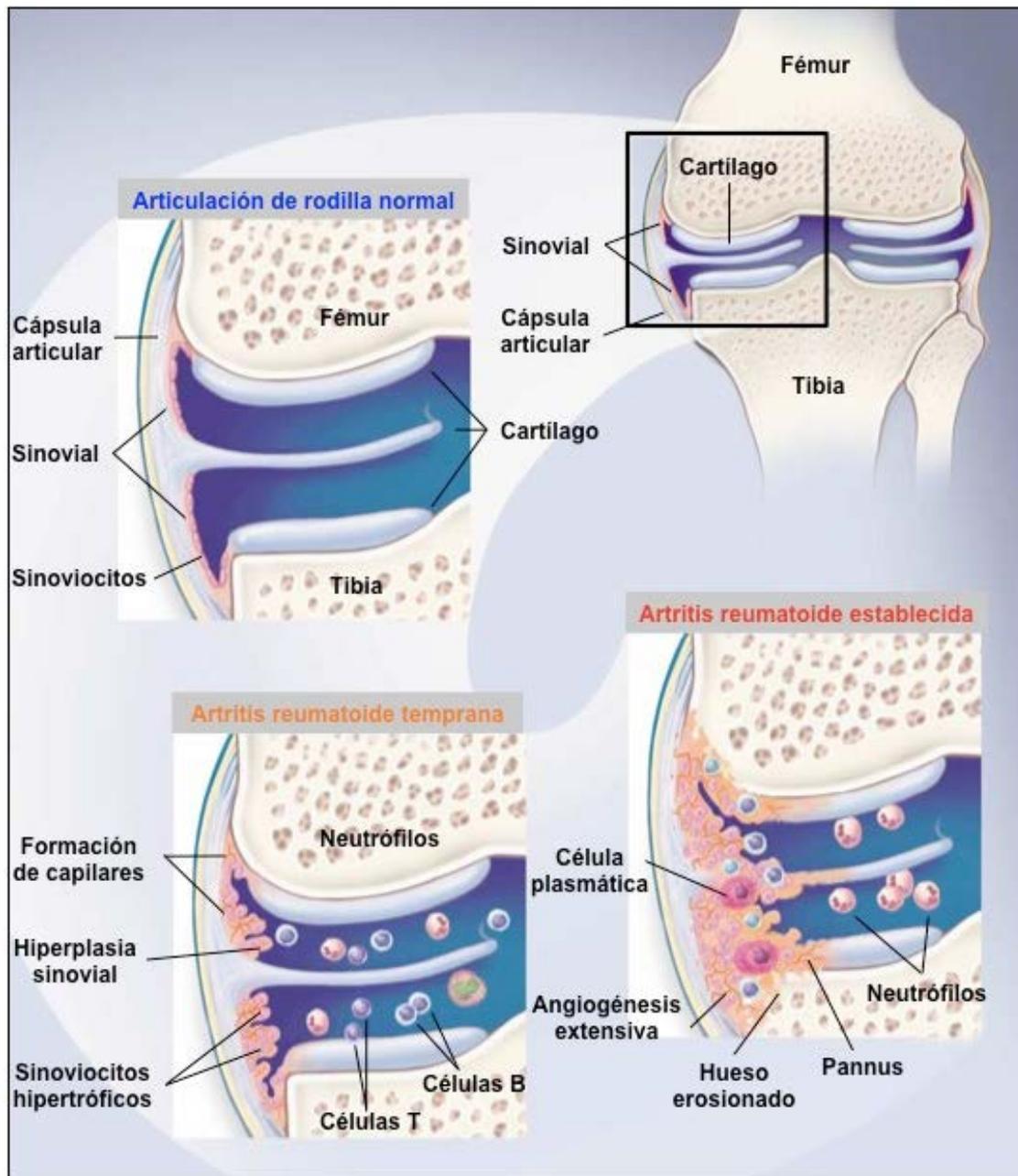


Figura 1. Evolución de la artritis reumatoide. En fases tempranas de la enfermedad se produce una congregación de células del sistema inmune (neutrófilos, linfocitos T y B), y proliferación celular en la membrana sinovial. En fases más tardías de la AR los sinoviocitos invaden otros tejidos (hueso y cartílago) erosionándolo. Imagen tomada de Riveiro Naveira RR 2015 (1) modificada de Choy EH, 2001 (18).

La angiogénesis sinovial es un factor determinante en la inflamación del sinovio de la articulación, o sinovitis. Esta proliferación de vasos sanguíneos se produce en respuesta a diversos estímulos como la presencia de mediadores inflamatorios, hipoxia y proliferación celular con un reducido grado de apoptosis (2). Entre los mediadores inflamatorios se encuentran las citoquinas, como las interleucinas (IL-1, IL-10, IL-15, etc.), o el factor de necrosis tumoral (TNF- α). El TNF- α , producido por linfocitos T y macrófagos entre otros, tiene un doble efecto inflamatorio al modular a los linfocitos T reguladores, promoviendo su

proliferación, y al mismo tiempo inducir la liberación de otras citoquinas, como la interleucina de la familia 1 (IL-1). Estas son sintetizadas por macrófagos, linfocitos T y B, monocitos, células endoteliales y fibroblastos (1,2), promoviendo la proliferación de diversos tipos celulares como leucocitos, células endoteliales, y sinoviocitos, entre otros.

Los efectos de las citoquinas se deben a su activación de la ruta del factor nuclear- κ B (NF- κ B), ya que estas activan en el interior celular a quinasas I κ B que fosforilarán a las proteínas I κ B citoplasmáticas, lo que finalmente conducirá a la activación de NF- κ B, que se traslocará al núcleo activando numerosos genes asociados con la proliferación celular, la atracción de leucocitos, respuestas inflamatorias y resistencia a la apoptosis (5, 6).

Con la proliferación de los sinoviocitos de la articulación, inducida por las citoquinas, la capa íntima de la articulación pasa de tener entre 1 y 3 capas celulares a tener 10 o más capas, formadas por sinoviocitos con un fenotipo agresivo que promueven el avance de la enfermedad participando en procesos inflamatorios, degradación de cartílago y hueso debido a la actuación del *pannus*, una región de la membrana sinovial formada por sinoviocitos y linfocitos que invade tanto al cartílago como al hueso erosionándolos (7).

1.2. Estrés oxidativo

Se ha demostrado, que el estrés oxidativo es un factor importante en la capacidad de destrucción de la AR (8). La producción de ATP en las mitocondrias conlleva la reducción de O₂ a H₂O, durante este proceso, un pequeño porcentaje de electrones que fluyen a través de la cadena respiratoria mitocondrial durante el proceso de transporte electrónico se escapan y se unen directamente al oxígeno, constituyendo el ión superóxido, que a su vez puede derivar en otras especies reactivas del oxígeno (ROS). A pesar de que las ROS pueden ser empleadas como mecanismo de defensa contra microorganismos patógenos, también pueden resultar tóxicos en altas concentraciones debido a su tendencia a reaccionar con otras moléculas, pudiendo dañar los ácidos nucleicos, proteínas, las membranas celulares e incluso con las fibras de colágeno del medio extracelular. Por ello, las células poseen diversas enzimas como la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa o la glutatión peroxidasa, con el objetivo de degradar a las ROS y reducir al máximo el daño producido por estas moléculas, al controlar los niveles de ROS en concentraciones no tóxicas. Sin embargo, si la producción de estos compuestos oxidantes supera la capacidad de la célula para contrarrestarlos se produce un estrés oxidativo, resultando en los daños citados anteriormente (9). Además de en la infiltración de células del sistema inmune y en la inflamación mediada por citoquinas (10), la condición hipóxica de la articulación promueve también la producción de ROS (11).

La enzima SOD cataliza la reacción del paso de superóxido a peróxido de hidrógeno, una ROS menos tóxica que posteriormente sería degradada por otras enzimas (12). Por otro lado, su expresión está relacionada con fenómenos de estrés oxidativo y procesos de inflamación mediados por moléculas como el TNF- α o la IL-1 β (9).

En humano encontramos 3 tipos de SOD diferentes, una forma citosólica (SOD1), una mitocondrial (SOD2) y una extracelular (SOD3). La SOD2 también es conocida como superóxido dismutasa dependiente de manganeso (MnSOD). Puesto que las mitocondrias son la principal fuente de ROS, la SOD2 resulta esencial para evitar el estrés oxidativo (13).

1.3. El resveratrol

El resveratrol (RSV) o 3,5,4'-trihydroxystilbeno (Figura 2) es un polifenol aislado por primera vez en 1940 de las raíces de *Veratrum grandiflorum*. Actualmente se sabe que está presente en diversas plantas y frutos como moras, cacahuetes y uvas, entre otros, además de en productos derivados de los mismos como puede ser el vino. Destaca que su producción se realiza de forma natural en las plantas como respuesta a diferentes situaciones de estrés o frente a infecciones fúngicas (14).

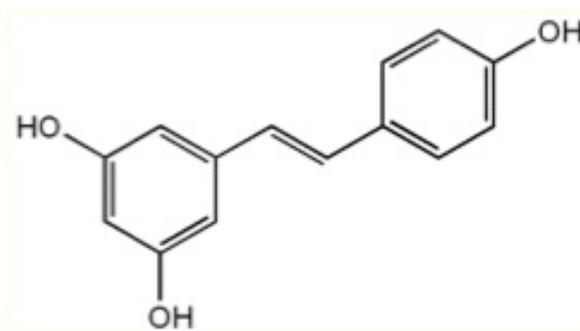


Figura 2. Estructura del resveratrol. Imagen tomada de Lastra CA y Villegas I (17).

Desde su descubrimiento se han realizado numerosos estudios sobre el RSV y sus posibles efectos en la salud, atribuyéndole en la actualidad propiedades antitumorales, antiangiogénicas o antiinflamatorias entre otras (1). La actividad antiinflamatoria del RSV se debe a su capacidad de inhibir a diferentes moléculas intermediarias del proceso inflamatorio, un ejemplo es el bloqueo de la ruta del NF- κ B cuando esta es activada por el TNF- α o la IL-1 β , posiblemente por la interacción del RSV con quinasas intermediarias de la ruta. (5). Más específicamente, se cree que el RSV puede actuar directamente inhibiendo a la enzima fosfodiesterasa, responsable de la degradación de AMP cíclico (cAMP). El incremento en la concentración de cAMP desencadenaría un incremento en la expresión de la enzima AMP quinasa (AMPK), la cual es capaz de inhibir la activación de NF- κ B y por lo tanto detener la respuesta inflamatoria (15, 16).

2. Objetivo

En este trabajo se busca estudiar, *in vitro*, el efecto del RSV sobre la expresión de la enzima SOD2 en sinoviocitos de rata cultivados bajo condiciones proinflamatorias, para intentar simular en parte, las condiciones de la artritis reumatoide bajo las cuales se encontrarían las células durante la

enfermedad. En condiciones inflamatorias, la expresión de la enzima SOD2 se vería estimulada por citoquinas como el TNF- α o la IL-1 β (9). Debido al posible efecto antiinflamatorio del RSV cabría esperar una disminución en los niveles de la enzima, relacionados con una atenuación de los síntomas inflamatorios por una reducción de los efectos de las citoquinas TNF- α e IL-1 β .

3. Material y métodos

3.1. Cultivo de células sinoviales de rata

Para realizar el experimento se emplearon células sinoviales de rata. Para ello se extrajo el tejido sinovial de una rata hembra Wistar de 2-3 meses de edad. Todos los protocolos de manipulación de animales se ajustan a la normativa vigente en la Unión Europea (2010/63/EU) y España (53/2013), y han sido aprobados por el Comité Ético de Experimentación Animal de la Xerencia de Xestión Integrada A Coruña (XXIAC). Previamente a la extracción de las muestras, el animal fue sacrificado y transportado desde el animalario del INIBIC hasta una zona habilitada para la extracción de tejidos, en la cual se realizó la extracción de las extremidades posteriores (Figura 3).



Figura 3. Mesa de trabajo donde se realizó la extracción de las extremidades. 1- Animal al que se le realizó la extracción; 2- Bisturí; 3- Cizallas; 4- Alcohol (etanol 70°); 5- Contenedor de plástico estéril; 6- Pinzas.

Primero se retiró la piel del animal que recubría una de las extremidades, y a un par de centímetros por encima de la articulación, se seccionaron los músculos hasta llegar al hueso. A continuación se cortó el hueso, extrayéndose así la extremidad. Se repitió el mismo procedimiento para la extremidad contralateral.



Figura 4. Contenedor de plástico estéril, con las extremidades posteriores.

Finalizada la extracción de las extremidades se introdujeron en un recipiente estéril (Figura 4) y fueron trasladadas rápidamente a la campana de cultivos donde se procedió a la extracción del tejido sinovial. Hasta este momento, el procedimiento se realizó en condiciones higiénicas pero no estériles.

Una vez en la campana, procedió a realizar la extracción de la muestra de tejido sinovial de las articulaciones bajo condiciones estériles. Antes de realizar la extracción del tejido, cuatro zonas de una placa Petri de 8,8 cm² (NUNC™, Thermo Fisher Scientific) fueron rayadas para mejorar así la adherencia de las muestras de tejido sinovial.

Para acceder al tejido sinovial fue necesario retirar la fascia, capa membranosa de color blanquecino que recubría externamente la articulación. Una vez retirada quedó al descubierto un pequeño orificio en la parte superior de la articulación (Figura 5) a partir del cual, y con la articulación flexionada para facilitar el trabajo, se realizaron cortes laterales, al tiempo que se levantaba la membrana sinovial, hasta finalmente extraer una muestra de tejido sinovial de aproximadamente 3 mm de diámetro.



Figura 5. Extremidad de rata Wistar. A la que se le ha retirado la fascia superficial quedando al descubierto el tejido sinovial.

A continuación la muestra fue cortada en dos partes iguales y cada una fue depositada en una de las zonas previamente rayadas de la placa Petri. Se realizó el mismo procedimiento con la otra extremidad.

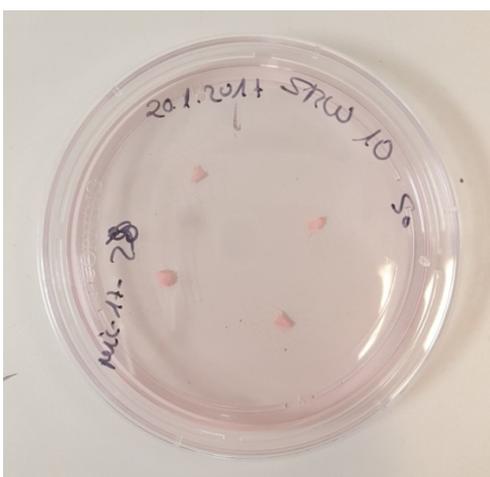


Figura 6. Placa Petri donde se sembraron las muestras de tejido. La placa fue identificada con: la fecha 20.1.2017; código del individuo STW 10; número del pase del cultivo S₀; y el código del test del micoplasma mic-17-28.

Una vez colocadas las muestras de tejido, añadimos a la placa 8 ml de medio de cultivo, RPMI 1640 con L-Glutamina (Lonza, Basel, Suiza) suplementado con un 10% de suero bovino fetal (SBF) y 100 U/ml de penicilina/100 µg/ml de estreptomina (Gibco BRL, Paisley, UK).

Una vez identificada la placa Petri (Figura 6), indicando los datos del animal, la fecha del cultivo, el número del pase, y el código del test de micoplasma. Y se introdujo una estufa de cuarentena a 37°C, un total de 72 horas, tras los cuales se comprobó que no había contaminación por micoplasmas.

Con un resultado negativo en el test de micoplasma, se renovó el medio de cultivo y la placa se pasó a la estufa de cultivo a 37°C. Transcurridas 96 h desde su siembra se pudo comprobar que ya existía crecimiento celular en la periferia de los explantes (Figura 7A), por lo que se procedió a la extracción de las muestras de tejido sinovial en la campana de cultivos. Una semana después, renovando el medio cada 2 días, se confirmó que hubo crecimiento celular (Figura 7B).

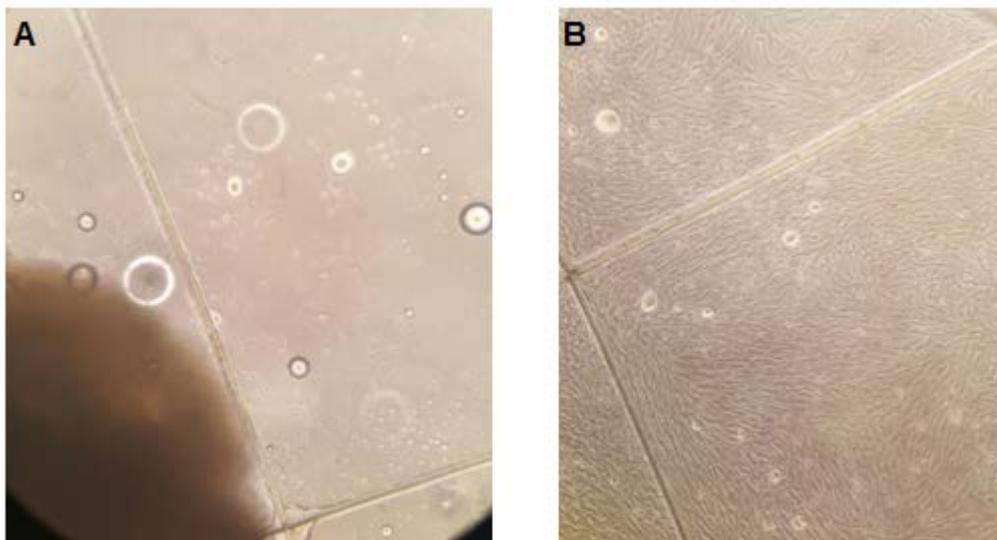


Figura 7. Imágenes de sinoviocitos, a diferentes tiempos, del cultivo. A- Placa petri tras 96 h de cultivo a 37°C, en la esquina inferior izquierda se observa la membrana sinovial alrededor de la cual se aprecia crecimiento celular. **B-** Placa petri a los 7 días de retirar la membrana sinovial, apreciándose un claro crecimiento celular.

Para obtener un mayor número de células, estas se expandieron mediante tripsinización, traspasándose a un flask de 150 cm². Para ello se retiró el medio, se lavaron las células con suero fisiológico (Fresenius Kabi, Barcelona, España), y se añadieron 5 ml de tripsina (Gibco), dejándola actuar durante 2 min a 37°C. Transcurrido el tiempo y tras comprobar el levantamiento de las células, se añadieron 5 ml de medio RPMI 10% (Lonza). La mezcla con las células en suspensión se traspasó a un tubo falcon de 50 ml, y se lavó la placa medio para recoger las células remanentes. Se centrifugó a 1500 rpm durante 10 min, se decantó el líquido y se resuspendieron las células precipitadas en 10 ml de medio RPMI 10%. Se homogeneizó y se traspasó a un flask que se identificó con los datos del cultivo celular marcándolo como pase S₁, al cual se le renovó el medio cada dos días.

3.1.1. Estimulación celular

Para la fase de experimentación, las células sinoviales cultivadas se utilizaron desde el tercer pase, y nunca excediendo el pase número 9. Las células se sembraron en placas de 6 pocillos (250.000 células/2 ml/pocillo) para el western-blot, y en portaobjetos chamber de 8 pocillos (18.000 células/0,5 ml/pocillo) para inmunofluorescencia, en las cuales fueron sometidas a diferentes estímulos.

Tras añadir las células se dejaron crecer durante un día tras lo cual fueron deplecionadas al cambiarles el medio de cultivo por un medio RPMI 0,5% (Lonza) más antibióticos: 1 ml en las placas de 6 pocillos y 300 µl en los portaobjetos chamber. Y tras 24 h se volvió a cambiar el medio por un medio RPMI 0% (Lonza) más antibióticos, y las células se sometieron a las células a las diferentes condiciones.

3.2. Técnica de Western-blot para la expresión proteica de SOD2

3.2.1. Cultivo celular

Para el western-blot se realizaron tres cultivos celulares diferentes: el SRW-103, el SRW-106 y el SRW-115. Tras sembrar las células, el cultivo celular se realizó en condiciones de hipoxia en los experimentos SRW-103 y SRW-106, y de normoxia en el SRW-115. Los estímulos empleados fueron:

1. Condiciones basales.
2. Estímulo de interleuquina-1 β 5 ng/ml (IL-1 β ; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO).
3. Estímulo de Factor de necrosis tumoral- α 10 ng/ml (TNF- α ; Sigma-Aldrich).
4. Estímulo de resveratrol (RSV; Sigma-Aldrich) 50 µM.
5. Estímulo de IL-1 β 5 ng/ml más RSV 50 µM.
6. Estímulo de TNF- α 10 ng/ml más RSV 50 µM.

En los experimentos SRW-103 y SRW-106 se aplicaron las 6 condiciones, mientras que en el SRW-115 solo se utilizaron las condiciones 1, 3, 4 y 6.

A la hora de añadir los estímulos primero se añadió, en los pocillos correspondientes 1 µl de RSV resuspendido en etanol y se dejó actuar 30 min a 37°C, tras lo cual se añadieron los otros estímulos: IL-1 β y TNF- α , los cuales se dejaron actuar durante 24 h a 37°C.

Transcurrido el tiempo se eliminó el medio, se lavaron las células con suero salino y se añadieron 100 µl de solución de lisis. Tras lo que se procedió a realizar la extracción y cuantificación de las proteínas.

3.2.2. Extracción y cuantificación de proteínas

Primero se preparó el tampón de lisis al cual se le añadió en el momento de usarlo por cada ml: 10 µl de PMSF (fluoruro de fenilmetilsulfonilo), y 10 µl de un coctel de inhibidores (Sigma).

Se lavó dos veces la placa de cultivo con suero salino, se añadieron 40 µl de tampón de lisis y se raspó con un raspador para recoger el lisado celular. Se recogió el tampón con el lisado celular en un eppendorf y se introdujo en un termoblock 5 min a 100°C, transcurrido el tiempo se centrifugó a 1300 rpm durante 10 min a 4°C.

Finalmente se cuantificaron las proteínas, a partir del sobrenadante, en un espectrofotómetro (NanoDrop 1000, Thermo Scientific, Wilmington, EEUU) empleando como blanco el tampón de lisis.

3.2.3. Electroforesis de proteínas, transferencia a membranas e inmunodetección (Western-blot)

Una vez extraídas y cuantificadas las proteínas se procedió a preparar los geles y el tampón de transferencia para la realización del Western-blot. Para ello se empleó un equipo semejante al de la Figura 8.



Figura 8. Equipo de western-blot. 1- Cristales para el molde, con espaciadores integrados; 2- Marco, soporte para los cristales; 3- Peines con diferente número de pocillos; 4- Soporte del marco; 5- Tanque de tampón; 6- Guía para el cargado de las muestras. Imagen de representativa extraída de la web de Bio Rad (Hercules, California, EE.UU.).

En el gel de acrilamida empleado, la fase superior de 1,5 cm, (“stacking”) consiste en un gel de acrilamida al 7,5% compuesto por: 3,35 ml de acrilamida al 40% 19:1 (Sigma-Aldrich), 9,51 ml de agua destilada, 4,28 ml de tampón B4x (131 g trizma base 3 M/500 ml), 200 µl de APS al 10% y 30 µl de TEMED (Sigma-Aldrich). Por otro lado, para la fase inferior (“running”) se emplearon: 1,07 ml de acrilamida al 40% 19:1, 4,29 ml de agua destilada, 1,78 ml de tampón C4x (6,057 ml trizma base/100 ml), 46 µl de APS al 10% y 15µl de TEMED.

Tras preparar el gel, con 15 pocillos, y antes de continuar se prepararon los diferentes tampones, recogidos en la tabla 1.

Nombre	Composición
Tampón “running” 10x (500 ml)	15,1 g trizma-base, 72,1 g glicina, 5 ml SDS 10% y agua destilada.
Tampón de transferencia (500 ml)	2,9 g trizma-base, 1,46 g glicina, 1,88 ml SDS 10%, 100 ml metanol y agua destilada.
Tampón de lavado 10x (500 ml; pH 7,5)	12,1 g trizma-base, 14,5 g NaCl 0,1M, 5 ml Tween 20 0,1%, y agua destilada.
Tampón de bloqueo	100 ml tampón de lavado 1x y leche descremada al 5%.
Tampón de carga	9 partes de suero de laemli y una de β-mercaptoetanol.

Tabla 1. Composición de los tampones empleados en la técnica de western-blot.

3.2.3.1. SDS-PAGE (Migración de las proteínas)

Una vez preparados los geles se introdujeron en el tanque de electroforesis, que se rellenó con tampón de “running”, y se extrajeron los peines.

A continuación se procedió a cargar las proteínas en el gel junto con los marcadores de pesos moleculares (NZY Colour Protein Marker II, Nzytech, Portugal). Para ello se diluyeron las muestras de proteínas (30 µg) en agua destilada hasta obtener 18 µl. Posteriormente se les añadieron 6 µl de tampón de carga, para tener así una proporción de 3:1 de proteína con respecto al tampón de carga. Las mezclas se dejaron 5 min a 95°C y posteriormente se cargaron en los pocillos del gel.

Una vez cargadas las muestra se usó el sistema mini-Protean III Cell (Bio-Rad) a un voltaje de 100 V durante 20 min, para que las muestras penetrasen en la primera fase, más una hora a 120 V para la migración de las proteínas en la segunda fase del gel. A continuación las proteínas separadas fueron transferidas a una membrana fluoruro de polivinidileno (PVDF).

3.2.3.2. Transferencia semi-húmeda

Primero se cortó una membrana PVDF en un rectángulo de 6x8 cm, y un par de papeles absorbentes de 7x8 cm.

Seguidamente se activó la membrana bañándola 5 min en metanol, 5 min en agua destilada y 5 min en metanol para finalmente dejarla sumergida en tampón de transferencia a 4°C. Por otra parte se guardaron los dos papeles en tampón de transferencia en frío, y al mismo tiempo se incubó el gel, ya retirado del soporte, también en tampón de transferencia durante 15 min en nevera.

Transcurrido este tiempo, se colocó en el Transblot el “sándwich” de papel-membrana-gel-papel, y se conectó con una corriente de 20 V durante 40 min para que tuviese lugar la transferencia. Se retiró la membrana y se tiñó con colorante Ponceau (1 min), para comprobar que la transferencia se realizó satisfactoriamente. Después se lavó tres veces (5 min) con tampón de lavado 1x, y se bloqueó la membrana con leche al 5% durante 40 min a temperatura ambiente. Se incubó con el anticuerpo primario, anticuerpo de conejo para la SOD2 (Abcam, Cambridge, Reino Unido) en una dilución 1:500, disuelto en leche al 5% durante una hora, se realizaron 3 lavados de 5 min con tampón de lavado 1x, y se incubó en agitación a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario, inmunoglobulinas de cabra anti-conejo marcadas con peroxidasa (Santa Cruz, Dallas, Texas, EE.UU) en una dilución 1:4000, disuelto en leche al 5%. Al cabo de 2 h de incubación se lavó durante 5 min con tampón de lavado 1x tres veces.

Finalmente se procedió a realiza el revelado por quimioluminiscencia de la membrana empleando el programa informático LAS-3000 “Pro”.

Tras el revelado de la SOD2 se repitió el proceso para detectar la tubulina, utilizada como control de carga. En este caso se utilizó en primer lugar un anticuerpo primario de ratón anti-tubulina marcado con peroxidasa (Santa Cruz), en una dilución 1:5000, en leche al 5% durante 1 h a temperatura ambiente. Posteriormente se empleó un anticuerpo secundario anti-ratón

(Santa Cruz), en una dilución 1:10000 en leche al 5% durante otra hora a temperatura ambiente.

3.3. Estudio de la proteína SOD2 por microscopía de fluorescencia

3.3.1. Cultivo celular

En el experimento de inmunofluorescencia se realizó un cultivo celular en normoxia, el cultivo SRW-115, siendo las células sometidas a los siguientes estímulos:

1. Condiciones basales.
2. TNF- α 10 ng/ml.
3. IL-1 β 5 ng/ml.
4. RSV 25 μ M.
5. TNF- α 10 ng/ml, que se utilizará como negativo de la técnica.
6. TNF- α 10 ng/ml más RSV 25 μ M.
7. IL-1 β 5 ng/ml más RSV 25 μ M.

Los sinoviocitos se incubaron primero con RSV 30 min antes de la incubación con el resto de los estímulos durante otras 24 h.

3.3.2. Inmunofluorescencia

Transcurrido el tiempo de cultivo se comprobó al microscopio que hubo crecimiento celular y que las células se encontraban en buen estado. Se retiró el medio, se lavaron las células con suero salino, y se fijaron con paraformaldehído (PFA) al 4% durante 30 min a 4°C. Posteriormente se lavaron dos veces (5 min) con tampón de fosfato salino-PBS (Dako REAL™, EnVision™, Glostrup, Dinamarca) 1x.

A continuación se bañaron en PBS con 0,2% de Tween®20 (PBST) al 0,2% durante 10 min a temperatura ambiente. Después de retirar el líquido se añadieron 200 μ l de BSA (seroalbúmina bovina) al 0,2% en PBST, que se dejó actuar durante 30 min, tras lo que fue sustituido por 200 μ l del Anticuerpo primario (Abcam) en una dilución 1:500 en PBST en todos los pocillos menos en el 5 (TNF- α , control negativo de la técnica), al cual únicamente se le añadió PBST, y se dejó 2 h a 37°C.

Transcurridas las 2 h se realizaron 3 lavados de 5 min con PBST, y se añadió el anticuerpo secundario, inmunoglobulinas de cabra anti-IgG de conejo (Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Manhathan, EE.UU.), en dilución 1:400 en PBS, dejándolo reaccionar una hora a temperatura ambiente. Después se lavó 5 min con PBS, se dejó (1 min) con el marcador fluorescente, para tinción nuclear, DAPI (Sigma-Aldrich), se lavó dos veces (5 min) con PBS y finalizamos con un último lavado (5 min) con agua destilada.

Eliminada el agua destilada, se retiró el armazón chamber del portaobjetos y se le colocó un cubreobjetos con glicergel, para su observación con un microscopio de fluorescencia

4. Resultados

4.1. Análisis de la expresión de SOD por western-blot.

Para llevar a cabo los estudios de expresión de SOD2 por western-blot, se sembraron 250.000 células por pocillo en una placa de 6 y aquellas a las que le correspondiese se preincubaron con resveratrol (25 μ M) durante 30 min y a continuación 24 h con IL-1 β (5 ng/ml) y TNF- α (10 ng/ml). Se muestra como ejemplo representativo los resultados obtenidos del experimento SRW-103.

En la Tabla 2 se muestran los niveles de proteína obtenidos tras la cuantificación de las proteínas por espectrofotometría. Como se puede observar, todos los valores se encuentran en torno a los 2 μ g/ μ l, indicativo del éxito en el desarrollo del protocolo.

Condiciones	Concentración (mg/ml)
Basal	1,98
IL-1 β 5 ng/ml	2,01
TNF- α 10 ng/ml	2,48
RSV 50 μ M	1,89
IL-1 β 5 ng/ml + RSV 50 μ M	2,00
TNF- α 10 ng/ml + RSV 50 μ M	2,45

Tabla 2. Concentración total de las proteínas en las células del experimento SRW-103, expuestas a diferentes condiciones. La cuantificación de las proteínas totales se realizó empleando un espectrofotómetro NanoDrop1000

Como control de carga, para así normalizar los niveles de expresión de la SOD2, se empleó la expresión proteica de la α -tubulina. Para una mayor eficacia de la técnica, tras la obtención de la membrana y teniendo en cuenta el tamaño de las proteínas de interés, esta se cortó en dos. Empleándose una de ellas para la detección de la SOD2 y la otra para la α -tubulina. La imagen de la SOD2 se obtuvo tras 1 min de exposición y como se puede observar, al extrapolar los diferentes pesos moleculares la señal de la SOD2 se sitúa a la altura de 18 KDa. En cuanto a la segunda membrana la señal se obtuvo tras 10 s de exposición y en correspondencia con el tamaño molecular de la tubulina, a la altura de 50 KDa (Figura 9).

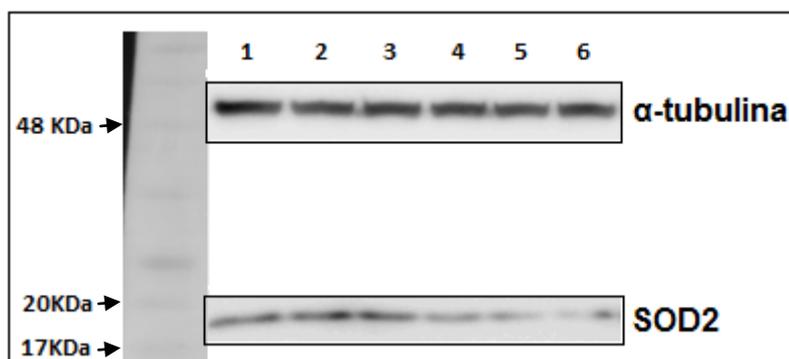


Figura 9. Revelados de la membrana de western-blot para la enzima SOD2 (abajo) y la proteína α -tubulina (arriba). 1-Basal; 2- IL-1 β 5 ng/ml; 3- TNF- α 10 ng/ml; 4- RSV 50 μ M; 5- IL-1 β 5 ng/ml más RSV 50 μ M; 6- TNF- α 10 ng/ml más RSV 50 μ M.

Ya con las imágenes del revelado se procedió a la cuantificación de las bandas y la normalización de los resultados, tanto para la SOD2 (Tabla 3) como para la α -tubulina (Tabla 4). Para poder visualizar mejor los datos, se dividieron los valores normalizados de SOD2 entre los de α -tubulina (Tabla 5) y se representaron gráficamente (ver Figura 10).

SOD		SOD2 Normalizada	
Basal	6.886.569	Basal	1
IL-1 β	10.458.075	IL-1 β	1,518619069
TNF- α	8.676.004	TNF- α	1,259844198
RSV	5.041.933	RSV	0,732140054
IL-1 β + RSV	3.148.326	IL-1 β + RSV	0,45716902
TNF- α + RSV	3.236.740	TNF- α + RSV	0,470007634

Tabla 3. Valores de la enzima SOD2. A la izquierda están los valores absolutos para la enzima SOD2 y a la derecha los valores normalizados en función de las condiciones basales.

Tubulina		Tubulina Normalizada	
Basal	7.417.740	Basal	1
IL-1 β	5.924.205	IL-1 β	0,798653633
TNF- α	4.959.255	TNF- α	0,668566841
RSV	4.678.841	RSV	0,630763683
IL-1 β + RSV	4.017.012	IL-1 β + RSV	0,541541224
TNF- α + RSV	3.965.012	TNF- α + RSV	0,534531003

Tabla 4. Valores de la tubulina. A la izquierda están los valores absolutos para la tubulina y a la derecha los valores normalizados en función de las condiciones basales.

SOD2/Tubulina	
Basal	1
IL-1 β	1,901473938
TNF- α	1,884395278
RSV	1,160720051
IL-1 β + RSV	0,844199849
TNF- α + RSV	0,879289754

Tabla 5. Variaciones de la enzima SOD2 en función de los valores de la proteína tubulina. Dichos valores se han obtenido al dividir los valores normalizados de la SOD2 entre los valores normalizados de la tubulina.

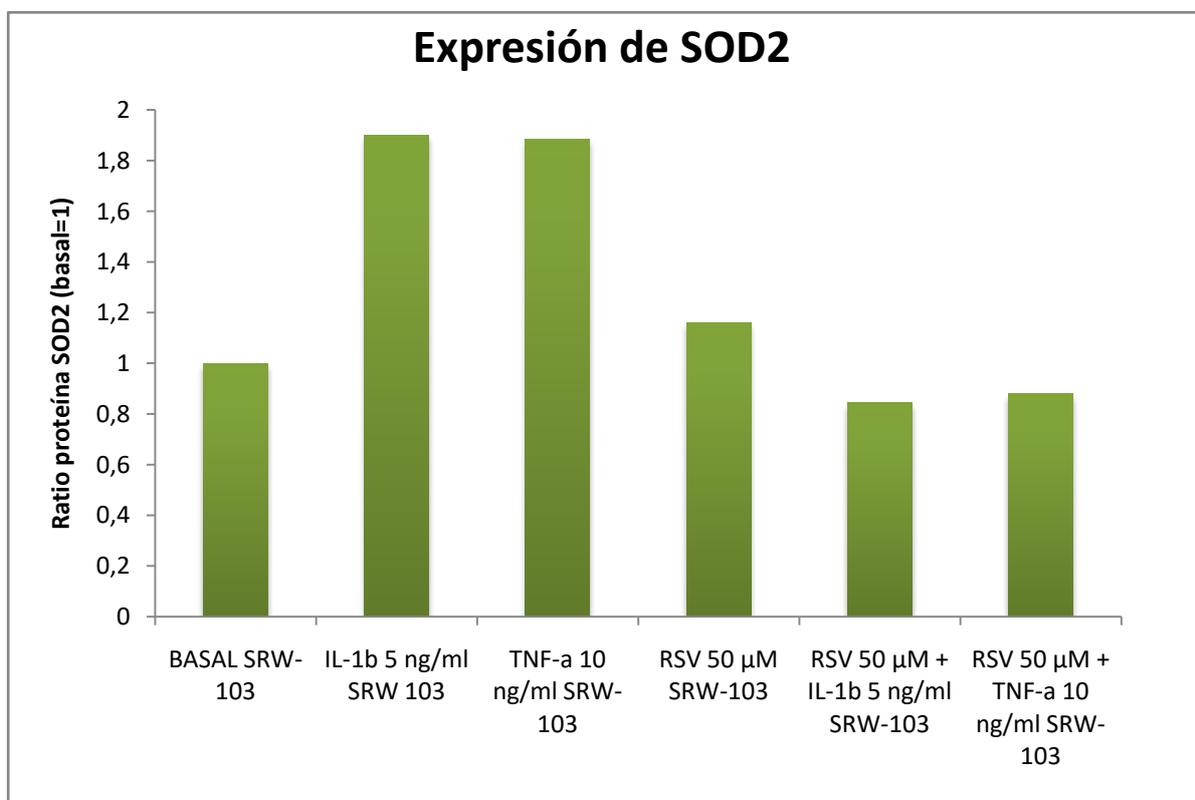


Figura 10. Representación gráfica de las variaciones en los valores de la enzima SOD2 en las células sometidas a diferentes condiciones.

4.2 Análisis de la expresión de SOD2 por inmunofluorescencia

Por otra parte se realizaron los experimentos de la expresión de SOD2 en células adheridas por inmunofluorescencia, tras un tratamiento con las citoquinas durante 24 h en presencia o ausencia de RSV.

Como se puede observar en la Figura 11, la fluorescencia roja representa a intensidad de SOD2, mientras que la fluorescencia azul viene dada por la tinción con DAPI, identificando de esta forma los núcleos celulares. Las imágenes demuestran que la señal de SOD2 representada por la fluorescencia roja es

mucho mayor en las condiciones de IL-1 β (5 ng/ml) y TNF- α (10 ng/ml) y se ve considerablemente reducida al preincubar las células con RSV. Así mismo el RSV induce una pequeña señal de SOD2.

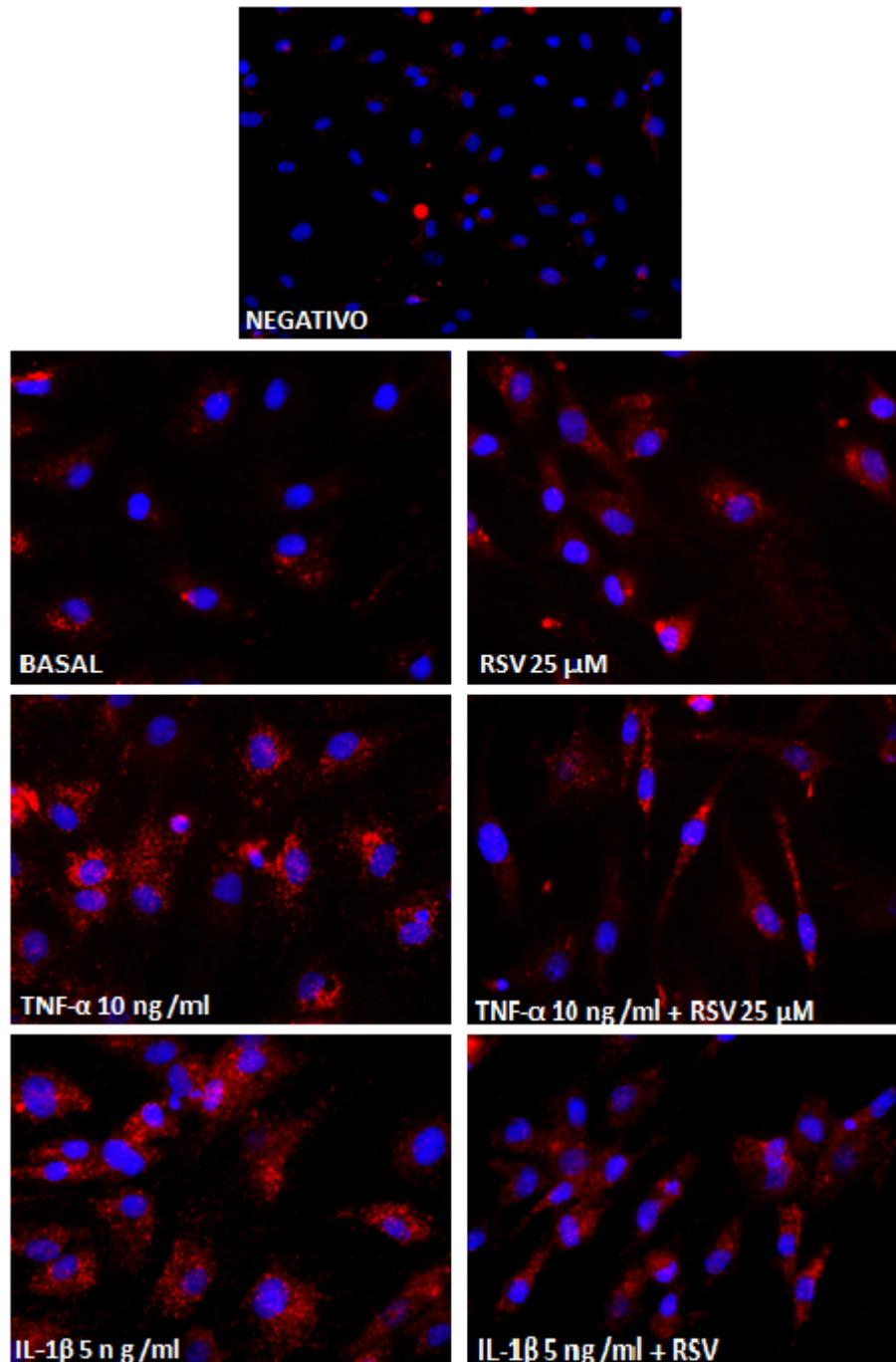


Figura 11. La expresión proteica de SOD2 en sinoviocitos estimulados con IL-1 β y TNF- α durante 24 h en presencia o ausencia de RSV se estudió mediante microscopía de fluorescencia. La fluorescencia roja representa la señal de SOD2 y la azul los núcleos celulares teñidos con DAPI.

5. Discusión

La AR es una enfermedad crónica de la que aún no hay cura conocida, es por esto que los tratamientos para combatirla han de llevarse a cabo durante el resto de la vida del paciente. Esto conlleva gastos elevados además de que muchos de los tratamientos empleados en la AR, tienen efectos secundarios que terminan resultando perjudiciales para los pacientes.

Esto ha llevado a los investigadores a buscar tratamientos naturales, más baratos y con menos efectos adversos, que administrados como co-adyuvantes en combinación con los tratamientos existentes, ayuden a combatir los síntomas o evitar que siga avanzando la enfermedad a fases más tardías. Entre estos compuestos se encuentra el RSV un estilbeno al que se le atribuyen numerosas propiedades beneficiosas, incluidas propiedades antioxidantes y antiinflamatorias (10).

En este estudio se analizaron, *in vitro*, los efectos del RSV sobre la expresión de la enzima SOD2 en sinoviocitos de rata. La SOD2 es una de las enzimas presentes en las células encargadas de reducir los niveles de las ROS en las células, evitando así posibles daños (9). Durante la AR, por efectos de citoquinas proinflamatorias (IL-1 β , TNF- α), se produce un incremento en los niveles de ROS hasta concentraciones que resultan perjudiciales para las células de la articulación, lo que conlleva un incremento de enzimas como la SOD2 para contrarrestar este aumento en las ROS.

Debido al efecto antiinflamatorio y antioxidativo del RSV, cabría esperar que en aquellas células preincubadas con este, tuviesen un descenso en los niveles de la SOD2 debido a una disminución en la concentración de las ROS, al interferir en la vía inflamatoria y oxidativa (5, 15, 16).

En la técnica de western-blot, las células bajo los estímulos de las citoquinas IL-1 β y TNF- α , dos de las principales citoquinas inflamatorias implicadas en la AR, presentan niveles de SOD2 muy superiores al nivel en las células basales. Este incremento es un reflejo del aumento de las ROS promovido por el efecto inflamatorio de las citoquinas. También en la técnica de inmunofluorescencia se aprecia un claro aumento en la cantidad de enzima SOD2 presente en las células expuestas únicamente a las citoquinas.

Sin embargo, aquellas células preincubadas con RSV antes de ser expuestas a las citoquinas, tienen niveles de SOD2 inferiores a aquellas que no fueron preincubadas con el RSV acercándose de nuevo a los niveles basales de las células, e incluso llegando a estar por debajo. Esta disminución en los niveles de la enzima se pueden observar tanto en los resultados obtenidos mediante la técnica del western-blot como en los obtenidos mediante inmunofluorescencia, en la que se puede apreciar una clara disminución de la fluorescencia roja, que se corresponde con la enzima.

También se observó que aplicando RSV como único estímulo para las células, se produce un ligero incremento en los niveles de la SOD2. Este efecto se debe al carácter prooxidativo del RSV, el cual a ciertas concentraciones promueve una pequeña respuesta prooxidativa al inducir la producción de ROS, efecto que se cree que le proporciona su acción antitumoral (17).

Los resultados obtenidos en este estudio corroboran diversos estudios previos en los que se había demostrado el carácter antiinflamatorio y antioxidante del RSV como posible tratamiento contra la AR. Estos estudios han sido realizados tanto *in vitro* en cultivos de sinoviocitos artríticos humanos (1) y sinoviocitos humanos con disfunción mitocondrial (7), como *in vivo*, administrado de forma oral en modelos animales con artritis inducida por antígenos (AIA) (1, 10).

6. Conclusión

El resveratrol tiene un efecto modulador en los niveles de la enzima SOD2, debido a su interferencia en las vías de actuación de las citoquinas proinflamatorias (IL-1 β , TNF- α) y por tanto en la producción de ROS. Se evidencia, en este sentido, el carácter antiinflamatorio y antioxidativo del resveratrol

6.1. Conclusión

O resveratrol ten un efecto modulador nos niveis da enzima SOD2, pola sua interferencia nas vías de actuación das citoquinas proinflamatorias (IL-1 β , TNF- α) y polo tanto na redución de ROS. Se evidenciou neste sentido, o carácter antiinflamatorio e antioxidativo do resveratrol.

6.2. Conclusion

The resveratrol has a modulating effect over the levels of the SOD2 enzyme, because of its interference on the route of action of the proinflammatory cytokines (IL-1 β , TNF- α) and therefore in the production of the ROS. It is evident the anti-inflammatory and anti-oxidative characteristics of the resveratrol.

7. Bibliografía

1. Riveiro-Naveira RR. Resveratrol y artritis reumatoide: efecto protector en un modelo animal de artritis y estudio de sus propiedades antiinflamatorias en sinoviocitos artríticos humanos en cultivo. RUC (Repositorio Universidade Coruña). 2015. Visualizado en el siguiente enlace el 13 de mayo de 2017: <http://hdl.handle.net/2183/15477>.
2. Boissier M, Semerano L, Challal S, Saidenberg-Kermanac'h N, Falgarone G. Rheumatoid arthritis: From autoimmunity to synovitis and joint destruction. *Journal of Autoimmunity*. 2012;39(3):222-228.
3. McInnes IB, Schett G. Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis: targeting cytokines. *Annals of the New York Academy of Science*. 2005;1051(1):716-729.
4. Alam J, Jantan I, Bukhari S. Rheumatoid arthritis: Recent advances on its etiology, role of cytokines and pharmacotherapy. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2017;92:615-633.
5. Švajger U, Jeras M. Anti-inflammatory effects of resveratrol and its potential use in therapy of immune-mediated diseases. *International Reviews of Immunology*. 2012;31(3):202-222.

6. Lawrence T. The nuclear factor NF-kappaB pathway in inflammation. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 2009;1(6):a001651.
7. Valcárcel-Ares MN. Tesis doctoral: Implicaciones patológicas del desequilibrio redox: Estudio del papel de la mitocondria en el proceso inflamatorio del sinoviocito. Estudio de la participación de Nrf2 en la capacidad angiogénica endotelial. RUC (Repositorio Universidade Coruña) 2014.. Visualizado en el siguiente enlace el 20 de mayo de 2017: <http://hdl.handle.net/2183/11895>.
8. Mirshafiey A, Mohsenzadegan M. Review: The role of reactive species in immunopathogenesis of rheumatoid arthritis. *Iranian Journal of Allergy, Asthma and Immunology*. 2008;7(4):195-202.
9. Dhar S, Lynn B, Daosukho C, St. Clair D. Identification of nucleophosmin as an NF-kappaB co-activator for the induction of the human SOD2 gene. *Journal of Biological Chemistry*. 2004;279(27):28209-28219.
10. Riveiro-Naveira R, Valcárcel-Ares M, Almonte-Becerril M, Vaamonde-García C, Loureiro J, Hermida-Carballo L, López-Peláez E, Blanco FJ, López-Armada MJ. Resveratrol lowers synovial hyperplasia, inflammatory markers and oxidative damage in an acute antigen-induced arthritis model. *Rheumatology*. 2016;55(10):1889-1900.
11. Biniecka M, Canavan M, McGarry T, Gao W, McCormick J, Cregan S et al. Dysregulated bioenergetics: a key regulator of joint inflammation. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 2016;75(12):2192-2200.
12. Hitchon CA, El-Gabalawy HS. Oxidation in rheumatoid arthritis. Review: Oxidation in rheumatoid arthritis. *Arthritis Research & Therapy*. 2004;6(6):265-278.
13. Zelko I, Mariani T, Folz R. Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radical Biology and Medicine*. 2002;33(3):337-349.
14. Shakibaei M, Harikumar K, Aggarwal B. Resveratrol addiction: To die or not to die. *Molecular Nutrition & Food Research*. 2009;53(1):115-128.
15. Park S, Ahmad F, Philp A, Baar K, Williams T, Luo H et al. Resveratrol ameliorates aging-related metabolic phenotypes by inhibiting cAMP phosphodiesterases. *Cell*. 2012;148(3):421-433.
16. Vang O, Ahmad N, Baile CA, Baur JA, Brown K, Csiszar A, et al. What is new for an old molecule? Systematic review and recommendations on the use of resveratrol. *PLOS One*. 2011;6(6):e19881.
17. de la Lastra C, Villegas I. Resveratrol as an antioxidant and pro-oxidant agent: mechanisms and clinical implications. *Biochemical Society Transactions*. 2007;35(5):1156-1160.
18. Choy EH, Panayi GS. Cytokine Pathways and Joint Inflammation in Rheumatoid Arthritis. *New England Journal of Medicine*. 2001;344(12):907-916.