

El papel antioxidante de la polidatina en un modelo *in vitro* de gota

Antioxidant role of polydatin in an in vitro gout model

Francesca Oliviero,* Andretto Lisa,* Anna Scanu,* Paolo Spinella,†
 Giampietro Ravagnan,§ Alberto López-Reyes,|| Leonardo Punzi,*
 Yessica Zamudio-Cuevas*,||

* Rheumatology Unit, Department of Medicine-DIMED, University of Padova, Via Giustiniani, 2, Padova 35128, Italy.

† Clinical Nutrition Unit, Department of Medicine DIMED, University of Padova, Padova, Italy.

§ Istituto di Farmacologia Traslazionale (IFT), CNR, Roma, Italy. Ca' Foscari University of Venice, Venice, Italy.

|| Laboratorio de Líquido Sinovial, Dirección de Investigación, Instituto Nacional de Rehabilitación, Ciudad de México, México.

Dirección para correspondencia:
 Yessica Zamudio-Cuevas
 Rheumatology Unit, Department of Medicine-DIMED, University of Padova, Via Giustiniani, 2, Padova 35128, Italy & Laboratorio de Líquido Sinovial, Dirección de Investigación, Instituto Nacional de Rehabilitación.
 Calzada México-Xochimilco Núm. 289,
 Arenal Tepepan, 14389,
 Ciudad de México, México.
 Teléfono: 55 59 99 1000, ext. 19501, 19502
 E-mail: yessizc@hotmail.com

Recibido: 23 de mayo de 2016.
 Aceptado: 13 de octubre de 2016.

Este artículo puede ser consultado en versión completa en:
<http://www.medigraphic.com/rid>

Resumen

La polidatina (POLY) es un compuesto polifenólico que se encuentra en la cáscara de la uva y en los últimos años sus efectos antioxidantes y antiinflamatorios se han evaluado tanto a nivel sistémico como en enfermedades crónicas degenerativas (cardiovasculares, diabetes, etc.). La gota, una artropatía generada por el depósito de cristales de urato monosódico (CUM) en las articulaciones y tejidos periarticulares, se caracteriza por presentar un estado oxidante e inflamatorio mediado por sinoviocitos, monocitos y neutrófilos. Por lo anterior, el objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la POLY en un modelo *in vitro* de estrés oxidante inducido por CUM. Para ello, monocitos THP-1 pretratados con POLY y sin tratamiento con POLY fueron expuestos a CUM durante 24 horas, se evaluó la producción intracelular de especies reactivas del oxígeno (ERO) a los dos grupos de estudio y se les comparó con monocitos sin estímulo (control). Los resultados mostraron que los monocitos expuestos a CUM por 24 horas incrementaron la producción de ERO (5.71 UAF) ($p < 0.0001$) con respecto al control (1.00 UAF) propiciando un estado de oxidación celular; sin embargo, los monocitos estimulados con CUM pero pretratados con POLY a concentraciones de 10, 100 y 200 μM disminuyeron la producción de ERO a 1.95, 1.41 y 0.93 UAF, respectivamente ($p < 0.0001$). La POLY participa como antioxidante en el modelo *in vitro* de gota, lo que la convierte en una molécula con posible potencial terapéutico; no obstante, son necesarios estudios más amplios para comprender mejor los efectos antioxidantes de POLY con el fin de identificar nuevas dianas terapéuticas en esta patología.

Abstract

Polydatin (POLY) is a polyphenolic compound found in the skin of the grapes, and in recent years their antioxidant and anti-inflammatory effects have been evaluated systemically, as well as chronic degenerative diseases (cardiovascular, diabetes, etc.). The gout, an arthropathy generated by the deposition of monosodium urate crystals (MSU) within joints and periarticular tissues, is characterized by an oxidant and inflammatory state mediated by synoviocytes, monocytes and neutrophils. Therefore, the aim of this study was to evaluate the effect of POLY in an in vitro model of oxidative stress induced by MSU. Pretreated monocytes with and without POLY, were exposed to MSU for 24 hours and intracellular production of reactive oxygen species (ROS) were evaluate between the two study groups and was compared with a group of unstimulated monocytes (control). The results show that monocytes exposed to MSU for 24 h increased ROS production (RFU 5.71) ($p < 0.0001$) compared to the control (1.00 RFU), promoting cellular oxidation condition; however, stimulated monocytes MSU but pretreated with POLY at concentrations of 10, 100 and 200 μM ROS, ROS production decreased to 1.95, 1.41 and 0.93 RFU, respectively ($p < 0.0001$). POLY participates as antioxidant in our in vitro model, which makes possible a molecule with therapeutic potential; however are needed further studies to better understand the antioxidant effects POLY in order to identify new therapeutic targets in this disease.

Palabras clave:

Polidatina, cristales de urato monosódico, gota, especies reactivas del oxígeno, antioxidante.

Key words:

Polydatin, monosodium urate crystals, gout, reactive oxygen species, antioxidant.

Introducción

En las artropatías microcristalinas como la gota, células de la articulación como los sinoviocitos, los monocitos y los neutrófilos son responsables de inducir una fuerte respuesta inflamatoria y de estrés oxidante.¹ Los monocitos en particular activan el inflammasoma, mientras que los neutrófilos propician la liberación de citocinas proinflamatorias como consecuencia del estallido respiratorio que se caracteriza por la liberación de especies reactivas del oxígeno (ERO), generando un estado de estrés oxidante celular.^{2,3} Estas características fisiológicas han promovido en los últimos años el uso y estudio de agentes antioxidantes como terapias para mejorar el manejo y tratamiento de enfermedades como la gota que cursan con estrés oxidante.

Algunos antioxidantes como el edaravon, la N-acetil-cisteína y flavonoides como la diosmina, la hesperidina y las catequinas han tenido aceptación para uso clínico.^{4,5} Otros más como el resveratrol (trans-3,5, 49-tri-hidroxiestilbeno) ha sido estudiado en modelos de gota *in vitro* e *in vivo* y ha mostrado inhibir la inflamación⁶ y disminuir los niveles de ácido úrico sérico⁷ con resultados similares a los de la terapia con colchicina.⁸

La polidatina (resveratrol-3-O-b-mono-D-glucósido) (POLY) es un precursor natural derivado glicosilado del resveratrol, es la forma más abundante de resveratrol en la naturaleza y se encuentra en el jugo de uvas y en la raíz de la planta *Polygonum cuspidatum*. Químicamente es derivado del estilbeno que ha demostrado propiedades antioxidantes y antiinflamatorias,^{9,10} así como un papel neuro, nefro y hepatoprotector.¹¹⁻¹³ Las propiedades antioxidantes de la POLY han sido evaluadas por su acción inhibitoria en la lipoperoxidación¹⁴ y en la capacidad de secuestrar radicales libres como el 2,2-diphenil-1-picrilhidracilo (DPPH).¹⁵ Diversos estudios sugieren que la POLY puede tener propiedades biomédicas similares a las descritas en el resveratrol: anticancerígenas, inhibición de la agregación plaquetaria e inhibición de la oxidación de lipoproteínas de baja densidad (por sus siglas en inglés LDL).¹⁶ Un estudio realizado en células mononucleares de sangre

periférica humana demostró la capacidad de la POLY de disminuir la producción de interleucina-17, así como de ERO en células endoteliales expuestas a H₂O₂.^{17,18}

Puesto que la gota es una patología con un fuerte componente inflamatorio y oxidante, se propuso realizar un estudio para valorar la capacidad antioxidante de la POLY utilizándola como pretratamiento en un modelo *in vitro* de monocitos expuestos a CUM y de esta manera sugerir su aplicación para prevenir los efectos oxidantes desencadenados durante un ataque de gota y así promover su potencial terapéutico.

Métodos

Cultivo celular

La línea celular THP-1 de monocitos se obtuvo de la *American Type Culture Collection* (Rockville, MD, USA). Las células fueron cultivadas con medio de cultivo (*Roswell Park Memorial Institute* [RPMI]) 1640 suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) y 1% de penicilina-estreptomina en condiciones controladas de humedad y temperatura.

Análisis del estrés oxidante celular

Los monocitos THP-1 fueron activados durante tres horas con forbol 12-miristato-13-acetato (PMA; Sigma-Aldrich) a una concentración de 100 ng/mL e incubados toda la noche con RPMI suplementado. Posteriormente, las células fueron estimuladas utilizando CUM (0.050 mg/mL; Invivo-Gen) a tiempos de 1, 2, 4, 6 y 24 horas en RPMI al 2% de SFB. Para evaluar el efecto antioxidante de la POLY, los monocitos activados fueron pretratados a dosis de 10, 100 y 200 μM de POLY por 24 horas en medio RPMI al 2% de SFB y fueron expuestos a 0.050 mg/mL de CUM por 24 horas. Células sin estímulo sirvieron de control.

Los monocitos THP-1 pretratados con POLY por 24 horas y estimulados con CUM durante el mismo periodo de tiempo se lavaron con PBS y se incubaron durante 30 min a 37 °C con CellROX Deep Red a una

concentración final de 5 μM , el cual una vez que es oxidado por las ERO emitió una señal fluorométrica (640/665 nm) que fue observada con un microscopio de epifluorescencia (EVOS; FL Auto Cell Imaging System) y cuantificada usando un citómetro basado en imágenes (Tali; Life Technologies). El análisis de los datos se reportó como unidades arbitrarias de fluorescencia (UAF).

Análisis estadístico

Todos los experimentos fueron realizados por triplicado. El análisis estadístico se efectuó utilizando el programa GraphPad Prism v. 6.0 mediante análisis de varianza de una vía, seguido de un análisis *post hoc* de Dunnet y Tukey, dependiendo de las comparaciones a realizar. Valores de $p < 0.05$ se consideraron estadísticamente significativos.

Resultados

Efecto oxidante de los CUM en la línea celular de monocitos THP-1

Dependiendo el tiempo de exposición a CUM, los monocitos THP-1 indujeron la producción intracelular de ERO, observándose un pico máximo a las 24 horas de exposición a CUM. En este tiempo fue posible apreciar un incremento de ERO de 5.71 UAF ($p < 0.05$) en comparación con los THP-1 sin estímulo (1.0 UAF) (Figura 1).

Efecto antioxidante de la POLY en monocitos expuestos a CUM

En los monocitos que fueron expuestos a CUM y recibieron el pretratamiento con POLY a dosis de 10, 100 y 200 μM durante 24 horas, la producción de ERO disminuyó de forma significativa de manera dosis-dependiente a 1.95, 1.41 y 0.93 UAF respectivamente en comparación con los monocitos que no recibieron el pretratamiento con POLY (5.71 UAF, $p < 0.05$). A pesar de la estimulación con CUM, el pretratamiento con POLY 200 μM (0.93 UAF) inhibe la producción de ERO a valores similares al grupo control (1.0 UAF) (Figura 2). Cabe destacar que en los monocitos pretratados con la POLY (10, 100 y 200 μM) que no fueron estimulados con CUM no se modifica el estado REDOX de los monocitos con respecto al control, en el caso de la POLY 10 μM indujo 1.39 UAF para la de 100 μM : 1.36 UAF y en el de 200 μM : 0.95 UAF (Figura 3).

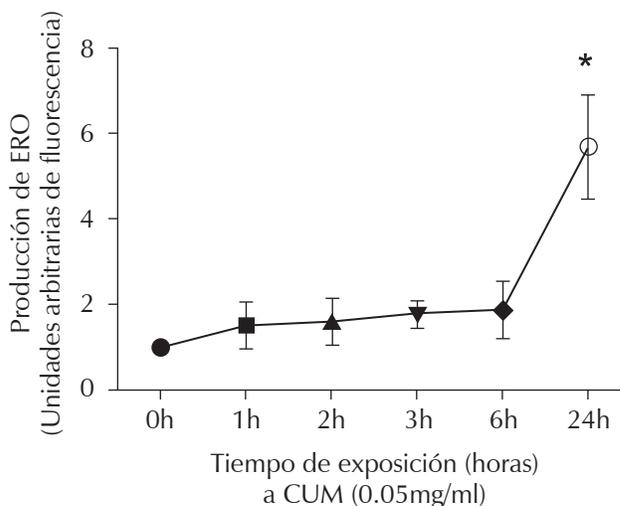


Figura 1. Los CUM incrementan la producción de ERO en monocitos a las 24 horas. Se muestra la cuantificación de la producción de ERO por diferentes tiempos (0, 1, 3, 6, 24 h) de exposición a CUM en monocitos, mediante citometría basada en imagen. Los valores se expresan como la media \pm la desviación estándar de tres experimentos independientes * $p < 0.05$ versus el control (*post hoc* de Dunnet). La fluorescencia de las células se expresa como unidades arbitrarias de fluorescencia (UAF).

Discusión

Este estudio evidenció la actividad antioxidante de la POLY en un modelo *in vitro* de estrés oxidante inducido por CUM. Existen reportes que describen que en células THP-1 estimuladas con CUM, la producción de ERO está relacionada con la activación de la NADPH oxidasa,¹⁹ mientras que el efecto protector de la POLY contra la producción de ERO fue reportado por Fabris et al. 2008, quienes evidenciaron la acción preventiva en contra de la peroxidación de lípidos y la capacidad de eliminar radicales libres como el DPPH.¹⁵

Recientemente se ha demostrado que la POLY puede disminuir el contenido de marcadores de estrés oxidante como el malondialdehído (MDA) y es capaz de promover la actividad de enzimas antioxidantes como superóxido dismutasa (SOD), catalasa y glutatión peroxidasa (GSH-Px) a nivel plasmático en un modelo de ratón,²⁰ incluso se ha indicado que la actividad antioxidante de la POLY es más potente que la del resveratrol en un estudio *in vitro*.²¹

En nuestro estudio observamos una disminución de ERO cuando se utiliza la POLY como pretratamiento, resaltando la capacidad protectora de la molécula

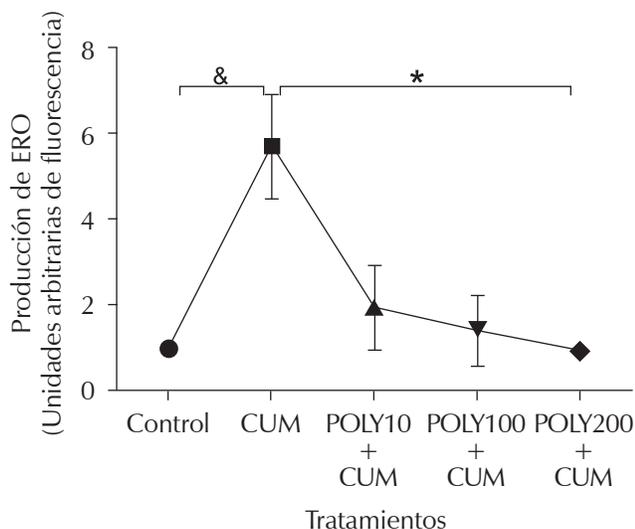


FIGURA 2. LA POLY DECRECE LA PRODUCCIÓN DE ERO EN MONOCITOS EXPUESTOS A CUM. SE MUESTRA LA CUANTIFICACIÓN DE LAS CÉLULAS CON PRODUCCIÓN DE ERO INTRACELULAR MEDIANTE CITOMETRÍA BASADA EN IMAGEN. LOS VALORES SE EXPRESAN COMO LA MEDIA \pm LA DESVIACIÓN ESTÁNDAR DE TRES EXPERIMENTOS INDEPENDIENTES (&P < 0.05 VERSUS EL CONTROL) Y (*P < 0.05 VERSUS TRATAMIENTOS) CON *POST HOC* DE TUKEY. LA FLUORESCENCIA DE LAS CÉLULAS SE EXPRESA COMO UAF.

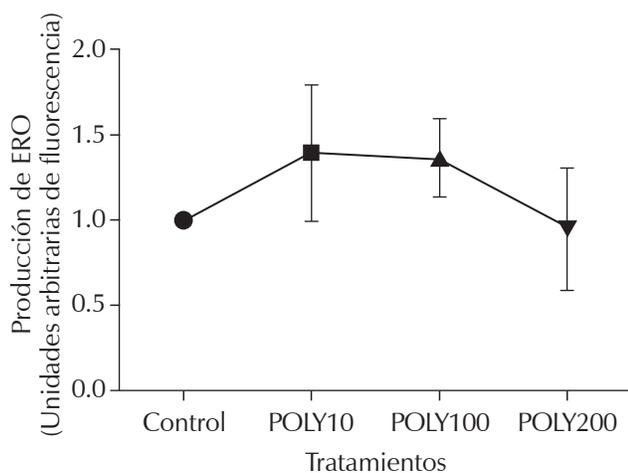


Figura 3. ERO inducidas por POLY en monocitos. Se muestra la cuantificación de la producción intracelular de ERO de las células pretratadas con POLY 24 horas mediante citometría basada en imagen. Los valores se expresan como la media \pm la desviación estándar de tres experimentos independientes con *post hoc* de Dunnet. La fluorescencia de las células se expresa como UAF.

ante estímulos de daño por CUM. Esta propiedad de protección coincide con Chen et al. 2015, los cuales mostraron que la POLY tiene una fuerte propiedad antioxidante sistémica en un modelo de enfermedad de Parkinson, en el cual se asoció el efecto de la POLY como neuroprotector debido a la reducción en los niveles de MDA después de un tratamiento con POLY.¹¹

Los efectos protectores de la POLY también se observaron en células endoteliales de cordón umbilical expuestas a H₂O₂, en las que la POLY mejoró la viabilidad celular, inhibió la producción de ERO y elevó el contenido de enzimas antioxidantes como la GSH-Px y la SOD.²² Adicionalmente, un modelo *in vitro* e *in vivo* de daño por radiaciones ultravioleta demostró que la POLY reduce la muerte celular mediada por ERO.²³

Últimamente se ha sugerido que el mecanismo por el cual la POLY suprime el estrés oxidante en las células es a través de la activación de la enzima óxido nítrico sintasa inducible (eNOS) y de Sirtuina 1 (SIRT1). SIRT1 es un factor clave que regula las respuestas de las células al estrés oxidante;^{18,24} sin embargo, hay quienes indican que es debido a la regulación de la vía de Nrf2/ARE.²⁵

Nuestros resultados concluyen que la POLY posee propiedades antioxidantes en un modelo de estrés oxidante inducido por CUM, lo que sugiere su uso coadyuvante en artropatías microcristalinas. Este hallazgo puede tener implicaciones en la utilización de esta molécula en la prevención y atenuación de enfermedades inflamatorias y oxidantes como la gota, para mejorar la viabilidad celular al microambiente inducido por los cristales. No obstante, deben realizarse estudios más amplios que permitan identificar los mecanismos moleculares que confieren a la POLY las características antioxidantes antes descritas.

Bibliografía

1. Zamudio-Cuevas Y, Martínez-Flores K, Fernández-Torres J, Loissell-Baltazar YA, Medina-Luna D, López-Macay A et al. Monosodium urate crystals induce oxidative stress in human synoviocytes. *Arthritis Res Ther.* 2016; 18 (1): 117.
2. Martinon F, Pétrilli V, Mayor A, Tardivel A, Tschopp J. Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome. *Nature.* 2006; 440 (7081): 237-241.
3. Harijith A, Ebenezer DL, Natarajan V. Reactive oxygen species at the crossroads of inflammasome and inflammation. *Front Physiol.* 2014; 5: 352.
4. Firuzi O, Miri R, Tavakkoli M, Saso L. Antioxidant therapy: current status and future prospects. *Curr Med Chem.* 2011; 18 (25): 3871-3888.
5. Tanigawa T, Kanazawa S, Ichibori R, Fujiwara T, Magome T, Shingaki K et al. (+)-Catechin protects

- dermal fibroblasts against oxidative stress-induced apoptosis. *BMC Complement Altern Med*. 2014; 14: 133.
6. Chung YH, Chung DH, Lee WW. Inhibition of phosphorylation of 4E-BP1 by resveratrol suppresses monosodium urate crystal-induced production of interleukin-1 β in human monocytes (IRM5P.646). *J Immunol*. 2015; 194: 59.11.
 7. Chen H, Zheng S, Wang Y, Zhu H, Liu Q, Xue Y et al. The effect of resveratrol on the recurrent attacks of gouty arthritis. *Clin Rheumatol*. 2016; 35 (5): 1189-1195.
 8. Wang P, Ren D, Chen Y, Jiang M, Wang R, Wang YG. Effect of sodium alginate addition to resveratrol on acute gouty arthritis. *Cell Physiol Biochem*. 2015; 36 (1): 201-207.
 9. Ravagnan G, De Filippis A, Carteni M, De Maria S, Cozza V, Petrazzuolo M et al. Polydatin, a natural precursor of resveratrol, induces β -defensin production and reduces inflammatory response. *Inflammation*. 2013; 36 (1): 26-34.
 10. De Maria S, Scognamiglio I, Lombardi A, Amodio N, Caraglia M, Carteni M et al. Polydatin, a natural precursor of resveratrol, induces cell cycle arrest and differentiation of human colorectal Caco-2 cell. *J Transl Med*. 2013; 11: 264.
 11. Chen Y, Zhang DQ, Liao Z, Wang B, Gong S, Wang C et al. Anti-oxidant polydatin (piceid) protects against substantia nigral motor degeneration in multiple rodent models of Parkinson's disease. *Mol Neurodegener*. 2015; 10: 4.
 12. Liu HB, Meng QH, Huang C, Wang JB, Liu XW. Nephroprotective effects of polydatin against ischemia/reperfusion injury: a role for the PI3K/Akt signal pathway. *Oxid Med Cell Longev*. 2015; 2015: 362158.
 13. Zhang J, Tan Y, Yao F, Zhang Q. Polydatin alleviates non-alcoholic fatty liver disease in rats by inhibiting the expression of TNF- α and SREBP-1c. *Mol Med Rep*. 2012; 6 (4): 815-820.
 14. Ince S, Avdatek F, Demirel HH, Arslan-Acaroz D, Goksel E, Kucukkurt I. Ameliorative effect of polydatin on oxidative stress-mediated testicular damage by chronic arsenic exposure in rats. *Andrologia*. 2016; 48 (5): 518-524.
 15. Fabris S, Momo F, Ravagnan G, Stevanato R. Antioxidant properties of resveratrol and piceid on lipid peroxidation in micelles and monolamellar liposomes. *Biophys Chem*. 2008; 135 (1-3): 76-83.
 16. Deng YH, Alex D, Huang HQ, Wang N, Yu N, Wang YT et al. Inhibition of TNF- α -mediated endothelial cell-monocyte cell adhesion and adhesion molecules expression by the resveratrol derivative, trans-3,5,4'-trimethoxystilbene. *Phytother Res*. 2011; 25 (3): 451-457.
 17. Lanzilli G, Cottarelli A, Nicotera G, Guida S, Ravagnan G, Fuggetta MP. Anti-inflammatory effect of resveratrol and polydatin by *in vitro* IL-17 modulation. *Inflammation*. 2012; 35 (1): 240-248.
 18. Ma Y, Gong X, Mo Y, Wu S. Polydatin inhibits the oxidative stress-induced proliferation of vascular smooth muscle cells by activating the eNOS/SIRT1 pathway. *Int J Mol Med*. 2016; 37 (6): 1652-1660.
 19. Jhang JJ, Cheng YT, Ho CY, Yen GC. Monosodium urate crystals trigger Nrf2- and heme oxygenase-1-dependent inflammation in THP-1 cells. *Cell Mol Immunol*. 2015; 12 (4): 424-434.
 20. Wang HL, Gao JP, Han YL, Xu X, Wu R, Gao Y et al. Comparative studies of polydatin and resveratrol on mutual transformation and antioxidative effect *in vivo*. *Phytomedicine*. 2015; 22 (5): 553-559.
 21. Su D, Cheng Y, Liu M, Liu D, Cui H, Zhang B et al. Comparison of piceid and resveratrol in antioxidation and antiproliferation activities *in vitro*. *PLoS One*. 2013; 8 (1): e54505.
 22. Qiao H, Chen H, Dong Y, Ma H, Zhao G, Tang F et al. Polydatin attenuates H₂O₂-induced oxidative stress via PKC pathway. *Oxid Med Cell Longev*. 2016; 2016: 5139458.
 23. He YD, Liu YT, Lin QX, Zhu J, Zhang Y, Wang LY et al. Polydatin suppresses ultraviolet B-induced cyclooxygenase-2 expression *in vitro* and *in vivo* via reduced production of reactive oxygen species. *Br J Dermatol*. 2012; 167 (4): 941-944.
 24. Li P, Wang X, Zhao M, Song R, Zhao KS. Polydatin protects hepatocytes against mitochondrial injury in acute severe hemorrhagic shock via SIRT1-SOD2 pathway. *Expert Opin Ther Targets*. 2015; 19 (7): 997-1010.
 25. Chen M, Hou Y, Lin D. Polydatin protects bone marrow stem cells against oxidative injury: involvement of Nrf2/ARE pathways. *Stem Cells Int*. 2016; 2016: 9394150.