

Efectos anti-inflamatorios de las aguas minero-medicinales sulfuradas en condrocitos articulares *in vitro*

Anti-inflammatory effects of sulphurous mineral waters on
articular chondrocytes *in vitro*

Burguera EF⁽¹⁻²⁾, Vela Anero A⁽²⁻³⁾, Meijide-Failde R⁽²⁾, Blanco FJ⁽¹⁾

⁽¹⁾Grupo de Reumatología, Instituto de Investigación Biomédica de A Coruña (INIBIC).
Complejo Hospitalario Universitario A Coruña (CHUAC). Sergas. A Coruña, España.

⁽²⁾Centro de Investigación Biomédica en Red-Bioingeniería,
Biomateriales y Nanomedicina (CIBER-BBN), España

⁽³⁾Grupo de Terapia Celular y Medicina Regenerativa. Departamento de Medicina,
Universidad de A Coruña, A Coruña, España
elena.fernandez.burguera@sergas.es

Resumen

El agua minero-medicinal sulfurada (AMS) es una fuente natural de sulfuro de hidrógeno (H₂S). Esta molécula está ganando reconocimiento como agente anti-inflamatorio en modelos *in vitro* de artrosis (OA) [1]. En este trabajo se evaluaron los efectos de AMS recogida de un manantial público en la provincia de Pontevedra, España, sobre condrocitos articulares de cartílago OA y la línea celular de condrocitos T/C-28a2. Los parámetros evaluados fueron la viabilidad de las células, la producción de óxido nítrico (NO) y la expresión génica de diversos mediadores de inflamación, en concreto, sintasa inducible de NO (iNOS), interleuquina 6 (IL6) y metaloproteína 13 (MMP13). Además, se estudió la abundancia proteica de iNOS y los niveles de MMP13 en los sobrenadantes celulares.

Las células se estimularon directamente con el AMS con y sin IL1 β (5 ng/mL). Para ello el medio de cultivo celular se preparó disolviendo medio mínimo esencial de Dulbecco (DMEM) en polvo en agua destilada (AD) o AMS, que posteriormente se mezclaron en distintas proporciones (25%, 50% y 75% de AMS).

Para comprobar la citocompatibilidad de los medios preparados se utilizó un test de viabilidad con el reactivo alamarBlue® y la línea celular. En el resto de los experimentos se utilizaron condrocitos humanos primarios. Las células se co-estimularon con IL1 β (5 ng/mL) y los medios preparados con distintas proporciones de AMS. La producción de NO se cuantificó utilizando la reacción de Griess y la expresión génica de los marcadores de inflamación se determinó mediante qRT-

PCR. Para la determinar la abundancia proteica se utilizó, en el caso de iNOS una inmunocitoquímica y en el caso de la MMP13 un ELISA.

El test de viabilidad permitió comprobar que ninguna de las proporciones de AMS utilizadas provocaba un efecto negativo sobre la viabilidad celular. Mediante microscopía óptica y de manera cualitativa se observó cómo las células perdieron su morfología habitual *in vitro* al estimularlas con IL1 β y cómo las proporciones crecientes de AMS contrarrestaron este efecto. Con 100% AMS se había recuperado la morfología normal. La estimulación con IL1 β también provocó un aumento tanto en la producción de NO, como de la expresión génica y la abundancia proteica de su enzima inducible. Todos estos efectos fueron parcialmente contrarrestados por el AMS, siendo 75% y 100% las proporciones con mejores resultados. La expresión de IL6 también se redujo debido a la presencia del AMS. Respecto a los niveles de MMP13 en los sobrenadantes celulares, se observó una tendencia descendente al aumentar la proporción de AMS, mientras que su expresión génica únicamente se redujo al utilizar el medio preparado con 100% AMS.

Los presentes resultados demuestran que el agua mineromedicinal sulfurada utilizada en este trabajo puede ejercer efectos antioxidantes y anti-inflamatorios en condrocitos humanos OA cuando se utiliza como medio de cultivo. Estos resultados proporcionan evidencias adicionales sobre el potencial terapéutico del sulfuro de hidrógeno en la artrosis, que se suman a los obtenidos previamente utilizando compuestos sintéticos sulfurados [2].

Palabras clave: agua mineromedicinal, sulfuro de hidrógeno, artrosis, condrocitos, inflamación

key words: minero-medicinal wáter, hydrogen sulfide, osteoarthritis, chondrocytes, inflammation

Referencias

1. Burguera EF, Meijide-Failde R, Blanco FJ. Hydrogen Sulfide and Inflammatory Joint Diseases. *Curr Drug Targets*. 2016 Aug 29. [Epub ahead of print]
2. Burguera EF, Vela-Anero A, Magalhaes J, Meijide-Failde R, Blanco F. Effect of hydrogen sulfide sources on inflammation and catabolic markers on interleukin 1 beta-stimulated human articular chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage* 2014;22:1026-35.