

---

# TRABAJO DE FIN DE MÁSTER

---

Máster en Biología Molecular, Celular y Genética

Papel condroprotector de dos polifenoles del aceite de oliva  
virgen extra en la artrosis

Papel condroprotector de dous polifenois do aceite de oliva virxe  
extra na artrose

Chondroprotective role of two polyphenols from extra virgin  
olive oil in osteoarthritis

Autora: Carmen Núñez Carro  
Directora: Dra. M<sup>a</sup> del Carmen de Andrés González  
Codirectora: Dra. Mónica Folgueira Otero

A Coruña, 6 de septiembre de 2021

**NUÑEZ  
CARRO  
CARMEN -  
49473662  
H**

Firmado  
digitalmente  
por NUÑEZ  
CARRO CARMEN  
- 49473662H  
Fecha:  
2021.09.06<sup>®</sup>  
22:40:44 +02'00'



Las Dras. **María del Carmen de Andrés González** y **Mónica Folgueira Otero**, investigadoras del Instituto de Investigación Biomédica de A Coruña (INIBIC) y de la Universidad de A Coruña (UDC) respectivamente,

CERTIFICAN QUE:

La memoria del Trabajo de Fin de Máster titulado “**Papel condroprotector de dos polifenoles del aceite de oliva virgen extra en la artrosis**”, presentada por Carmen Núñez Carro bajo nuestra dirección en el INIBIC fue revisada y está en disposición de ser presentada.

En A Coruña, a 6 de septiembre de 2021

DE ANDRES  
GONZALEZ  
MARIA DEL  
CARMEN -  
28776647J

Firmado digitalmente por DE  
ANDRES GONZALEZ MARIA DEL  
CARMEN - 28776647J  
Nombre de reconocimiento (DN):  
c=ES,  
serialNumber=IDCES-28776647J,  
givenName=MARIA DEL CARMEN,  
sn=DE ANDRES GONZALEZ, cn=DE  
ANDRES GONZALEZ MARIA DEL  
CARMEN - 28776647J  
Fecha: 2021.09.07 11:13:44 +02'00'

Fdo. Dra. María del Carmen de Andrés González

MONICA  
FOLGUE  
IRA

Digitally signed by  
MONICA FOLGUEIRA  
DN: cn=MONICA  
FOLGUEIRA, o, ou,  
email=m.folgueira@  
udc.es, c=ES  
Date: 2021.09.06  
21:54:09 +01'00'

Fdo. Dra. Mónica Folgueira Otero

## **Agradecimientos**

Después de todas las vueltas, idas, venidas, altos y bajos por los que ha pasado este trabajo, necesito dar las gracias a toda la gente que lo ha vivido conmigo. Por toda la ayuda, apoyo y cariño que he recibido en el proceso, quiero agradecer a:

Mis directoras, Dra. M<sup>a</sup> del Carmen de Andrés y Dra. Mónica Folgueira, por acogerme desde el principio, por vuestra dedicación y paciencia; pero sobre todo por transmitirme lo que es la investigación. Desde la admiración, gracias.

Dra. Tamara Hermida, por tus consejos y por enseñarme a dar los primeros pasos en el laboratorio, siempre con una sonrisa.

Tatiana Montoya y Margarita Blanco, por guiarme siempre. Gracias por haber hecho que aprendiera tanto en tan poco tiempo. Los mejores recuerdos que me llevo de aquí llevan vuestra firma.

Noa Goyanes y Anna Saborido, por haberme ayudado tanto en momentos de desesperación y por hacer la histología aún más bonita de lo que ya es. Muchas gracias también a Purificación Filgueira, por haberme proporcionado las secciones de cartílago que han hecho posible este trabajo.

El grupo de la Dra. Beatriz Caramés, Dra. Uxía Nogueira e Irene Lorenzo, por vuestra gran ayuda en mil ocasiones.

Dana Martínez y Ana Bretón, por empezar juntas esta experiencia y por todos los *¿qué tal lo llevas?* del día a día.

Mis compañeros de máster, por hacer de este año tan atípico un año memorable.

## ÍNDICE

Índice de tablas .....	I
Índice de figuras .....	II
Abreviaturas.....	III
Resumen / Resumo / Abstract .....	1
1. Introducción.....	3
1.1. La artrosis: una patología multifactorial.....	3
1.2. Inflamación y degradación de la unidad osteocondral en la OA .....	5
1.3. El papel de la epigenética en la OA.....	6
1.4. El potencial efecto terapéutico de los nutraceuticos del aceite de oliva virgen extra (AOVE) .....	9
2. Objetivos.....	10
3. Material y métodos .....	11
3.1. Estimulación de explantes de cartílago humano con OLE y LA.....	11
3.2. Aislamiento y cultivo de condrocitos .....	13
3.3. Cuantificación de nitritos mediante el método de Griess.....	13
3.4. Pulverizado de los explantes de cartílago.....	13
3.5. Extracción de ARN.....	14
3.6. Retrotranscripción por RT-PCR.....	14
3.7. qPCR con sondas TaqMan .....	15
3.8. Procesamiento histológico.....	16
3.9. Extracción de histonas a partir de condrocitos articulares humanos .....	18
3.10. Western blot.....	18
3.11. Análisis estadístico de los resultados .....	19
4. Resultados.....	20
4.1. Cuantificación de NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> en explantes de cartílago articular humano tras el tratamiento con nutraceuticos.....	20
4.2. Efecto del tratamiento con nutraceuticos en la expresión de genes catabolicos en cartílago articular humano .....	21
4.3. Los nutraceuticos OLE y LA reducen la liberación de GAG en explantes tratados con citoquinas .....	25
4.4. Expresión diferencial de 5-hmC y 5-mC en tejido articular humano y de ratón..	26
4.5. Presencia de la modificación H3K27me3 en condrocitos humanos.....	31
5. Discusión .....	31
6. Conclusiones.....	35
7. Bibliografía.....	35
Anexo I.....	39

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla I.</b> Características estructurales de la unidad osteocondral.....	3
<b>Tabla II.</b> Datos y nomenclatura establecida para cada uno de los pacientes dadores de cartílago .....	11
<b>Tabla III.</b> Genes de referencia <i>ACTB</i> , <i>36B4</i> y <i>GAPDH</i> empleados en las qPCR.....	15
<b>Tabla IV.</b> Condiciones establecidas en las qPCR.....	16

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Esquema general de la articulación de la cadera y organización del cartílago articular.....	4
<b>Figura 2.</b> Modificaciones epigenéticas en el ADN.....	6
<b>Figura 3.</b> Fruto del olivo.....	9
<b>Figura 4.</b> Explantes de cartílago procedentes de cabeza femoral humana.....	12
<b>Figura 5.</b> Efecto de los nutraceuticos OLE y LA sobre la liberación de $\text{NO}_2^-$ .....	20
<b>Figura 6.</b> Estabilidad de los genes de referencia <i>ACTB</i> , <i>36B4</i> y <i>GAPDH</i> .....	22
<b>Figura 7.</b> Expresión de <i>IL1B</i> , <i>IL8</i> y <i>NOS2</i> relativa a <i>36B4</i> en cartílago N.....	23
<b>Figura 8.</b> Expresión de <i>IL1B</i> , <i>IL8</i> y <i>NOS2</i> relativa a <i>36B4</i> en cartílago OA.....	24
<b>Figura 9.</b> Tinción de la MEC con safranina O – verde rápido.....	25
<b>Figura 10.</b> Marcaje del anticuerpo anti-5-hmC en cartílago humano.....	27
<b>Figura 11.</b> Marcaje del anticuerpo anti-5-mC en cartílago humano.....	28
<b>Figura 12.</b> Marcaje de anti-5-hmC y anti-5-mC en modelo animal de ratón.....	30
<b>Figura 13.</b> Presencia de la marca epigenética H3K27me3 en condrocitos humanos.....	31

## ABREVIATURAS

**5-hmC:** 5-hidroximetilcitosina

**5-mC:** 5-metilcitosina

**36B4:** gen de la fosfoproteína ribosomal ácida P0

**A:** adenina

**ACTB:** gen de la  $\beta$ -actina

**ADN:** ácido desoxirribonucleico

**ADNc:** ADN complementario

**AINE:** antiinflamatorios no esteroideos

**ANOVA:** *ANalysis Of VAriance*

**ARN:** ácido ribonucleico

**AOVE:** aceite de oliva virgen extra

**C:** citosina

**CH<sub>3</sub>:** grupo metilo

**CO<sub>2</sub>:** dióxido de carbono

**col2a1:** gen del colágeno tipo II alfa I

**COX:** ciclooxigenasa

**Ct:** *Cycle threshold*

**DMEM:** *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*

**DMM:** desestabilización del menisco medial

**DNMT:** ADN metil transferasa

**EDTA:** ácido etilendiaminotetraacético

**EEM:** error estándar de la media

**G:** guanina

**GAG:** glucosaminoglicanos

**GAPDH:** gen de la enzima gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa

**H3K9me<sub>3</sub>:** histona 3 trimetilada en la lisina 9

**H3K27me<sub>3</sub>:** histona 3 trimetilada en la lisina 27

**HCl:** ácido clorhídrico

**IF:** inmunofluorescencia

**IL-1 $\beta$ :** interleuquina 1 $\beta$

**IL-8:** interleuquina 8



**iNOS:** óxido nítrico sintasa inducible  
**ITS:** insulina-transferrina-selenio  
**K:** lisina  
**LA:** ligustrósido de aglicón  
**LA-A:** LA acetilado  
**MEC:** matriz extracelular  
**MMP:** metaloproteinasas de la MEC  
**N:** normal  
**n:** tamaño muestral  
**NF- $\kappa$ B:** factor nuclear  $\kappa$ B  
**NO:** óxido nítrico  
**NO<sub>2</sub><sup>-</sup>:** nitritos  
**NOS2:** gen de iNOS  
**OA:** artrosis  
**OLE:** oleocantal  
**OSM:** oncostatina M  
**P/S:** penicilina / estreptomina  
***p-HPEA-EA:*** *p-hydroxyphenylethanol-elenolic acid*  
***p-HPEA-EDA:*** *p-hydroxyphenylethanol-elenolic acid*  
**PBS:** tampón fosfato salino  
**PBS-T:** PBS con Triton™ X-100  
**PCR:** reacción en cadena de la polimerasa  
**PM:** peso molecular  
**PVDF:** fluoruro de polivinilideno  
**qPCR:** PCR cuantitativa  
**ROS:** especies reactivas de oxígeno  
**RT-PCR:** PCR con retrotranscriptasa  
**SBE:** *Single Base Extension*  
**SBF:** suero bovino fetal  
**SDS:** dodecilsulfato sódico  
**SDS-PAGE:** electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS  
***sox9:*** gen de *SRY-Box Transcription Factor 9*

**T:** timina

**TBS-T:** solución salina tamponada con Tris y TWEEN® 20

**TET:** *ten-eleven translocation*

**T<sub>m</sub>:** temperatura de *melting*

**TEMED:** tetrametiletilendiamina

**TNF- $\alpha$ :** factor de necrosis tumoral  $\alpha$

**vs.:** *versus*

## RESUMEN

La artrosis (OA) es una patología que afecta al cartílago articular, provocando su degeneración. Recientemente se ha destacado la importancia de los procesos inflamatorios y de la regulación epigenética sobre su progresión, y también se ha asociado una mayor adherencia a la dieta mediterránea con una menor prevalencia de OA. Teniendo en cuenta el carácter crónico y la falta de un tratamiento efectivo contra esta enfermedad, el presente trabajo constituye un estudio del efecto de nutraceuticos extraídos del aceite de oliva virgen extra (oleocantal y ligustrósido de aglicón) sobre tejido normal y artrósico a nivel de expresión génica y de liberación de óxido nítrico, gas de gran relevancia en la patogénesis de la OA. Además, incluye un análisis histológico de la matriz del cartílago, de las marcas epigenéticas 5-hidroximetilcitosina y 5-metilcitosina, y de la modificación H3K27me3; todas ellas implicadas en la OA.

**Palabras clave:** artrosis, nutraceuticos, aceite de oliva virgen extra, oleocantal, ligustrósido de aglicón, inflamación, 5-hidroximetilcitosina, 5-metilcitosina, H3K27me3

## RESUMO

A artrose (OA) é unha patoloxía que afecta á cartilaxe articular, provocando a súa dexeneración. Recentemente destacouse a importancia dos procesos inflamatorios e da regulación epixenética na súa progresión, e tamén asociouse unha maior adherencia á dieta mediterránea cunha menor prevalencia de OA. Tendo en conta o carácter crónico e a falta dun tratamento efectivo contra esta enfermidade, o presente traballo constitúe un estudo do efecto de nutraceuticos extraídos do aceite de oliva virxe extra (oleocantal e ligustrósido de aglicón) sobre tecido normal e artrósico a nivel de expresión xénica e de liberación de óxido nítrico, gas de gran relevancia na patoxénese da OA. Ademais, inclúe unha análise histolóxica da matriz da cartilaxe, das marcas epixenéticas 5-hidroximetilcitosina e 5-metilcitosina, e da modificación H3K27me3; todas elas implicadas na OA.

**Palabras clave:** artrose, nutraceuticos, aceite de oliva virxe extra, oleocantal, ligustrósido de aglicón, inflamación, 5-hidroximetilcitosina, 5-metilcitosina, H3K27me3

## ABSTRACT

Osteoarthritis (OA) is a disease that affects the articular cartilage, causing its degeneration. Recently, the importance of inflammatory processes and epigenetic regulation on its progression has been highlighted, and greater adherence to the Mediterranean diet has also been associated with a lower prevalence of OA. Taking the chronic nature and the lack of an

effective treatment against this disease into account, the present work constitutes a study of the effect of nutraceuticals extracted from extra virgin olive oil (oleocanthal and ligstroside aglycone) on normal and arthritic tissue at the level of gene expression and release of nitric oxide, a gas of great relevance in the OA pathogenesis. In addition, it includes a histological analysis of the cartilage matrix, the epigenetic marks 5-hydroxymethylcytosine and 5-methylcytosine, and the H3K27me3 modification; all of which are implicated in OA.

**Key words:** osteoarthritis, nutraceuticals, extra virgin olive oil, oleocanthal, ligstroside aglycone, inflammation, 5-hydroxymethylcytosine, 5-methylcytosine, H3K27me3

# 1. INTRODUCCIÓN

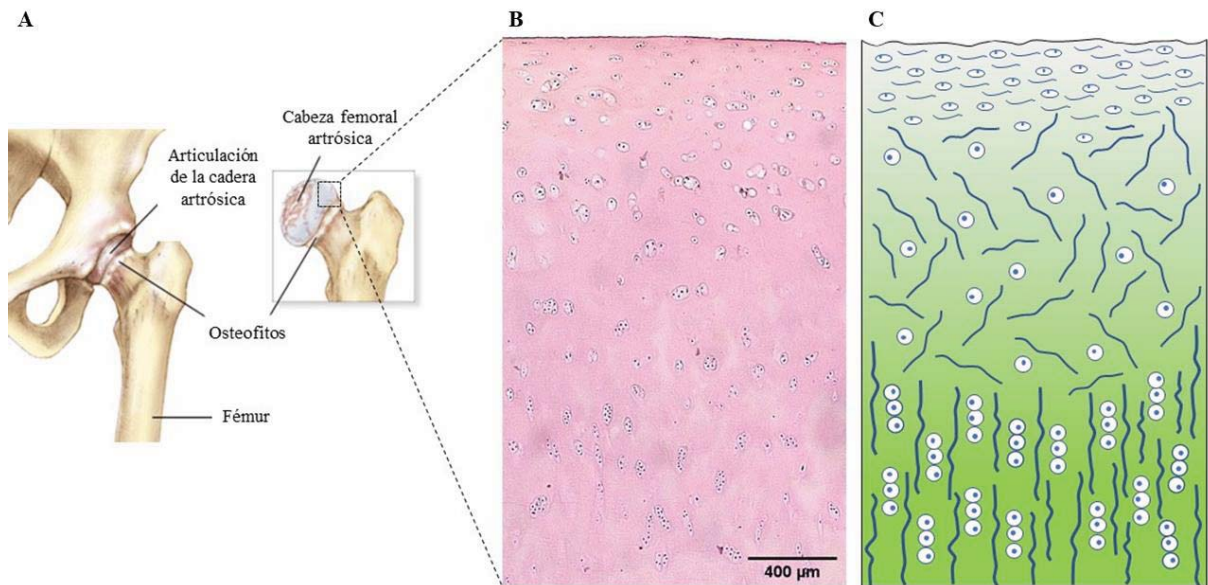
## 1.1. La artrosis: una patología multifactorial

La artrosis u osteoartritis (OA) es una patología multifactorial que afecta a la unidad osteocondral, es decir, al conjunto de cartílago articular, hueso subcondral y cartílago calcificado (1), limitando la movilidad de las articulaciones y la calidad de vida de los pacientes. Entre la amplia sintomatología se incluyen cuadros de dolor, hinchazón y rigidez en las articulaciones afectadas; aunque también pueden darse interrupciones del sueño, fatiga, ansiedad o depresión (2).

El cartílago articular es un tejido conectivo que carece de vasos sanguíneos, vasos linfáticos y nervios. Está constituido por condrocitos, unas células altamente especializadas y distribuidas de forma dispersa a lo largo de una matriz extracelular (MEC), la cual a su vez está compuesta por agua, colágeno, proteoglicanos y diferentes proteínas. El conjunto de todos los elementos proporciona una superficie adecuada para permitir el movimiento de las articulaciones, minimizando la fricción y el rozamiento. Para ello, los componentes se distribuyen en el tejido formando cuatro capas (3), cuyas propiedades distintivas se resumen en la **Tabla I** y se ilustran en la **Figura 1**.

**Tabla I.** Características estructurales de la unidad osteocondral. Fuente: elaboración propia, basada en la información tomada de Sophia Fox et al. (2009) (3).

Zona	Función	MEC			Condrocitos	
		Colágeno		Proteoglicanos	Forma	Abundancia
		Fibras	Disposición	Abundancia		
<b>Superficial</b>	Proteger las capas subyacentes y aportar elasticidad	Compactas	Paralela	Baja	Aplanada	Relativamente alta
<b>Media</b>	Primera línea de defensa contra las fuerzas de compresión	Gruesas	Oblicua	Alta	Esférica	Baja
<b>Profunda</b>	Resistencia contra fuerzas de compresión	Muy gruesas	Perpendicular	Muy alta	Esférica, disposición columnar	Relativamente alta
<b>Calcificada</b>	Anclaje de las fibras de colágeno al hueso	Ancladas al hueso subcondral		-	Hipertrofiados	



**Figura 1.** Esquema general de la articulación de la cadera y organización del cartílago articular. (A) Ilustración de la articulación de la cadera artrósica con detalle de la cabeza femoral artrósica. Fuente: modificado de LeadingMD.com (4). (B) Sección histológica longitudinal de cartílago artrósico teñido con hematoxilina - eosina. (C) Diagrama de la disposición de los diferentes componentes de la MEC. Las fibras de colágeno se representan con líneas azules que difieren en orientación y grosor acorde con la información dada en la Tabla I. El degradado verde hace referencia a la abundancia de proteoglicanos (zona profunda > zona media > zona superficial). Los condrocitos figuran como elipses o esferas blancas nucleadas para ejemplificar su aspecto en cada una de las zonas de la MEC. Fuente: elaboración propia.

Existen múltiples factores de riesgo que incrementan la probabilidad de padecer OA, siendo la edad el que tiene una mayor importancia. Otros aspectos como haber sufrido lesiones articulares, la genética, la actividad física, la etnia, determinadas anomalías congénitas o la dieta son también de gran relevancia en el desarrollo de la OA (5).

Actualmente, la OA es una enfermedad incurable. Los tratamientos existentes están destinados a reducir el dolor articular, pero no están libres de efectos secundarios. Por ejemplo, ciertos antiinflamatorios no esteroideos (AINE) incrementan el riesgo de sufrir afecciones cardiovasculares (6), fibrilación auricular (7) o insuficiencia renal crónica (8). Las intervenciones quirúrgicas a las que se recurre en fases avanzadas de la OA también cuentan con desventajas. Además de su costoso precio (9), no logran eliminar las molestias y las limitaciones de movilidad a largo plazo (2), ya que su vida media es de aproximadamente 10 años (9).

Debido a las particulares características del cartílago, es necesario ampliar el conocimiento acerca de los mecanismos sobre los que opera la OA y así poder encontrar nuevas dianas terapéuticas que permitan atrasar o detener su progresión.

## **1.2. Inflamación y degradación de la unidad osteocondral en la OA**

Cuando la OA afecta a una articulación, los componentes de esta se ven alterados en cantidad y en cuanto a sus propiedades elásticas (10). Esta desorganización estructural y funcional del cartílago hace que este se vea sometido a una progresiva destrucción, que suele ir acompañada del engrosamiento del hueso subcondral, la formación de excrescencias óseas u osteofitos, la inflamación de la membrana sinovial y la degeneración de los ligamentos (11). Además, los procesos inflamatorios que tienen lugar a nivel molecular en el tejido parecen contribuir, en parte, a generar el desequilibrio entre el anabolismo y el catabolismo de los condrocitos (12). Normalmente, esto sucede cuando los condrocitos responden a una lesión producida en la articulación, puesto que son células capaces de detectar estímulos mecánicos (10). Cuando esto ocurre, tiene lugar un incremento de la expresión de ciertas moléculas que guardan estrecha relación con la inmunidad innata (13). Entre ellas destaca, en primer lugar, la interleuquina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), que está sobreexpresada en el cartílago y en el tejido sinovial artrósicos. Esta citoquina tiene la capacidad de aumentar la expresión de metaloproteinasas de la MEC (*matrix metalloproteinases*, MMP) y agreganasas, cuya acción promueve la destrucción de la MEC e inhibe la síntesis de sus componentes mayoritarios, como el colágeno tipo II y los proteoglicanos (14). Otro factor de gran importancia es el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (*tumor necrosis factor  $\alpha$* , TNF  $\alpha$ ), un factor de crecimiento que dirige la cascada de señalización inflamatoria induciendo la producción de moléculas proinflamatorias y catabólicas (15).

La interleuquina 8 (IL-8) es una de las quimioquinas que participan en la respuesta inflamatoria iniciada por la IL-1 $\beta$  y el TNF  $\alpha$ , presente en abundantes cantidades en el cartílago artrósico (15, 16). Entre otros efectos, la IL-8 se ha relacionado con la pérdida de proteoglicanos de la MEC, la producción de MMP, la hipertrofia y la apoptosis de los condrocitos; así como con la entrada de células del sistema inmune en el tejido sinovial (16).

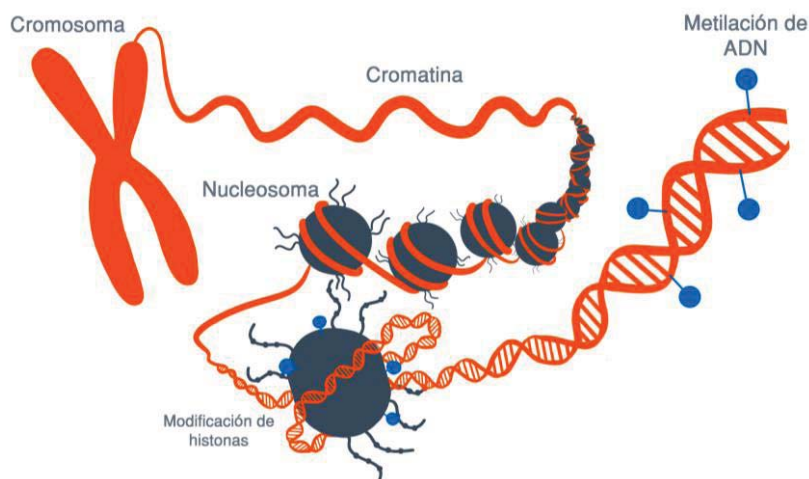
Los elementos inflamatorios anteriores están asociados con el aumento de la producción de óxido nítrico (*nitric oxide*, NO) y especies reactivas de oxígeno (*reactive oxygen species*, ROS) (10). La capacidad de detoxificación es reducida en los condrocitos artrósicos, por lo

que acaban sufriendo estrés oxidativo. Bajo esta condición ocurren eventos de degradación de la membrana plasmática, de los ácidos nucleicos y de los componentes de la MEC. Finalmente, las células de las zonas superficial y media mueren por un proceso que combina apoptosis y autofagia, mientras que en los condrocitos de la zona profunda solo se han documentado procesos apoptóticos (17). Todos los restos del proceso de muerte celular modifican la composición del entorno circundante, haciendo que los condrocitos vecinos también se vean obligados a producir más ROS en respuesta al estrés y entrando en un círculo vicioso que acaba destruyendo el tejido (18).

El estado tisular empeora con la edad, ya que las células entran en un estado de condrosenescencia y los eventos de apoptosis son todavía más frecuentes. Los condrocitos senescentes se caracterizan por su disminuida capacidad de división y de síntesis de moléculas propias de la MEC. Sin embargo, mantienen la producción de moléculas proinflamatorias y enzimas degradativas. De esta manera, los condrocitos intactos no pueden mantener la integridad del cartílago y comienzan a manifestarse los signos típicos de la OA (18).

### 1.3. El papel de la epigenética en la OA

El concepto de epigenética hace referencia a cambios heredables o dinámicos producidos en la expresión génica sin la alteración la secuencia de ácido desoxirribonucleico (ADN). La metilación y desmetilación del ADN, las modificaciones de histonas y las modificaciones por ácido ribonucleico (ARN) no codificante son los principales mecanismos epigenéticos implicados en la regulación de la expresión génica (19). La **Figura 2** es un ejemplo visual que incluye los dos primeros mecanismos.



**Figura 2.** Modificaciones epigenéticas en el ADN. Fuente: página web de Genotipia.com (20).



### a) Metilación y desmetilación del ADN

La metilación y desmetilación del ADN tienen un papel significativo en el desarrollo y en la progresión de la OA (21). La reacción de metilación consiste en la adición de un grupo metilo (CH<sub>3</sub>) a los nucleótidos de citosina (C) situados en posición 5' con respecto a una guanina (G) y está catalizada por ADN metiltransferasas (*DNA methyltransferase*, DNMT), dando lugar así a la modificación 5-metilcitosina (5-mC). El proceso inverso o desmetilación ocurre gracias a las enzimas TET metilcitosina dioxigenasa (*ten-eleven translocation*, TET), que forman 5-hidroximetilcitosina (5-hmC) (14). Este tipo de modificación epigenética es habitual en las C de las secuencias dinucleotídicas CpG o islas CpG, especialmente abundantes en las regiones promotoras de los genes (19). Generalmente, la metilación de estos sitios se asocia con la represión de la transcripción, ya que dificulta el acceso de la maquinaria transcripcional al ADN (22).

Existen evidencias que apoyan el papel de los procesos de metilación como responsables de la síntesis alterada de enzimas degradativas de cartílago. Por ejemplo, la hipometilación de sitios CpG de genes que codifican para MMP y agregasas se traduce en el aumento de expresión de dichas enzimas en cartílago artrósico (23–25). Por otro lado, se ha comprobado que la elevada expresión de la enzima óxido nítrico sintasa inducible (*inducible nitric oxide synthase*, iNOS) en la OA está relacionada con la desmetilación de una región amplificadora (*enhancer*), que es uno de los lugares de unión del factor de transcripción NF-κB (*nuclear factor kappa B*) (26). Del mismo modo, la desmetilación de una región promotora del gen *IL8* provoca un aumento de su expresión en OA (27).

Las enzimas TET, especialmente TET1, contribuyen notablemente a la patogénesis de la OA. De hecho, la total ausencia de *tet1* impide la degeneración de la superficie del cartílago y la formación de osteofitos en un modelo murino de OA, protegiendo así a la articulación de la OA (28). Dado que la actividad de TET1 se ve inhibida en respuesta a factores inflamatorios en condrocitos humanos artrósicos (29), cabría esperar un descenso en los niveles de 5-hmC, pero sin embargo se encuentran aumentados (29). Esta elevada cantidad de 5-hmC en regiones promotoras de genes que codifican MMP y regulan su expresión, produce la sobreexpresión de MMP que degradan el cartílago (30). El descenso de TET1 y el incremento de 5-hmC podrían ser eventos independientes que ocurren en la OA, o bien podría requerirse una exposición prolongada a citoquinas inflamatorias y, por lo tanto, una insuficiencia prolongada de TET1 para que 5-hmC se acumule en las células (30). El alto grado de

conversión de 5-mC a 5-hmC en la OA probablemente no dependa únicamente de la actividad catalítica de las enzimas TET, ya que su homeostasis se encuentra alterada (30).

A partir de los múltiples hallazgos que sugieren una interrelación entre la inflamación y los cambios de metilación del ADN, surge la necesidad de profundizar en el estudio de estos mecanismos dentro de la patogénesis de la OA. Entendiendo su trasfondo molecular podrían encontrarse nuevas dianas terapéuticas y tratamientos efectivos contra ella.

#### **b) Modificaciones de histonas**

La molécula de ADN eucariota se encuentra asociada a histonas (H2A, H2B, H3 y H4), proteínas que permiten el empaquetamiento del material genético. Gracias a esta condensación cromatínica, los genes se expresan de distinta manera debido a que la maquinaria de transcripción será capaz o no de acceder a ellos (19).

Las histonas, al igual que el ADN, pueden sufrir modificaciones. En concreto, la adición de grupos metilo se produce principalmente en residuos de lisina (K) presentes en las histonas y pueden actuar en la activación o en la represión de la expresión génica (19).

El efecto que tengan las modificaciones de histonas sobre el genoma y la célula dependerá también de otros factores como, por ejemplo, la presión hidrostática. La aplicación de dicha fuerza sobre condrocitos puede inducir mecánicamente una reducción de la cantidad de histona 3 trimetilada en la lisina 9 (H3K9me3) y un incremento de histona 3 trimetilada en la lisina 27 (H3K27me3) en regiones de heterocromatina. Estos cambios epigenéticos provocan la reorganización de la cromatina y la expresión atenuada de diversos genes que estimulan la hipertrofia de los condrocitos, consiguiendo así aminorar el estrés replicativo. Además, promueven la entrada de los condrocitos en un estado de quiescencia que podría prevenir su maduración excesiva hasta el estado hipertrofiado que exhiben en fases avanzadas de la OA (31).

Por otra parte, en un modelo animal de ratón la inhibición de la metilación de la H3K9 causa una mayor expresión de MMP (*mmp1* y *mmp13*) y una menor expresión de genes promotores de la diferenciación condrogénica (*sox9* y *col2a1*), apoyando todavía más la función crucial que tienen las modificaciones epigenéticas en la patogénesis de la OA (32).

#### 1.4. El potencial efecto terapéutico de los nutraceuticos del aceite de oliva virgen extra (AOVE)

Un nutraceutico es una sustancia de origen natural o derivada de un alimento que tiene un potencial efecto terapéutico (33). Teniendo en cuenta el carácter crónico de la OA y la ineficacia de los fármacos disponibles sobre la degeneración articular, la inclusión de compuestos nutraceuticos en la dieta es una opción muy atractiva y accesible para prevenir o controlar el progreso de la OA (34).

El aceite de oliva virgen extra (AOVE) es un alimento fundamental en la dieta mediterránea (35), junto con diversos productos vegetales, marinos o lácteos. Este modelo nutricional está muy extendido entre los países que forman la cuenca del Mediterráneo (36) y está asociado a una menor prevalencia de una gran cantidad de patologías, como las enfermedades cardiovasculares (37), algunos tipos de cáncer (38) o la OA (39). En la **Figura 3** se muestra una imagen del olivo (*Olea europaea* L.) y sus frutos, de los cuales se obtiene el AOVE.



**Figura 3.** Fruto del olivo. Fuente: imagen obtenida en Pixabay.com.

Numerosos alimentos incluidos en la dieta mediterránea (como el AOVE) cuentan con polifenoles en su composición, que son considerados compuestos nutraceuticos (40). Esto se debe a su notable actividad antioxidante (41, 42) y antiinflamatoria, que ejerce un efecto condroprotector (43). Asimismo, favorecen la síntesis de ácido hialurónico en el tejido sinovial (44), modulan diferentes vías de señalización (45) y de regulación epigenética (46). Además, el AOVE como parte de una dieta saludable y equilibrada, junto con ejercicio físico habitual, son capaces de incrementar la síntesis de la glicoproteína lubricina en la zona

superficial del cartílago articular y, con esto, se ve favorecida la lubricación de la articulación (47).

Una mayor adherencia a la dieta mediterránea está asociada con una menor prevalencia de algunos tipos de OA (39). Por ello y en base a todos los beneficios mencionados, la suplementación de compuestos nutraceuticos podría ser un complemento ideal a los actuales tratamientos de la OA.

#### **a) Ligustrósido de aglicón y oleocantal**

El ligustrósido de aglicón (LA) o *p*-HPEA-EA (*p*-hydroxyphenylethanol-elenolic acid) es un compuesto nutraceutico producto de la hidrólisis por  $\beta$ -glucosidasas del ligustrósido, un polifenol que se acumula durante la maduración de la oliva (48). El LA y, en particular, su versión acetilada (LA-A), reducen la expresión de mediadores proinflamatorios (iNOS, MMP-13), la liberación de NO y la pérdida de proteoglicanos de la MEC en cartílago artrósico (49). Por ello, los nutraceuticos LA y LA-A parecen tener un prometedor efecto terapéutico contra la progresión de la OA (49).

Por su parte, el oleocantal (OLE) o *p*-HPEA-EDA (*p*-hydroxyphenylethanol-elenolic acid dialdehyde) se sintetiza mediante la descarboxilación del LA (48). Este derivado cuenta con propiedades útiles contra enfermedades articulares, ya que actúa como un antiinflamatorio en el organismo de manera muy similar al ibuprofeno. Esto se debe a que ambos presentan la capacidad de inhibir a las enzimas ciclooxigenasas (COX) implicadas en la producción de prostaglandinas y, por tanto, su efecto inflamatorio (50). Además, se ha comprobado que la inclusión de OLE en la dieta de un modelo murino de artritis reumatoide protege de la inflamación y del estrés oxidativo al reducir considerablemente los niveles de citoquinas proinflamatorias, prostaglandinas, COX y iNOS (51). Por ende, la naturaleza antiinflamatoria del OLE podría reducir el riesgo de desarrollar enfermedades inflamatorias crónicas (52), como la OA.

## **2. OBJETIVOS**

La carencia de tratamientos contra la OA que sean efectivos a largo plazo motiva la búsqueda de opciones más accesibles y menos costosas e invasivas para los pacientes. Los nutraceuticos del AOVE cumplen con estos requisitos y, considerando sus beneficiosas propiedades sobre los procesos inflamatorios y la regulación epigenética, su implementación

en la dieta podría contribuir a la remisión de la degeneración articular característica de la patología artrósica.

Por estas razones, el objetivo general de este estudio es investigar el efecto terapéutico de estos nutraceuticos en la degradación del cartílago que se produce como consecuencia de la OA. Para abordar dicho objetivo, se propusieron los siguientes objetivos específicos:

- 1) Evaluar el efecto de OLE y LA sobre la producción de NO, la expresión génica (*IL1B*, *IL8*, *NOS2*) y la pérdida de glucosaminoglicanos (GAG) en explantes de cartílago articular humano sano y artrósico.
- 2) Estudiar la expresión diferencial de las marcas epigenéticas 5-mC y 5-hmC en cartílago articular humano (sano y artrósico) y murino (*Sham-operated* y DMM).
- 3) Evaluar la viabilidad de una técnica de extracción y *western blot* frente a la modificación H3K27me3 en condrocitos y cartílago articular humano.

### 3. MATERIAL Y MÉTODOS

#### 3.1. Estimulación de explantes de cartílago humano con OLE y LA

En el presente estudio se emplearon explantes de cartílago de cabeza femoral humana pertenecientes a cinco pacientes sometidos a cirugía de reemplazo articular. Tres de ellos padecían OA, mientras que dos no presentaban la patología (**Tabla II**). Debido a la situación epidemiológica causada por la pandemia de la COVID-19, las autoridades sanitarias se han visto obligadas a retrasar las operaciones no urgentes. Por ello, el material biológico utilizado en este trabajo es limitado en cantidad y, además, su llegada al laboratorio no fue simultánea para los cinco pacientes.

**Tabla II.** Datos y nomenclatura establecida para cada uno de los pacientes dadores de cartílago. La letra N hace referencia a la condición de “normal”, es decir, a los pacientes no artrósicos. OA alude a los pacientes enfermos.

Nombre	Edad (años)	Sexo
N1	63	Hombre
N2	89	Hombre
OA1	84	Mujer
OA2	80	Mujer
OA3	93	Hombre

Los explantes se extrajeron a partir de láminas del cartílago femoral mediante el uso de un sacabocados. De esta forma se obtuvieron fragmentos cilíndricos de 4 mm de diámetro, como los que se muestran en la **Figura 4**.



**Figura 4.** Explantes de cartílago procedentes de cabeza femoral humana (4 mm de diámetro). Fuente: fotografía sacada por la Dra. M<sup>a</sup> del Carmen de Andrés González.

Los explantes se mantuvieron en medio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*, Lonza) suplementado con suero bovino fetal (SBF, Gibco) al 10% y un 1% de los antibióticos penicilina / estreptomicina (P/S, Lonza) hasta su llegada al INIBIC (Instituto de Investigación Biomédica de A Coruña), donde se transfirieron a un medio completo conformado por DMEM/F12 (Gibco), SBF al 5%, insulina-transferrina-selenio (ITS, Sigma-Aldrich) al 1%, ácido ascórbico al 0.2% (Sigma-Aldrich) y P/S al 1% hasta realizar el primer estímulo con las siguientes condiciones: (1) Control negativo, (2) IL-1 $\beta$  + oncostatina M (OSM) 5 ng/ml (control positivo), (3) IL-1 $\beta$ +OSM 5 ng/ml + OLE 25  $\mu$ M, (4) IL-1 $\beta$ +OSM 5 ng/ml + OLE 50  $\mu$ M, (5) IL-1 $\beta$ +OSM 5 ng/ml + LA 25  $\mu$ M, (6) IL-1 $\beta$ +OSM 5 ng/ml + LA 50  $\mu$ M. Tanto la IL-1 $\beta$  como la OSM son citoquinas que inducen la reacción inflamatoria.

Según la disponibilidad, se recogieron uno o dos explantes de cada grupo a las 24 horas para extraer ARN, mientras que los restantes se mantuvieron durante 14 días en cultivo. Estos se estimularon con el compuesto correspondiente en días laborables alternos para su posterior procesado histológico. Los sobrenadantes se recogieron en los días 1, 4, 11 y 14 y se almacenaron a -80°C.

### **3.2. Aislamiento y cultivo de condrocitos**

El tejido de N1 no destinado a la obtención de explantes se sometió, en primer lugar, a una digestión mecánica con bisturí y, en segundo lugar, a un tratamiento enzimático con tripsina al 10% (Gibco™ Trypsin-EDTA (0.5%), No Phenol Red, Sigma-Aldrich) durante 10 minutos a 37°C en agitación. Tras retirar la tripsina, se añadió colagenasa de *Clostridium histolyticum* tipo IV (Sigma-Aldrich) 2 mg/ml, dejándola actuar toda la noche a 37°C en agitación fuerte.

Transcurrido el periodo de incubación, se filtró la disolución a través de un filtro de 100 µm para evitar que los fragmentos tisulares no digeridos interfiriesen en el cultivo celular. Después de haber centrifugado la muestra a 1500 rpm durante 10 minutos, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el *pellet* en medio DMEM con SBF al 10% y P/S al 1% para cultivar las células recién aisladas en un frasco de 175 cm<sup>2</sup> a 37°C con un 5% de CO<sub>2</sub>. El medio se fue renovando dos veces por semana hasta alcanzar una densidad celular cercana a la confluencia. En este momento, se empleó la enzima tripsina diluida al 20% para separar los condrocitos adheridos al frasco de cultivo, determinar su cantidad ( $1.125 \times 10^6$  células/ 175 cm<sup>2</sup>) y recogerlos para realizar una extracción de histonas (procedimiento descrito en el apartado 3.9. *Extracción de histonas a partir de condrocitos*).

### **3.3. Cuantificación de nitritos mediante el método de Griess**

Los niveles de NO fueron medidos indirectamente por la reacción de Griess, capaz de detectar la presencia de nitritos (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) mediante una reacción colorimétrica. Para ello, se diseñó una recta de calibrado de 8 puntos por duplicado (1000 µM, 500 µM, 250 µM, 125 µM, 62.5 µM, 31.3 µM, 15.6 µM y 0) utilizando nitrito de sodio 10 mM (Sigma-Aldrich) disuelto en agua destilada. Seguidamente, se distribuyeron 50 µl de sobrenadante por duplicado y se añadieron 50 µl de reactivo de Griess (Enzo), compuesto por naftiletildiamina diclorhidrato al 0.1% en agua destilada y sulfanilamida al 1% en ácido acético al 25-50%. La absorbancia se midió en un lector de placas NanoQuant Infinite M200 (Tecan) a 570 nm.

### **3.4. Pulverizado de los explantes de cartílago**

Debido a la característica dureza del cartílago humano, los explantes destinados a la extracción de ácidos nucleicos han de ser pulverizados en morteros enfriados con nitrógeno líquido. Tras congelar la muestra, se introdujo en el mortero colocada en posición central para

golpearla firmemente con un martillo. El polvo resultante se recogió en tubos de microcentrífuga para continuar con la técnica deseada.

### **3.5. Extracción de ARN**

A los explantes pulverizados se añadió TRI Reagent® (MRC), cuyos componentes principales son el isotiocianato de guanidina, que lisa las células e inhibe la actividad ARNasa, y fenol, que contribuye a la lisis celular. Se agitó brevemente en vórtex y se incubó en una noria durante 10 minutos a temperatura ambiente. Después de este tiempo, se añadió cloroformo (Honeywell), se mezcló el contenido del tubo por inversión y se incubó durante 3 minutos a temperatura ambiente. Se volvieron a invertir los tubos y se centrifugaron a 12500 rpm durante 15 minutos a 4°C.

Tras la centrifugación con cloroformo se formó una fase superior transparente (donde está el ARN) y una fase inferior de color rosa (donde se encuentran las proteínas y el ADN). La fase superior se transfirió a un nuevo tubo, al que se le añadió 2-propanol (Sigma-Aldrich) y glucógeno de *Mytilus edulis* (Sigma-Aldrich) como portador del ARN. Se homogenizó bien y se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente. Después, se centrifugó (12500 rpm, 10 minutos, 4°C) para descartar el sobrenadante. Se dejó secar el *pellet* y se lavó con etanol (Emsure) frío al 75%. Nuevamente, se centrifugó la muestra a 13000 rpm (5 minutos, 4°C), se eliminó el sobrenadante y se dejó secar el *pellet* al aire para que se evaporase el etanol. Por último, se resuspendió el *pellet* resultante en 10 µl de agua libre de nucleasas Ambion™ (Invitrogen) y se mantuvieron los tubos en hielo hasta la cuantificación del ARN en un espectrofotómetro ND-1000 (NanoDrop).

### **3.6. Retrotranscripción por RT-PCR**

A partir del ARN extraído se realizó una retrotranscripción para obtener ADN complementario (ADNc) mediante el uso de SuperScript™ VILO™ MasterMix (Invitrogen). Para ello se añadieron 2 µl del producto a 8.5 µl de muestra y, empleando un termociclador Veriti™ de 96 pocillos (Applied Biosystems), se estableció un programa de RT-PCR (del inglés, *Reverse Transcription - Polymerase Chain Reaction*) conformado por tres incubaciones: 10 minutos a 25°C, 2 horas a 42°C y 5 minutos a 85°C. Las muestras de ADNc se almacenaron a -20°C hasta realizar el siguiente procedimiento.



### 3.7. qPCR con sondas TaqMan

El ADNc obtenido de la retrotranscripción se amplificó por qPCR (del inglés, *quantitative Polymerase Chain Reaction*) en un sistema LightCycler® 480 II (Roche) con el fin de cuantificar la expresión de los genes *IL1B* (Hs01555410\_m1), *IL8* (Hs00174103\_m1) y *NOS2* (Hs01075529\_m1) mediante sondas TaqMan (TaqMan™ Gene Expression Assay, Applied Biosystems). Además, se testaron los genes de la proteína citoesquelética  $\beta$ -actina (*ACTB*), la fosfoproteína ribosomal ácida P0 (*36B4*) y la enzima gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (*GAPDH*) para comprobar la estabilidad de cada uno de ellos y poder usarlos como genes de referencia. En la **Tabla III** figuran las secuencias de los cebadores *Forward* y *Reverse*, así como la sonda empleada para cada uno.

**Tabla III.** Genes de referencia *ACTB*, *36B4* y *GAPDH* empleados en las qPCR. En la tercera columna se indica la secuencia de bases nitrogenadas. La cuarta columna recoge los valores de temperatura de fusión del ADN (temperatura de *melting*, Tm), en la que el 50% del ácido nucleico se encuentra en forma monocatenaria. La quinta columna hace referencia al porcentaje de G y C de cada secuencia. En la sexta columna, Nt representa el número de nucleótidos totales en cada secuencia. Las columnas restantes muestran la cantidad de adenina (A), timina (T), citosina (C) y guanina (G) en cada caso particular.

		Secuencia	Tm	GC%	Nt	A	T	C	G
<i>ACTB</i>	<i>Forward</i>	GGCATCCTCACCTGAAGTA	64.4	55	20	5	4	7	4
	<i>Reverse</i>	AGGTGTGGTGCCAGATTTTC	64.3	50	20	3	7	3	7
	Sonda	ATCGAGCACGGCATCGTCACCAACT	76.9	56	25	7	4	9	5
<i>36B4</i>	<i>Forward</i>	CCACGCTGCTGAACATGC	67.4	61.1	18	4	3	7	4
	<i>Reverse</i>	TCGAACACCTGCTGGATGAC	66.8	55	20	5	4	6	5
	Sonda	AACATCTCCCCCTTCTCCTTTGGGCT	74.3	53.8	26	3	9	11	3
<i>GAPDH</i>	<i>Forward</i>	CCAGGTGGTCTCCTCTGACTTC	66.7	59.1	22	2	7	8	5
	<i>Reverse</i>	TCATACCAGGAAATGAGCTTGACA	66.8	41.7	24	9	5	5	5
	Sonda	ACACCCACTCCTCCACCTTGACGCT	75.8	57.7	26	5	6	13	2

La mezcla para cada reacción se preparó de tal forma que contuviese 0.50  $\mu$ l de la sonda TaqMan de interés, 0.02  $\mu$ l de la sonda del gen de referencia correspondiente (50  $\mu$ M), 0.20  $\mu$ l de la solución de cebadores *Forward* + *Reverse* (10  $\mu$ M), 5  $\mu$ l de TaqMan™ Fast Advanced Master Mix (Applied Biosystems), 3.28  $\mu$ l de agua libre de nucleasas y 1  $\mu$ l de ADNc. Las condiciones programadas en el termociclador se muestran en la **Tabla IV**.

**Tabla IV.** Condiciones establecidas en las qPCR. UNG son las siglas de uracil-DNA glicosilasa.

<b>Etapa</b>	<b>N° ciclos</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Tiempo</b>
Incubación de UNG	1	50	2 minutos
Activación de la polimerasa	1	95	20 segundos
Amplificación	50	95	0.3 segundos
		60	0.3 segundos
Enfriamiento	1	40	20 segundos

### **3.8. Procesamiento histológico**

Los explantes de cartílago recogidos tras 14 días de tratamiento con los nutraceuticos se lavaron con tampón fosfato salino (*phosphate-buffered saline*, PBS, Oxoid) y se fijaron por inmersión en paraformaldehído al 4% (Sigma-Aldrich) durante 24 horas a 4°C. Posteriormente se cortaron por la mitad con un bisturí y se mantuvieron en etanol al 70% durante 24 horas antes de someterlos a un proceso de inclusión automatizada en parafina utilizando un procesador de tejidos STP 120 (Myr).

Tras confeccionar los bloques de parafina en un equipo Leica EG1150 H, se obtuvieron secciones consecutivas de 4 µm de grosor con un micrótopo de rotación Leica RM2155. Estas se recogieron en portaobjetos SuperFrost® Plus (Thermo Fisher Scientific) para incrementar la adherencia del tejido a la superficie.

Tras haberlos dejado reposar al menos 24 horas a 37°C, se procedió a una desparafinación inicial a 60°C durante 15-30 minutos. Para la completa eliminación de la parafina se sumergieron las muestras en un baño de xilol (ITW Reagents) durante 10 minutos. Posteriormente, se hidrataron en baños de etanol (ITW Reagents) de concentración decreciente (100% y 96%, 10 minutos cada uno) y un baño final de agua corriente o destilada (solo en el caso de las muestras destinadas a técnicas de inmunofluorescencia).

#### **a) Tinción safranina O - verde rápido**

Los cortes se sumergieron en un baño de safranina O (Alfa Aesar) durante 30 minutos para la tinción de los GAG de la MEC. Se aclararon en agua destilada y se tiñeron con el colorante verde rápido (Fluka) mediante inmersiones breves. Inmediatamente después, las muestras se deshidrataron en dos baños consecutivos de etanol al 100% y se introdujeron en un baño de xilol. Finalmente, se montaron las preparaciones con DPX (Sigma-Aldrich) y se observaron en un microscopio Olympus BX61 acoplado a

una cámara digital Olympus DP71 (INIBIC). Todas se procesaron con el programa ImageJ (versión 1.53e).

#### **b) Inmunofluorescencia (IF)**

El tejido hidratado se lavó, en primer lugar, con tampón fosfato salino con Triton™ X-100 al 0.5% (PBS-T; ITW Reagents). El detergente se utilizó con el fin de facilitar la entrada de los anticuerpos primarios en el núcleo de las células, puesto que se unen a marcas epigenéticas presentes en la cromatina. Por este motivo, también fue necesario incluir un paso de desnaturalización del ADN con HCl 2N (ITW Reagents) (15 minutos).

Tras un lavado con PBS-T (10 minutos), se bloqueó la acción de la peroxidasa endógena con el kit Dako REAL EnVision Detection System Peroxidase/DAB+, Rabbit/Mouse (Dako) (10 minutos). Se lavaron las muestras con PBS-T antes de incubarlas con los siguientes anticuerpos primarios: anticuerpo anti-5-hidroximetilcitosina (5-hmC) de conejo (39769, Active Motif) y anticuerpo anti-5-metilcitosina (5-mC) de conejo (61255, Active Motif). Para ambos anticuerpos se empleó una dilución 1:500. La incubación se prolongó toda la noche a 4°C.

Al día siguiente se lavó el tejido tres veces (10 minutos) con PBS-T. Se incubaron las secciones con el anticuerpo secundario cabra anti-ratón IgG (H+L) Alexa Fluor 488 (A-11034, Invitrogen) (1:500) durante 1 hora a temperatura ambiente y en oscuridad. Después de otros tres lavados consecutivos con PBS-T se montaron las preparaciones con Glycergel® (Dako) para su observación al microscopio.

Las fotografías de N1 fueron tomadas en un microscopio Nikon Eclipse 90i (Laboratorio Neurover, Universidad de A Coruña) acoplado a una cámara digital Olympus, DP71, mientras que las fotos de OA1 se hicieron en un microscopio Olympus BX61 con el mismo modelo de cámara (INIBIC). Todas se procesaron en ImageJ (versión 1.53e).

Dado que de cara al futuro se realizarán estudios con los nutraceuticos OLE y LA en un modelo murino, se analizó el funcionamiento de los anticuerpos anti-5-hmC y anti-5-mC en secciones longitudinales de rodilla proporcionadas por la Dra. Beatriz Caramés Pérez, empleando la misma técnica de IF. Los cortes pertenecían a ratones sometidos a cirugía placebo (*Sham-operated*) y a ratones que han sufrido una operación de desestabilización del menisco medial (DMM), que induce la degradación de la articulación produciendo los cambios característicos de la OA. Las

fotografías correspondientes a estas muestras fueron tomadas en un microscopio Olympus BX61 con cámara Olympus DP71 (INIBIC). Todas se procesaron en ImageJ (versión 1.53e).

### **3.9. Extracción de histonas a partir de condrocitos articulares humanos**

Los condrocitos cultivados se recogieron y se lavaron dos veces con suero salino (cloruro de sodio Mein 0.9%, Fresenius Kabi) y se centrifugaron (3500 rpm, 5 minutos, 4°C). Se añadió tampón de lisis frío compuesto por Tris 10 mM pH 6.5, bisulfito de sodio 50 mM (Sigma-Aldrich), cloruro de magnesio 10 mM (Sigma-Aldrich), sacarosa 8.6% (Sigma-Aldrich) y Triton™ X-100 al 1% (Sigma-Aldrich) para incubar las muestras en hielo durante 15 minutos. De nuevo, se centrifugaron (3500 rpm, 10 minutos, 4°C) para descartar el sobrenadante. Se repitió el lavado con tampón de lisis y la centrifugación antes de proceder a un lavado del *pellet* con Tris-EDTA frío, constituido por Tris 10 mM pH 7.4 y ácido etilendiaminotetraacético 13 mM (EDTA, Sigma-Aldrich). Se centrifugaron (3500 rpm, 10 minutos, 4°C) y el precipitado (que contiene el componente nuclear de las células) se resuspendió en agua libre de nucleasas. A esto se adicionó ácido sulfúrico 0.4 M (ITW Reagents), se agitó en vórtex y se incubó 1 hora en hielo.

A continuación, se centrifugaron las muestras (15000 rpm, 1 hora, 4°C) para obtener un sobrenadante en el que se encuentran las histonas. Estas proteínas nucleares se hicieron precipitar con acetona durante toda la noche a -20°C. Con otra centrifugación (15000 rpm, 10 minutos, 4°C) las histonas quedaron en el *pellet*, que se dejó secar al aire durante 15 minutos. La técnica concluyó con la resuspensión del precipitado en agua destilada para determinar la concentración de proteína con Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific), basado en una reacción colorimétrica que permitió la medida de absorbancia a 570 nm en el espectrofotómetro NanoQuant Infinite M200. En base a la cuantificación, se alicuotaron las muestras con 2-mercaptoetanol (Sigma-Aldrich) y tampón Laemmli (Bio-Rad) y se mantuvieron a -20°C hasta realizar el *western blot*.

### **3.10. Western blot**

Las proteínas se desnaturalizaron a 100°C en un termobloque (Thermoblock TB1, Biometra) durante 10 minutos para separarlas según su peso molecular en una electroforesis en gel de poliacrilamida al 15% con dodecilsulfato sódico (*Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*, SDS-PAGE), que emplea un gel concentrador superior y

un gel separador inferior con la siguiente composición: agua destilada, Tris pH 6.8 o Tris pH 8.8 (respectivamente), acrilamida/bisacrilamida al 30% (Sigma-Aldrich), SDS al 10% (Sigma-Aldrich), persulfato de amonio al 10% (Sigma-Aldrich) y tetrametiletilendiamina (TEMED, Sigma-Aldrich). Para el proceso electroforético se utilizó tampón de electroforesis al 10% compuesto por Trizma® Base (Sigma-Aldrich), glicina (Sigma-Aldrich), SDS al 20% y agua destilada. Su duración fue 1 hora 30 minutos, estableciéndose un voltaje de 70 V durante los primeros 20 minutos y 100 V para el tiempo restante.

El siguiente paso consistió en transferir el gel a una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF, Bio-Rad) previamente activada con metanol (VWR), agua destilada y tampón de transferencia (tampón de electroforesis, etanol al 100% y agua destilada). La transferencia se mantuvo en tampón de transferencia durante 1 hora y 30 minutos a 100 V.

La membrana se bloqueó con caseína al 10% (Sigma-Aldrich) (1 hora en agitación) para incubarla con el anticuerpo primario anti-trimetilhistona H3 (Lys27) de conejo (C36B11, Cell Signaling Technology) diluido en caseína al 10% en proporción 1:1000 durante toda la noche a 4°C en noria. Tras tres lavados con solución salina tamponada con Tris y TWEEN® 20 (*tris-buffered saline with TWEEN-20*, TBS-T), se incubó el anticuerpo secundario (ECL™) burro anti- IgG conejo conjugado con peroxidasa de rábano (VWR) diluido en caseína al 10% (1:2000, 1 hora en agitación). Se repitieron los lavados con TBS-T al 10% antes de proceder a la detección proteica con el sustrato quimioluminiscente Immobilon Classico Western HRP (Merck Millipore) en el equipo Amersham Imager 600. La imagen de la membrana se sacó en el equipo Amersham Imager 600 y se procesó con ImageJ (versión 1.53e).

### **3.11. Análisis estadístico de los resultados**

El estudio sobre la estabilidad de los genes de referencia *ACTB*, *36B4* y *GAPDH* se realizó con ayuda del algoritmo geNorm, integrado programa qbase+ (versión 3.1), atendiendo al valor más bajo del parámetro M.

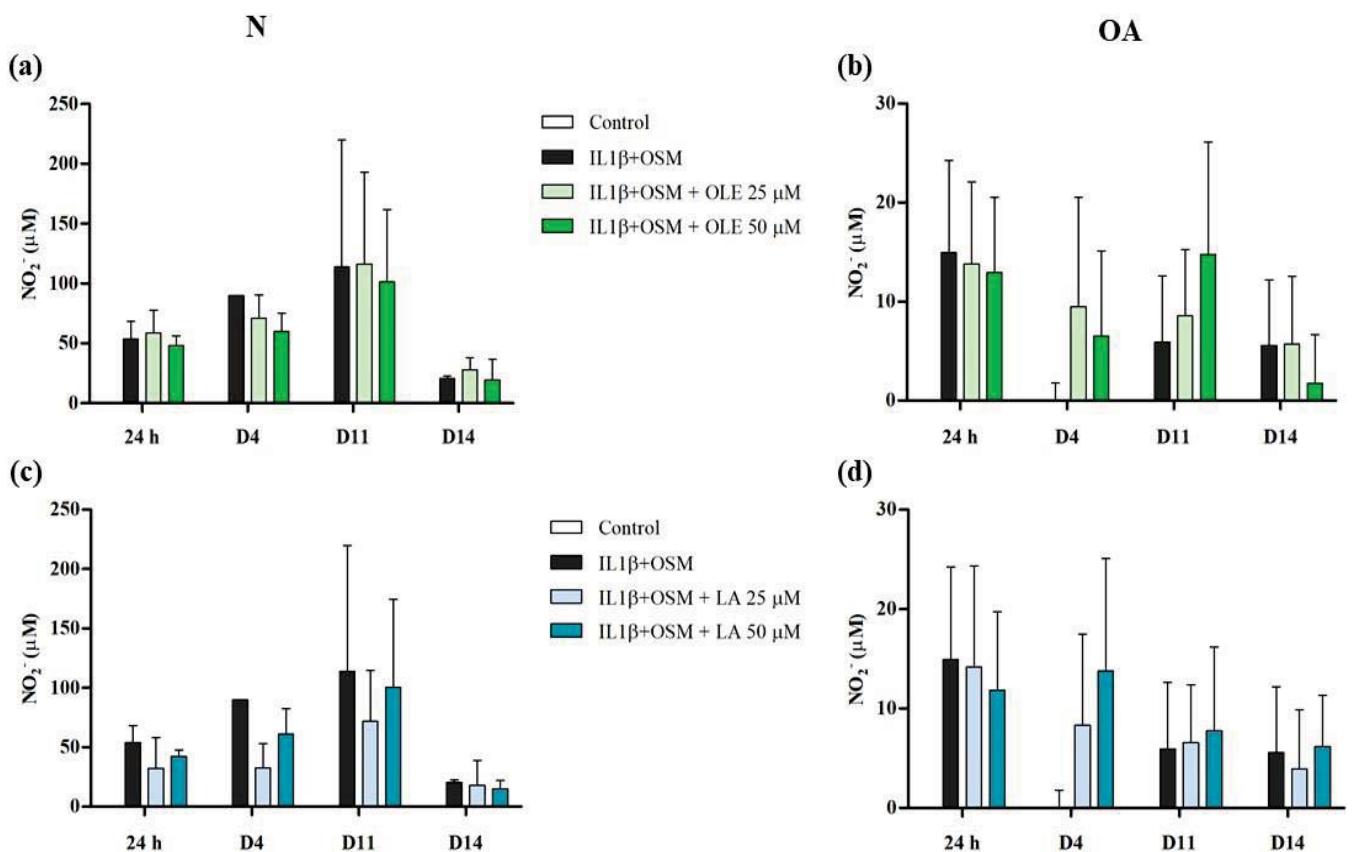
Para el análisis estadístico de los resultados de liberación de NO y expresión génica se utilizó el programa GraphPad Prism (versión 5.01). Los datos aparecen representados en histogramas donde cada barra junto con su barra de error representa el promedio de los valores medidos  $\pm$  error estándar de la media (EEM). Se realizaron análisis de varianza (*ANalysis Of VAriance*, ANOVA) de una vía con prueba post-hoc de Tukey para comparar

todos los grupos entre sí. Las comparaciones de medias se analizaron mediante la prueba U de Mann-Whitney y la prueba de los rangos con signo de Wilcoxon.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Cuantificación de $\text{NO}_2^-$ en explantes de cartílago articular humano tras el tratamiento con nutraceuticos

Los niveles de  $\text{NO}_2^-$  se cuantificaron en los sobrenadantes recogidos en los días 1 (a las 24 h), 4 (D4), 11 (D11) y 14 (D14) de los explantes de cartílago expuestos a los distintos tratamientos, a excepción de la muestra de N2 correspondiente al tratamiento IL-1 $\beta$ +OSM del D4, que fue descartada accidentalmente. Las representaciones gráficas de los resultados de la cuantificación se incluyen en la **Figura 5**.



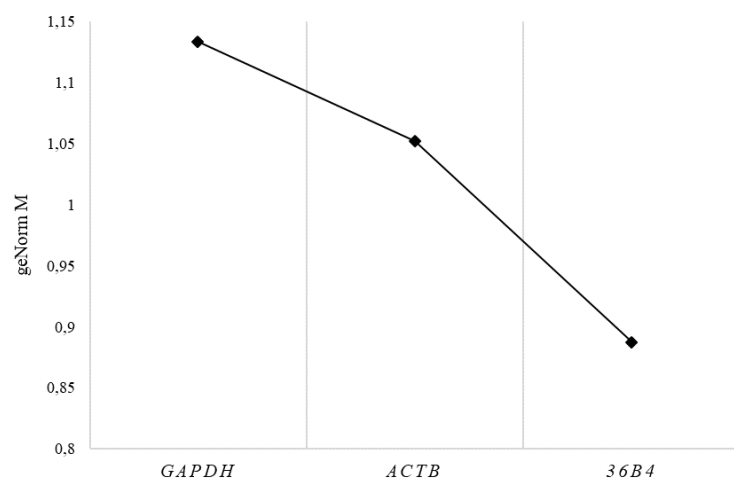
**Figura 5.** Efecto de los nutraceuticos OLE y LA sobre la liberación de  $\text{NO}_2^-$ . Las gráficas (a) y (c) corresponden a los pacientes N, mientras que (b) y (d) pertenecen a los pacientes OA. (a) y (b) recogen los datos del tratamiento con OLE. (c) y (d) muestran el resultado del tratamiento con LA. Se representa el promedio de los valores de concentración de  $\text{NO}_2^- \pm \text{EEM}$ .

En general, puede apreciarse una reducción de los niveles de  $\text{NO}_2^-$  con la concentración más alta de OLE (50  $\mu\text{M}$ ) y con la más baja de LA (25  $\mu\text{M}$ ), aunque con un tamaño muestral tan pequeño ( $n = 2$  en N,  $n = 3$  en OA) no se ha podido confirmar que realmente existan diferencias significativas.

Transcurridas 24 h se observa una reducción en las concentraciones de  $\text{NO}_2^-$  bajo el efecto de LA 25  $\mu\text{M}$  en los sujetos N ( $32.33 \pm 25.85$  vs.  $53.88 \pm 14.38$ ) (**Fig. 5c**) y con LA 50  $\mu\text{M}$  en los OA ( $11.84 \pm 7.91$  vs.  $14.97 \pm 9.28$ ) (**Fig. 5d**). El efecto del OLE no es tan marcado en las primeras horas, aunque también ocasiona un leve descenso a concentración 50  $\mu\text{M}$  tanto en N ( $48.22 \pm 7.95$  vs.  $53.88 \pm 14.38$ ) (**Fig. 5a**) como en OA ( $12.94 \pm 7.60$  vs.  $14.97 \pm 9.28$ ) (**Fig. 5b**). A los 4 días de estimulación, los individuos N muestran niveles de  $\text{NO}_2^-$  reducidos, en mayor medida, con OLE 50  $\mu\text{M}$  ( $59.83 \pm 15.53$  vs.  $89.80 \pm 0.00$ ) (**Fig. 5a**) y LA 25  $\mu\text{M}$  ( $32.84 \pm 20.13$  vs.  $89.90 \pm 0.00$ ) (**Fig. 5c**). Sin embargo, en el caso de los OA tiene lugar un notorio incremento con ambos compuestos (**Fig. 5b, 5d**). En el D11 tiene lugar un aumento generalizado de la cantidad de  $\text{NO}_2^-$  en los pacientes OA con respecto al control positivo (**Fig. 5b, 5d**). En los N se reduce ligeramente con OLE 50  $\mu\text{M}$  ( $101.40 \pm 60.45$  vs.  $113.80 \pm 106.20$ ) (**Fig. 5a**) y bastante con LA 25  $\mu\text{M}$  ( $71.84 \pm 42.66$  vs.  $113.80 \pm 106.20$ ) (**Fig. 5c**). Tras 14 días, los niveles de  $\text{NO}_2^-$  son muy similares a los del control positivo en donantes N (**Fig. 5a, 5c**). En cambio, los OA muestran un moderado descenso con OLE 50  $\mu\text{M}$  ( $1.76 \pm 4.90$  vs.  $5.58 \pm 6.60$ ) (**Fig. 5b**) y LA 25  $\mu\text{M}$  ( $6.18 \pm 5.17$  vs.  $5.58 \pm 6.60$ ) (**Fig. 5d**).

#### **4.2. Efecto del tratamiento con nutraceuticos en la expresión de genes catabolicos en cartilago articular humano**

La expresión de los genes *IL1B*, *IL8* y *NOS2* se cuantificó a las 24 h mediante qPCR. Los valores de Ct (*Cycle threshold*) se relativizaron a la expresión del gen de referencia con el valor de M más bajo, es decir, el más estable de los tres testados, que resultó ser el gen ribosómico *36B4* (**Figura 6**).



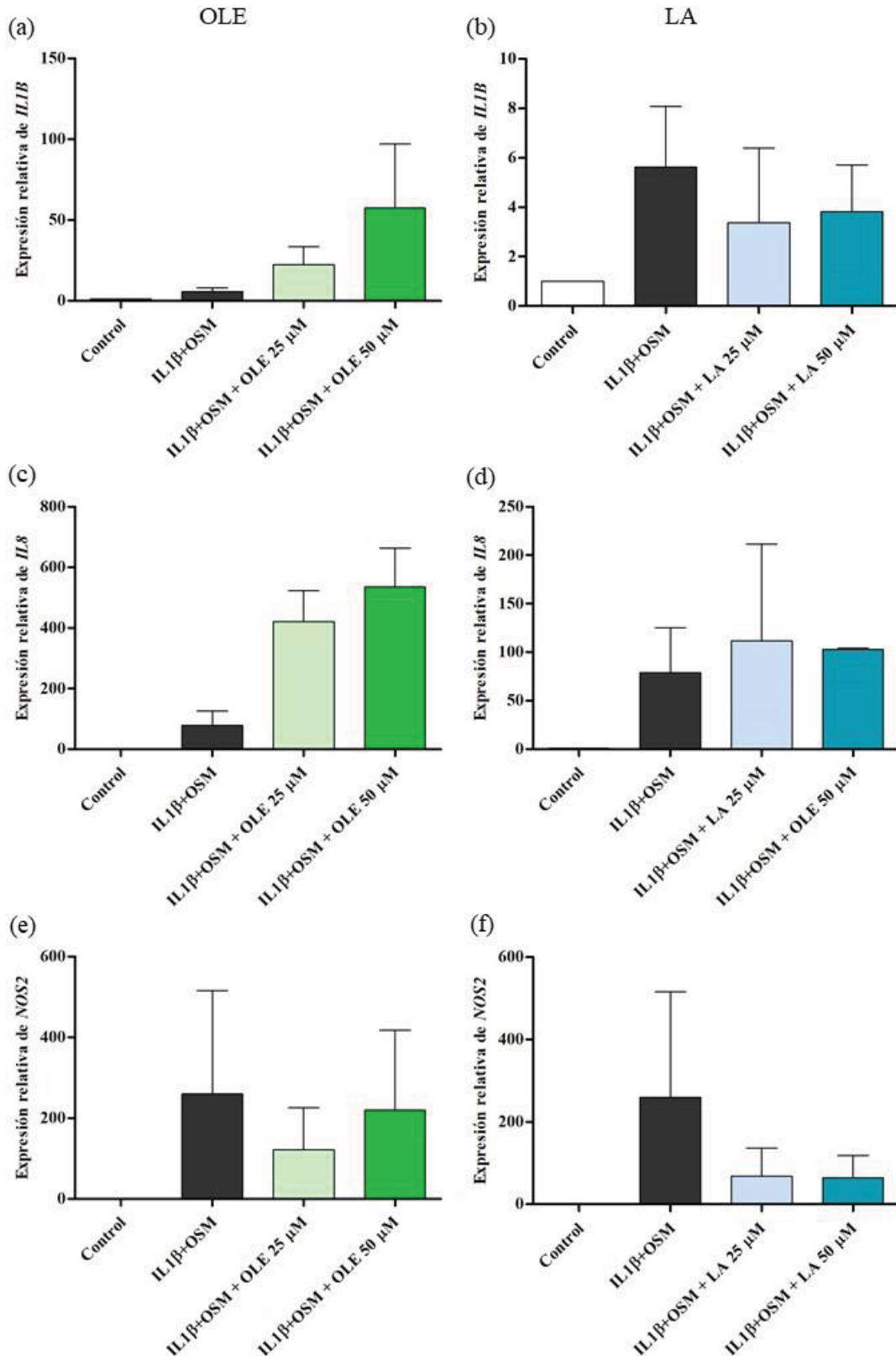
**Figura 6.** Estabilidad de los genes de referencia *ACTB*, *36B4* y *GAPDH*. El parámetro M indica la estabilidad de la expresión de los genes seleccionados.

Los histogramas que ilustran la respuesta de la expresión génica ante la exposición a los nutraceuticos del AOVE se hallan en las **Figuras 7 y 8**. El nivel de expresión de *IL1B* se reduce especialmente con LA 25  $\mu\text{M}$  en pacientes N ( $3.37 \pm 3.02$  vs.  $5.62 \pm 2.46$ ) (**Fig. 7b**). No ocurre lo mismo con el OLE en donantes N, ya que provoca un visible aumento de *IL1B* (**Fig. 7a**). Sin embargo, OLE 50  $\mu\text{M}$  sí que consigue disminuir la expresión en los OA ( $2.56 \pm 2.28$  vs.  $3.87 \pm 1.49$ ) (**Fig. 8a**). La expresión de *IL1B* no se ve particularmente alterada con el LA (**Fig. 8b**).

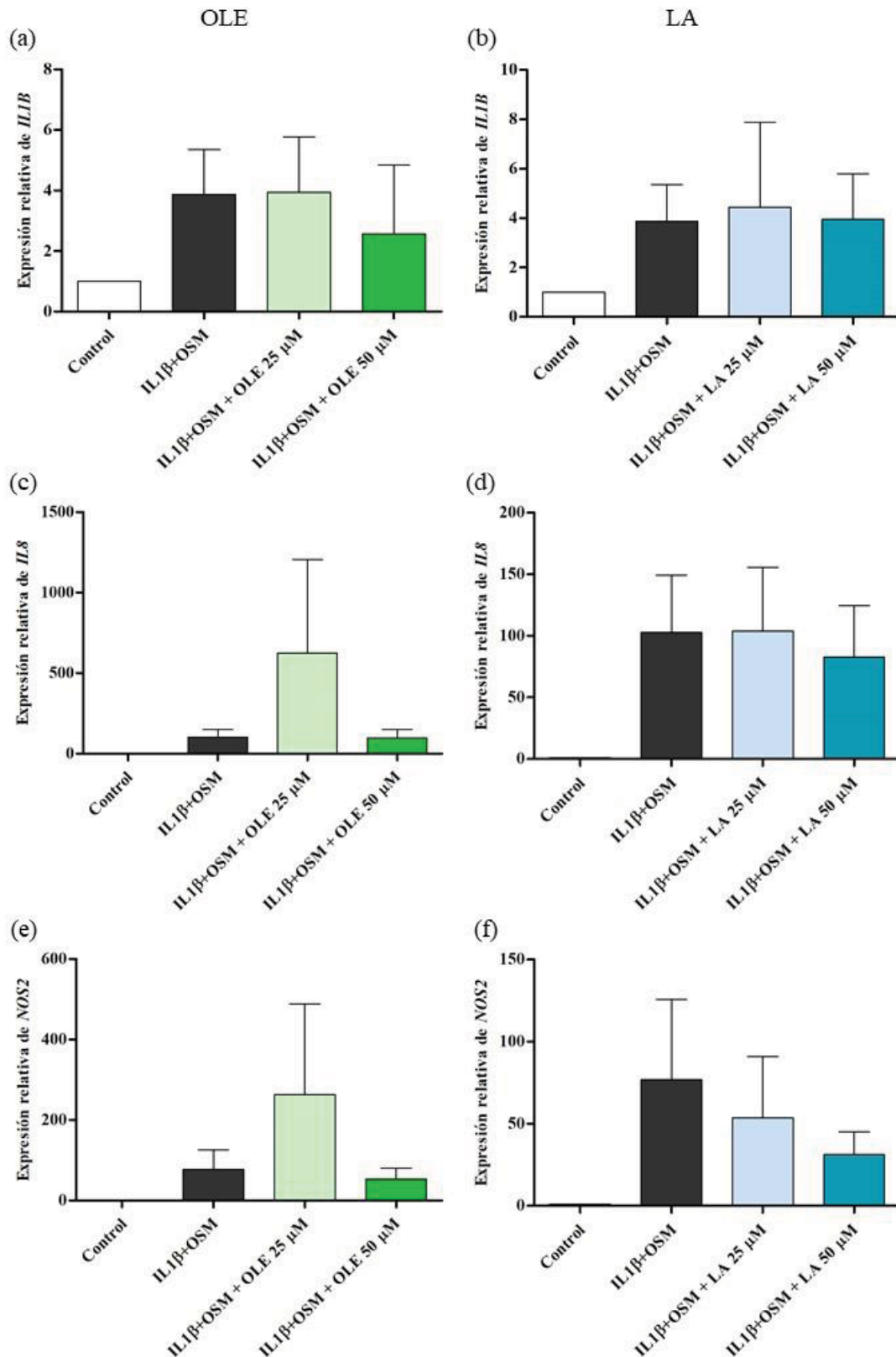
Por otra parte, la cantidad de *IL8* no se ve demasiado afectada con los tratamientos de LA, llegando a ascender en los donantes N (**Fig. 7d**). Su nivel de expresión solo desciende ligeramente con LA 50  $\mu\text{M}$  en OA ( $82.79 \pm 41.69$  vs.  $102.70 \pm 46.64$ ) (**Fig. 8d**). El OLE no es capaz de atenuar la expresión de *IL8* ni en N (**Fig. 7c**) ni en OA (**Fig. 8c**).

El gen *NOS2* experimenta moderados descensos en su expresión con LA 25  $\mu\text{M}$  ( $68.48 \pm 67.29$  vs.  $259.80 \pm 255.80$ ) y LA 50  $\mu\text{M}$  ( $64.02 \pm 54.17$  vs.  $259.80 \pm 255.80$ ) en N (**Fig. 7f**). Lo mismo sucede con LA 25  $\mu\text{M}$  ( $53.54 \pm 37.31$  vs.  $76.86 \pm 48.79$ ) y LA 50  $\mu\text{M}$  ( $31.15 \pm 14.06$  vs.  $76.86 \pm 48.79$ ) en OA (**Fig. 8f**). Por su parte, el OLE 25  $\mu\text{M}$  consigue disminuir el nivel de *NOS2* en individuos N ( $219.30 \pm 198.10$  vs.  $259.80 \pm 255.80$ ) (**Fig. 7e**), al contrario de lo que ocurre en los pacientes OA. En este caso, solo se consigue una sutil reducción de la expresión de *NOS2* con OLE 50  $\mu\text{M}$  ( $53.37 \pm 26.86$  vs.  $76.86 \pm 48.79$ ) (**Fig. 8e**).





**Figura 7.** Expresión de *IL1B*, *IL8* y *NOS2* relativa a *36B4* en cartílago N. Los histogramas muestran la expresión relativa de *IL1B* en tejido tratado con OLE (a) y LA (b), la expresión relativa de *IL8* en tejido tratado con OLE (c) y LA (d) y la expresión relativa de *NOS2* en tejido tratado con OLE (e) y LA (f). Se representa el promedio de los valores relativos de la expresión de cada gen  $\pm$  EEM.

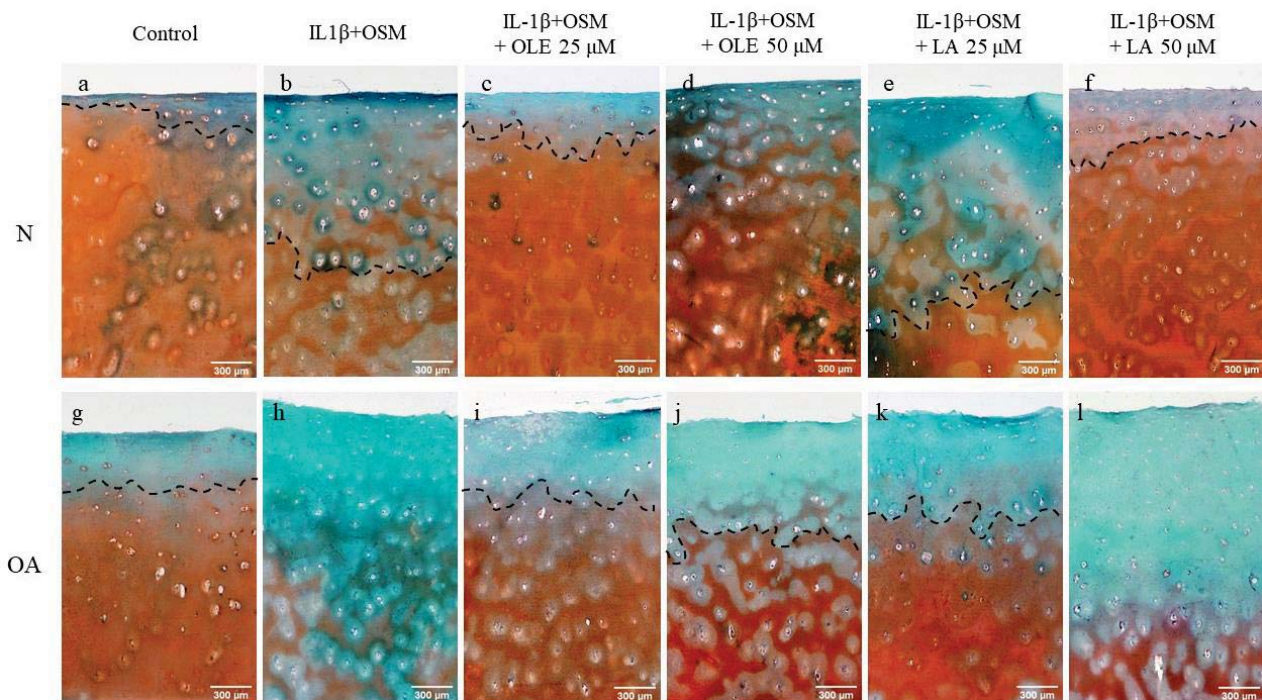


**Figura 8.** Expresión de *IL1B*, *IL8* y *NOS2* relativa a *36B4* en cartílago OA. Los histogramas muestran la expresión relativa de *IL1B* en tejido tratado con OLE (a) y LA (b), la expresión relativa de *IL8* en tejido tratado con OLE (c) y LA (d) y la expresión relativa de *NOS2* en tejido tratado con OLE (e) y LA (f). Se representa el promedio de los valores relativos de la expresión de cada gen  $\pm$  EEM.

### 4.3. Los nutraceuticos OLE y LA reducen la liberación de GAG en explantes tratados con citoquinas

Transcurridos los 14 días, se procedió al procesamiento histológico de las muestras de N1 y OA1. Se obtuvieron secciones longitudinales de 4  $\mu\text{m}$  que fueron teñidas con safranina O - verde rápido, tinción que revela la pérdida de GAG en la MEC. Una coloración roja de la MEC indica la integridad de los GAG, mientras que un predominio de un color verde azulado muestra la pérdida de dichas moléculas.

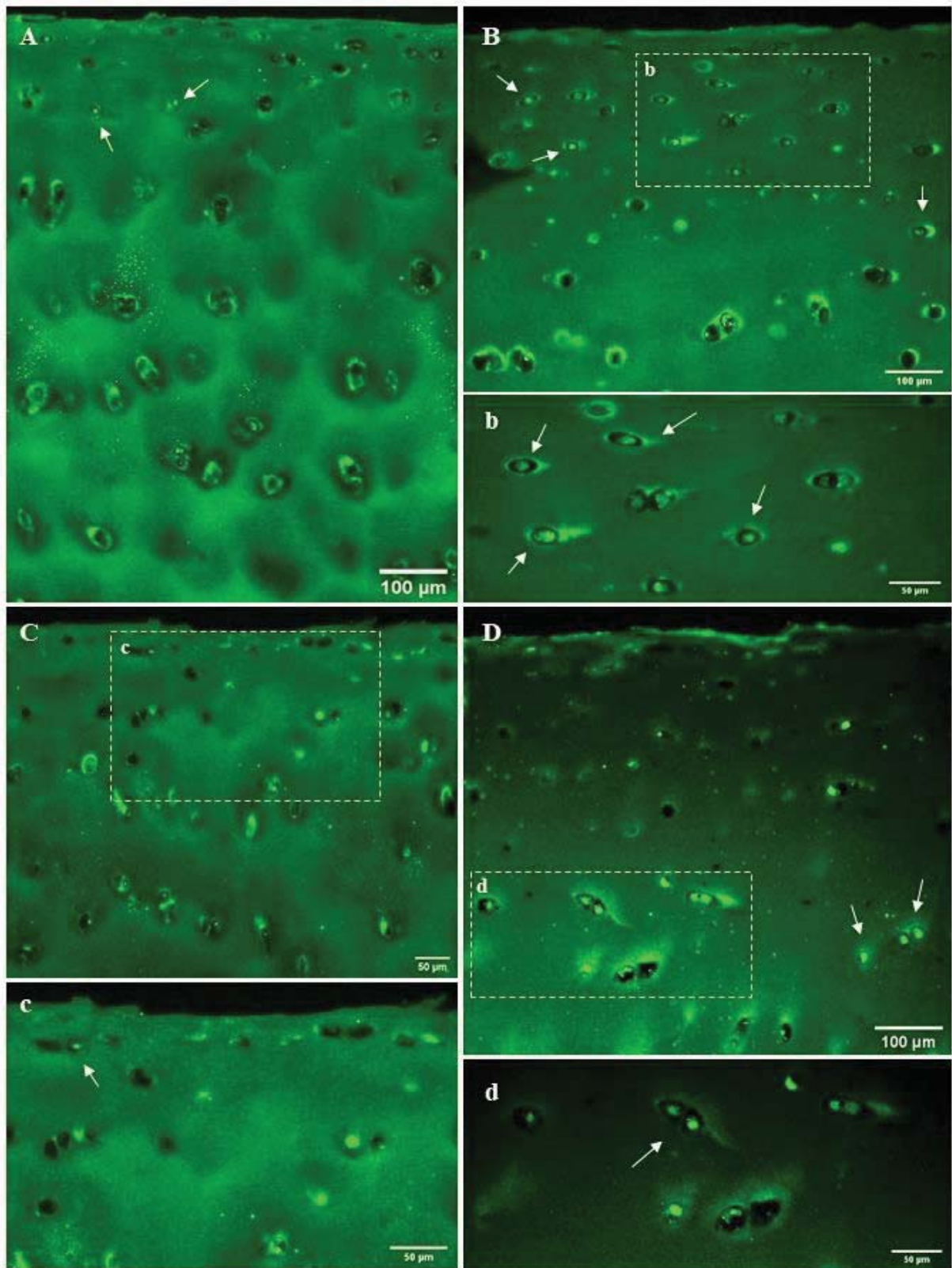
En la **Figura 9** se puede apreciar la disminución de la pérdida de GAG tras la exposición a algunos nutraceuticos durante 14 días. El paciente N muestra una respuesta favorable al tratamiento con IL-1 $\beta$ +OSM + OLE 25  $\mu\text{M}$  (**Fig. 9c**) y IL-1 $\beta$ +OSM + LA 50  $\mu\text{M}$  (**Fig. 9f**), sin distinguirse una mejora significativa con IL-1 $\beta$ +OSM + OLE 50  $\mu\text{M}$  (**Fig. 9d**) y IL-1 $\beta$ +OSM + LA 25  $\mu\text{M}$  (**Fig. 9e**) en comparación con el control positivo (**Fig. 9b**), que está visiblemente más dañado que el control negativo (**Fig. 9a**). En el caso del paciente artrósico, las concentraciones más bajas de cada compuesto (**Fig. 9i, 9k**) son las que más contribuyen al mantenimiento de la MEC con respecto al control positivo (**Fig. 9h**), el cual muestra menos contenido en GAG que el control negativo (**Fig. 9g**). Las concentraciones más altas (**Fig. 9j, 9l**) no reducen en gran medida la liberación de GAG en OA.



**Figura 9.** Tinción de la MEC con safranina O – verde rápido. Secciones longitudinales de cartilago N (a-f) y OA (g-l). (a, g) Control; (b, h) IL-1 $\beta$ +OSM; (c, i) IL-1 $\beta$ +OSM + OLE 25  $\mu\text{M}$ ; (d, j) IL-1 $\beta$ +OSM + OLE 50  $\mu\text{M}$ ; (e, k) IL-1 $\beta$ +OSM + LA 25  $\mu\text{M}$ ; (f, l) IL-1 $\beta$ +OSM + LA 50  $\mu\text{M}$ . Barras de escala: 300  $\mu\text{m}$ .

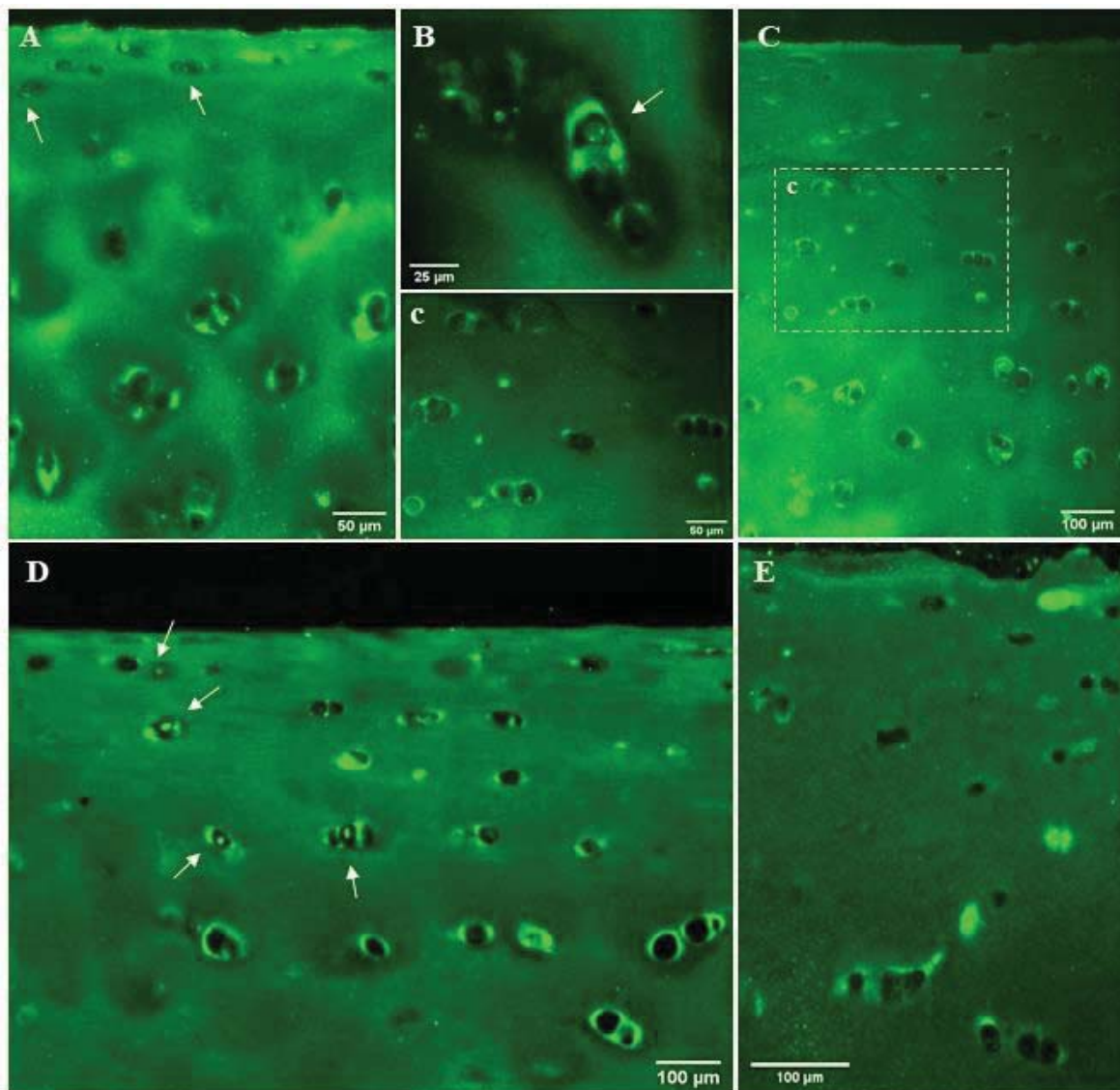
#### **4.4. Expresión diferencial de 5-hmC y 5-mC en tejido articular humano y de ratón**

La **Figura 10** ilustra el marcaje del anticuerpo anti-5-hmC en N1 y OA1. Obsérvese que en cartílago OA sin estimular (**Fig. 10B**) hay más marcaje que en cartílago N (**Fig. 10A**). En la **Fig. 10b** se puede ver en detalle la positividad de los núcleos de los condrocitos OA. A modo de ejemplo, se adjuntan también imágenes de las secciones longitudinales obtenidas a partir de los explantes estimulados con IL-1 $\beta$ +OSM + LA 50  $\mu$ M (**Fig. 10C, 10c, 10D, 10d**). En ellas también se distingue que la señal de inmunofluorescencia frente a 5-hmC es, mayor, en el tejido enfermo (**Fig. 10D, 10d**). Generalmente, en las secciones hay un mayor nivel de positividad en la zona superficial del cartílago, aunque en la **Fig. 10D** se puede observar señal en la zona media-profunda.



**Figura 10.** Marcaje del anticuerpo anti-5-hmC en cartílago humano. (A) Control en N1. (B) Control en OA1, (b) detalle de B. (C) IL-1 $\beta$ +OSM + LA 50  $\mu$ M en N1, (c) detalle de C. (D) IL-1 $\beta$ +OSM + LA 50  $\mu$ M en OA1, (d) detalle de D. Las flechas señalan condrocitos positivamente marcados para 5-hmC. La zona superficial del cartílago se encuentra hacia arriba en las imágenes A, B, C y D. Barras de escala: indicado en cada imagen.

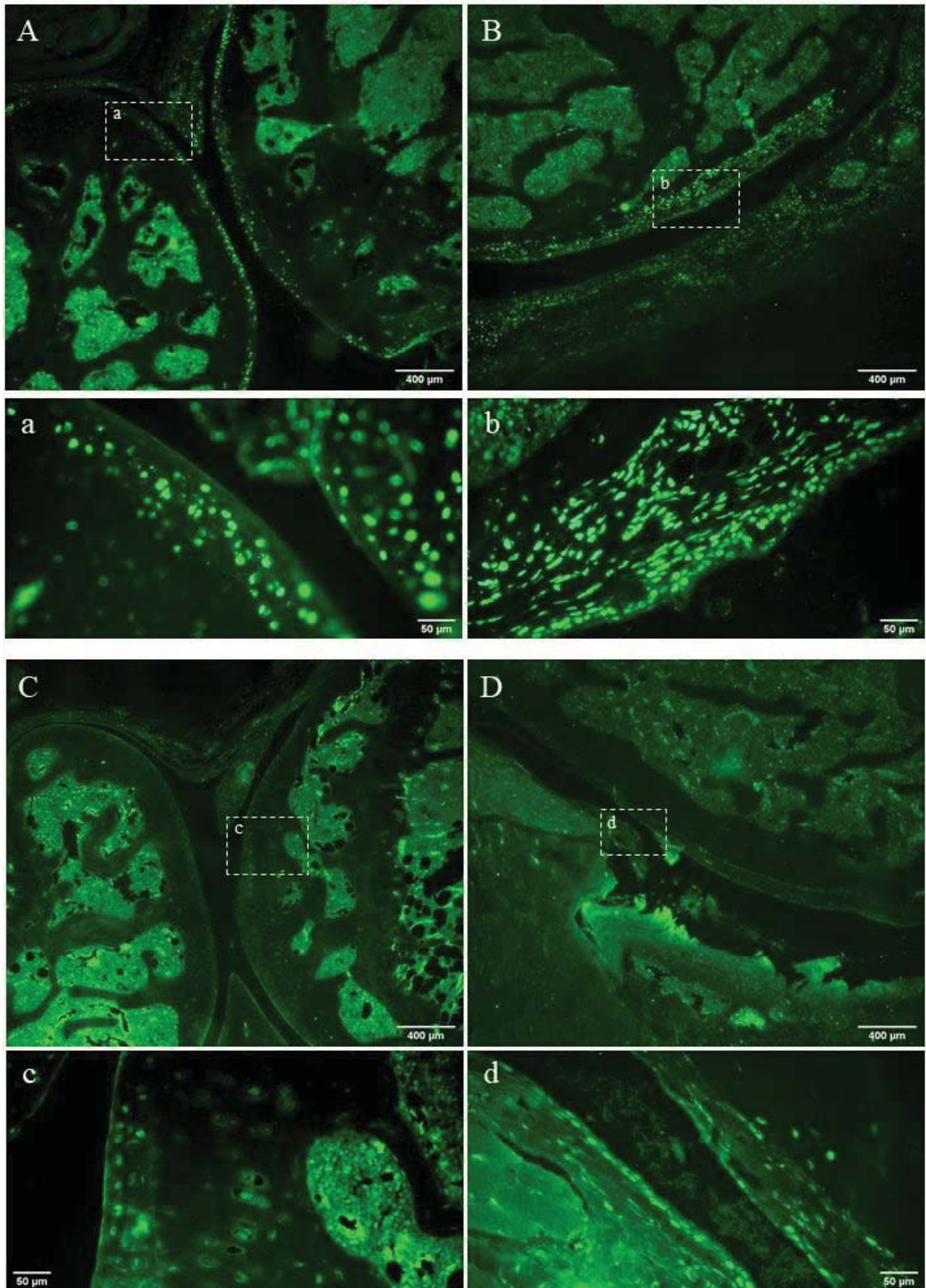
La señal de inmunofluorescencia frente a 5-mC tiene mayor presencia en el cartílago N (Fig. 11A y 11B) con respecto a OA (Fig. 11C y 11c), aunque la tinción es menos intensa que la de 5-hmC. En las imágenes puede notarse una señal mucho más tenue que en el caso anterior (Fig. 10). Se ha incluido una selección de fotos correspondientes a los explantes estimulados con IL-1 $\beta$ +OSM + OLE 25  $\mu$ M para aportar más ejemplos del aspecto del marcaje de este anticuerpo (Fig. 11D, 11E). En estas últimas también puede notarse como hay más expresión en el tejido N que en el OA. Al igual que para 5-mC, los cortes exhiben más señal en la zona superficial.



**Figura 11.** Marcaje del anticuerpo anti-5-mC en cartílago humano. (A) Control en N1. B) Condrocito en la zona profunda de N1 (Control). (C) Control en OA1. (c) detalle de C. (D) IL-1 $\beta$ +OSM + OLE 25  $\mu$ M en N1. (E) IL-1 $\beta$ +OSM + OLE 25  $\mu$ M en OA1. Las flechas señalan condrocitos positivamente marcados para 5-mC. Barras de escala: indicado en cada imagen.

Adicionalmente, en la **Figura 12** se muestran una serie de imágenes de rodilla de ratón. En la columna izquierda se muestran secciones de dicha extremidad obtenidas de ratones *Sham-operated* (**Fig. 12A, 12a, 12C, 12c**). En cambio, las imágenes de la columna derecha corresponden a ratones DMM (**Fig. 12B, 12b, 12D, 12d**). Las **Fig. 12A, 12a, 12B y 12b** corresponden a muestras sobre las que se ha testado el anticuerpo anti-5-hmC, mientras que en las **Fig. 12C, 12c, 12D y 12d** se muestra el resultado de IF para el anticuerpo anti-5-mC.

En la **Fig. 12b**, perteneciente a un ratón DMM, se percibe una mayor positividad del anticuerpo anti-5-hmC con respecto a la imagen **Fig. 12a**, donde hay menos condrocitos marcados. Las imágenes **Fig. 12c y 12d** recogen vistas ampliadas de la 5-mC en ratones *Sham-operated* y DMM respectivamente. De igual forma que en el caso del tejido humano, el anticuerpo anti-5-mC exhibe una señal más débil que el anti-5-hmC.



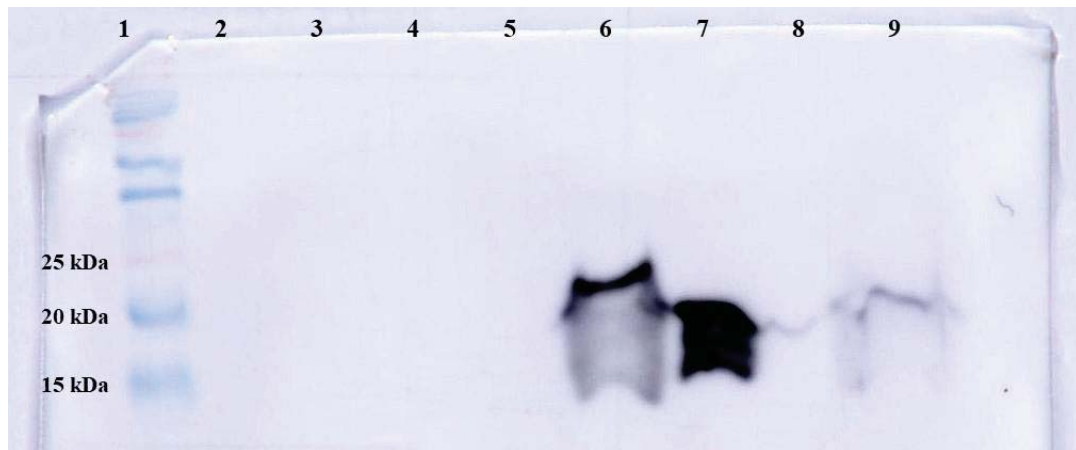
**Figura 12.** Marcaje de anti-5-hmC y anti-5-mC en modelo animal de ratón. (A) 5-hmC en ratón *Sham-operated*, (a) detalle de A. (B) 5-hmC en ratón DMM, (b) detalle de B. (C) 5-mC en ratón *Sham-operated*, (c) detalle de C. (D) 5-mC en ratón DMM, (d) detalle de D. Barras de escala: indicado en cada imagen.



#### 4.5. Presencia de la modificación H3K27me3 en condrocitos humanos

Mediante la técnica de *western blot* se detectó la presencia de la modificación H3K27me3 (PM = 17 kDa) en condrocitos humanos N. La **Figura 13** expone el resultado del revelado con sustrato quimioluminiscente, donde constan dos bandas (carriles 6 y 7) correspondientes a las muestras celulares. En el carril 9 figura un control de extracto de histonas de riñón, tejido donde previamente se había validado la extracción.

En los carriles 2-5 se cargaron muestras de tejido N y OA procedentes del banco de cartílago del Dr. Francisco J. Blanco García. Este ensayo fue, en parte, una prueba para comprobar si el protocolo de extracción de histonas a partir de células podría funcionar también en cartílago.



**Figura 13.** Presencia de la marca epigenética H3K27me3 en condrocitos humanos. (1) marcador de peso molecular; (2, 4) cartílago N; (3, 5) cartílago OA; (6, 7) condrocitos N; (9) riñón. Las muestras fueron alicuotadas con tampón de carga (2-mercaptoetanol y tampón Laemmli) para tener 5  $\mu\text{g}$  (2, 3, 6) o 10  $\mu\text{g}$  (4, 5, 7) de proteína por cada 30  $\mu\text{l}$  de tampón de carga.

## 5. DISCUSIÓN

Los resultados de este estudio muestran que los nutraceuticos OLE y LA ejercen un efecto antiinflamatorio y antioxidante sobre el cartílago, siendo capaces de inducir una reducción de la degradación tisular. Aunque el tamaño muestral es pequeño y la variabilidad que existe al emplear muestras biológicas es considerable, se puede apreciar una tendencia a la disminución en la cantidad de NO liberado en tejido expuesto a un estímulo inflamatorio en combinación con uno de los nutraceuticos. Principalmente, son OLE 50  $\mu\text{M}$  y LA 25  $\mu\text{M}$  los que encabezan dicha tendencia, aparentando ser las concentraciones que tienen un efecto más adecuado sobre la reducción de la liberación de NO. Nótese que a las 24 h es donde se puede

advertir una mayor eficacia de los compuestos, mientras que entre los días 4 y 11 se produce, en general, un incremento de NO independientemente del estímulo con el que se esté tratando el cartílago. Esto sugiere que el tiempo idóneo de exposición a los nutraceuticos para reducir la concentración de NO oscila entre 24 h y 4 días. Esto se corresponde con los datos de expresión génica, ya que *NOS2* es el gen de los analizados cuya expresión se reduce en mayor medida, especialmente con LA. Esto puede deberse al potente efecto antioxidante de los polifenoles (41), que contribuye a disminuir la actividad de iNOS y, en consecuencia, la abundancia de ROS a la que están sometidos los condrocitos OA (18).

Por otra parte, un intervalo de 24 h de estimulación con OLE parece ser insuficiente para apreciar una reducción considerable de la expresión de *IL1B* e *IL8* y no se observa una tendencia uniforme en los datos obtenidos. En este sentido, el LA parece ser más efectivo a la hora de reducir la expresión de *IL1B* en individuos N y, además, también mostró un efecto favorable sobre la expresión de *IL8* en donantes OA. Las citoquinas proinflamatorias IL-1 $\beta$  e IL-8 están sobreexpresadas en OA y, junto con el estrés oxidativo provocado por las ROS, contribuyen a la destrucción de la MEC y sus componentes. Entre estos se encuentran los proteoglicanos, moléculas estructurales cuya estabilidad se ve comprometida ante el aumento de expresión de *IL1B*, *IL8* y *NOS2*, ya que las proteínas que codifican promueven su degradación (14–16).

Así, los datos de expresión génica se correlacionan con los obtenidos del análisis histológico de la MEC tras 14 días de estimulación. Los explantes tratados con IL-1 $\beta$ +OSM reflejan una situación tisular caracterizada por la pérdida de la fracción glucídica de los proteoglicanos, los GAG, ocasionada porque el cartílago está expuesto únicamente al estímulo inflamatorio. Sin embargo, el tratamiento con los nutraceuticos OLE y LA induce una visible mejora del estado de la MEC, disminuyendo la pérdida de GAG. Esto va en la línea de los resultados encontrados por de Andrés y colaboradores (49), que confirman los efectos antiinflamatorios y antioxidantes del LA. En este caso particular, y contrariamente a lo que muestran los resultados de Montoya y colaboradores (51), los efectos del OLE no son tan marcados como los del LA en algunos aspectos, ya que en general no se aprecia una clara reducción de la expresión de *IL1B* e *IL8*. Sin embargo, esto puede deberse al breve tiempo de exposición al compuesto (24 h), puesto que la histología de la MEC revela su efectividad a lo largo del tiempo. De hecho, en el paciente artrósico son las concentraciones menores de cada compuesto las que ejercen un efecto más beneficioso sobre la degradación del cartílago, lo cual indica que las concentraciones altas podrían ser tóxicas si la exposición es prolongada.

Por otro lado, los resultados de IF muestran una intensa señal por parte de la marca 5-hmC tanto en tejido humano como murino, que se debe a la elevada tasa de desmetilación de 5-mC a 5-hmC en el contexto artrósico (30). 5-mC está mayormente presente en tejido N (30), donde la regulación de los mecanismos de metilación no se encuentra alterada. A pesar de todo, la tinción proporcionada por el anticuerpo anti-5-mC es evidentemente más débil que la aportada por anti-5-hmC.

El hecho de contar únicamente con resultados de IF de dos pacientes no hace posible sacar conclusiones sobre la efectividad de los distintos tratamientos con nutraceuticos sobre la cantidad de estas marcas epigenéticas aunque, dado el enorme potencial de los compuestos del AOVE como moduladores epigenéticos (46), es posible que el OLE y/o el LA (e incluso el nutraceutico sintético LA-A) sean capaces de incrementar o incluso restaurar los niveles de 5-mC en la OA.

La retirada de grupos metilo en OA puede afectar a una región amplificadora de *NOS2* (26) y a una región promotora de *IL8* (27), provocando el aumento desmesurado de ambas proteínas. La maquinaria de desmetilación que actúa en estos casos, y cuya homeostasis está desregulada en la patología, podría guardar relación con las desmetilasas responsables de la acentuada producción de 5-hmC en OA. Considerando la trascendencia de la epigenética en la OA, sería interesante continuar investigando en esta línea para dilucidar las vías moleculares alteradas que causan daño tisular y probar el efecto de los nutraceuticos del AOVE sobre ellas.

Mediante *western blot* se confirmó la presencia de H3K27me3 en condrocitos N, marca epigenética que aumenta en el núcleo de los condrocitos cuando desciende la cantidad de H3K9me3 (31). H3K9me3 se une a la lámina nuclear, por lo que una reducción de sus niveles se traduce en una menor unión de la cromatina a dicha estructura y, por tanto, una expresión atenuada de ciertos genes responsables de la maduración excesiva de los condrocitos artrósicos (31). La validez del protocolo de extracción de histonas en condrocitos abre la posibilidad de estudiar cómo actuarían los nutraceuticos en el equilibrio entre H3K9me3 y H3K27me3. No obstante, la técnica no funcionó utilizando muestras íntegras de cartílago articular en lugar de cultivos celulares de condrocitos. La decisión de incluirlas en esta prueba surgió tras haber ensayado numerosas veces el protocolo de extracción de histonas de tejido facilitado por Rumbaugh y Miller (53), que en otros tejidos (riñón, hueso, membrana sinovial)

se había ejecutado con éxito anteriormente. Con todo, debido a la particular estructura y composición del cartílago articular no se han obtenido resultados por el momento.

En el estudio realizado existen ciertas limitaciones metodológicas que conviene comentar. En primer lugar, para complementar el análisis de liberación de NO y de expresión génica se incrementará el tamaño muestral en futuros estudios, con el fin de realizar un tratamiento estadístico de los datos y poder concluir si existen diferencias significativas entre los distintos grupos. Asimismo, se aumentará la batería de genes de referencia para testar la estabilidad de cada uno frente a las muestras. Esto es importante porque los nutraceuticos del AOVE son compuestos con la capacidad de alterar el metabolismo celular, de manera que la búsqueda del gen más apto posibilitaría una mejor normalización de los datos.

Dada la tenue señal fluorescente obtenida con el anticuerpo anti-5-mC, próximamente se optimizará completamente el procedimiento de IF con el objetivo de incrementarla. Esto permitirá su cuantificación y comparación con los niveles de 5-hmC en cartílago N y OA y en ratones *Sham-operated* y DMM. Además, aumentando el número de muestras se podrían comparar los efectos del OLE y LA sobre la presencia de dichas marcas epigenéticas en el tejido. Se deberá tener en cuenta que será imprescindible aumentar el tiempo de reposo de las secciones de cartílago para evitar la pérdida de muestras. Tras consultar esta cuestión con el personal de la unidad de Histomorfología del INIBIC, se ha acordado que una semana de reposo a 37°C sería un tiempo adecuado.

Entre otros objetivos, también destaca la necesidad de optimizar un protocolo de extracción de histonas en cartílago. Esto podría contribuir al estudio de las marcas epigenéticas presentes en las mencionadas proteínas sin tener que recurrir a células recién aisladas.

En los próximos años se continuará el trabajo iniciado en este TFM en una tesis doctoral como parte del proyecto *EpiOA: Elucidating the role of epigenetic modifiers and nutraceuticals in osteoarthritis*. Se trabajará con un modelo murino para estudiar el efecto de los nutraceuticos del AOVE sobre la degradación articular *in vivo*, incorporando los compuestos en la dieta de ratones *Sham-operated* y DMM. Además, tras haber comprobado el funcionamiento de los anticuerpos en este estudio, se podrán analizar las diferencias en los niveles de 5-hmC y 5-mC tras la exposición a los nutraceuticos y comprobar sus efectos sobre la regulación epigenética de la patología.

Paralelamente, se hará un análisis comparativo del perfil de metilación de algunos genes en muestras N y OA humanas mediante la técnica de *Single Base Extension* (SBE) modificada para el análisis de la metilación del ADN (54), corroborando el resultado mediante secuenciación Sanger.

En resumen, los nutraceuticos OLE y LA han mostrado un notable efecto reductor sobre la liberación de NO, la expresión de *NOS2* y la pérdida de integridad de la MEC. Por otra parte, las diferencias entre los niveles de 5-hmC y 5-mC sugieren que estas marcas están implicadas en la progresión de la enfermedad e invitan a profundizar en su estudio, al igual que ocurre con H3K27me3. En definitiva, las propiedades terapéuticas de los nutraceuticos podrían aprovecharse para reducir la degradación articular o prevenir la OA en las fases iniciales de la enfermedad, consiguiendo retrasar la toma de fármacos o la necesidad de someterse a una cirugía.

## 6. CONCLUSIONES

A partir de los resultados obtenidos de este estudio, se concluye:

- 1) Los compuestos nutraceuticos OLE y LA tienden a reducir la producción de NO, los niveles de expresión de *NOS2* y la pérdida de GAG en explantes de cartilago articular humano sano y artrósico.
- 2) 5-hmC tiene mayor presencia en tejido OA en comparación con 5-mC, aumentada en N. Ambas marcas epigenéticas se encuentran mayormente en la zona superficial del cartilago.
- 3) La técnica experimental utilizada permitió detectar la modificación H3K27me3 en condrocitos N.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

1. S. R. Goldring, M. B. Goldring. *Nature Reviews Rheumatology*. **12**, 632–644 (2016).
2. Osteoarthritis Research Society International. *Osteoarthritis Research Society International*. 1–103 (2016).
3. A. J. Sophia Fox, A. Bedi, S. A. Rodeo. *Sports Health*. **1**, 461–468 (2009).
4. LeadingMD, Hip Replacement (2016), disponible en <https://leadingmd.com/hip-replacement/overview.asp>.

5. Y. Zhang, J. M. Jordan. *Clinics in Geriatric Medicine*. **26**, 355–369 (2010).
6. S. Trelle *et al.* *BMJ*. **342**, c7086 (2011).
7. G. Liu *et al.* *The American Journal of Cardiology*. **114**, 1523–1529 (2014).
8. C. C. Hsu *et al.* *Hypertension*. **66**, 524–533 (2015).
9. J. N. Katz. *Best Practice and Research: Clinical Rheumatology*. **20**, 145–153 (2006).
10. M. B. Goldring, S. R. Goldring. *Journal of Cellular Physiology*. **213**, 626–634 (2007).
11. R. F. Loeser, S. R. Goldring, C. R. Scanzello, M. B. Goldring. *Arthritis and Rheumatism*. **64**, 1697–1707 (2012).
12. R. F. Loeser. *Arthritis & Rheumatism*. **54**, 1357–1360 (2006).
13. A. Haseeb, T. M. Haqqi. *Clinical Immunology*. **146**, 185–196 (2013).
14. J. Shen, Y. Abu-Amer, R. J. O’Keefe, A. McAlinden. *Connective Tissue Research*. **58**, 49–63 (2017).
15. M. Kapoor, J. Martel-Pelletier, D. Lajeunesse, J. P. Pelletier, H. Fahmi. *Nature Reviews Rheumatology*. **7**, 33–42 (2011).
16. K. Chauffier *et al.* *Joint Bone Spine*. **79**, 604–609 (2012).
17. M. Almonte Becerril, F. Navarro García, A. González Robles, M. A. Vega López, C. Lavalle, J. B. Kouri. *Apoptosis*. **15**, 631–638 (2010).
18. A. Mobasher, C. Matta, R. Zákány, G. Musumeci. *Maturitas*. **80**, 237–244 (2015).
19. L. N. Reynard, J. Loughlin. *Maturitas*. **71**, 200–204 (2012).
20. R. García. Epigenética (2020), disponible en [https://genotipia.com/genetica\\_medica\\_news/epivariaciones-genoma-humano/epigenetica-rosario-garcia/](https://genotipia.com/genetica_medica_news/epivariaciones-genoma-humano/epigenetica-rosario-garcia/)
21. J. Loughlin, L. N. Reynard. *Nature Reviews Rheumatology*. **11**, 6–7 (2015).
22. A. P. Bird, A. P. Wolffe. *Cell*. **99**, 451–454 (1999).
23. H. I. Roach *et al.* *Arthritis and Rheumatism*. **52**, 3110–3124 (2005).
24. C. Bui *et al.* *The FASEB Journal*. **26**, 3000–3011 (2012).

25. K. S. C. Cheung, K. Hashimoto, N. Yamada, H. I. Roach. *Rheumatology International*. **29**, 525–534 (2009).
26. M. C. de Andrés *et al.* *Arthritis and Rheumatism*. **65**, 732–742 (2013).
27. A. Takahashi, M. C. de Andrés, K. Hashimoto, E. Itoi, R. O. C. Oreffo. *Osteoarthritis and Cartilage*. **23**, 1946–1954 (2015).
28. P. Smeriglio *et al.* *Science Translational Medicine*. **12**, eaax2332 (2020).
29. A. Haseeb, M. S. Makki, T. M. Haqqi. *Journal of Biological Chemistry*. **289**, 6877–6885 (2014).
30. S. E. B. Taylor, P. Smeriglio, L. Dhulipala, M. Rath, N. Bhutani. *Arthritis and Rheumatology*. **66**, 90–100 (2014).
31. K. Maki *et al.* *Journal of Cell Science*. **134**, jcs247643 (2021).
32. M. Ukita, K. Matsushita, M. Tamura, T. Yamaguchi. *International Journal of Molecular Medicine*. **45**, 607–614 (2020).
33. S. Ravalli, M. A. Szychlinska, R. M. Leonardi, G. Musumeci. *World Journal of Orthopedics*. **9**, 255–261 (2018).
34. P. Castrogiovanni *et al.* *International Journal of Molecular Sciences*. **17**, 2042 (2016).
35. A. Montaña, M. Hernández, I. Garrido, J. L. Llerena, F. Espinosa. *International Journal of Molecular Sciences*. **17**, 1960 (2016).
36. R. Casas, E. Sacanella, R. Estruch. *Endocrine, Metabolic & Immune Disorders-Drug Targets*. **14**, 245–254 (2014).
37. Ç. Akgüllü *et al.* *Türk Kardiyoloji Dernegi Arsivi*. **43**, 340–349 (2015).
38. S. Jafari Nasab *et al.* *Nutrition and Cancer*. **72**, 1326–1335 (2020).
39. N. Veronese *et al.* **36**, 1609–1614 (2017).
40. P. Lepetsos, A. G. Papavassiliou. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*. **1862**, 576–591 (2016).
41. P. Baret *et al.* *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. **45**, 167–174 (2013).

42. G. Presti *et al.* *Biophysical Chemistry*. **230**, 109–116 (2017).
43. K. Y. Chin, K. L. Pang. *Nutrients*. **9**, 1060 (2017).
44. M. Takuma *et al.* *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. **82**, 1101–1106 (2018).
45. S. Rigacci, M. Stefani. *International Journal of Molecular Sciences*. **17**, 843 (2016).
46. V. B. O. Ayissi, A. Ebrahimi, H. Schluesenner. *Molecular Nutrition and Food Research*. **58**, 22–32 (2014).
47. G. Musumeci *et al.* *Journal of Nutritional Biochemistry*. **24**, 2064–2075 (2013).
48. R. Johnson, E. Melliou, J. Zweigenbaum, A. E. Mitchell. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **66**, 2121–2128 (2018).
49. M. C. de Andrés *et al.* *Journal of Tissue Engineering*. **11**, 1–13 (2020).
50. G. K. Beauchamp *et al.* *Nature*. **437**, 45–46 (2005).
51. T. Montoya, M. Sánchez Hidalgo, M. L. Castejón, M. Á. Rosillo, A. González Benjumea, C. Alarcón de la Lastra. *Antioxidants*. **10**, 650 (2021).
52. L. Parkinson, R. Keast. *International Journal of Molecular Sciences*. **15**, 12323–12334 (2014).
53. G. Rumbaugh, C. A. Miller. *Methods in Molecular Biology*. **670**, 263–274 (2011).
54. Z. A. Kaminsky, A. Assadzadeh, J. Flanagan, A. Petronis. *Nucleic Acids Research*. **33**, 1–12 (2005).



## **ANEXO I**

### **RESULTADOS PREVIOS QUE AVALAN LA VIABILIDAD DEL PROYECTO**

Existen datos preliminares sobre el efecto de nutraceuticos, concretamente el ligustrósido de aglicón, sobre la patología artrósica que fueron publicados recientemente en la revista *Journal of Tissue Engineering* (de Andrés MC *et al.*, Osteoarthritis treatment with a novel nutraceutical acetylated ligstroside aglycone, a chemically modified extra-virgin olive oil polyphenol. *J Tissue Eng.* 2020;11:2041731420922701).

Los resultados de este Trabajo Fin de Máster han sido financiados por el Proyecto de Investigación en Salud AES 2019, concedido a la Dra. M<sup>a</sup> del Carmen de Andrés González para estudiar el efecto de nutraceuticos y modificadores epigenéticos como tratamiento de la artrosis.