



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

FACULDADE DE CIENCIAS DA SAÚDE

MESTRADO EN ASISTENCIA E INVESTIGACIÓN SANITARIA

ESPECIALIDADE: FUNDAMENTOS DA INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA

Curso académico 2013-2014

TRABALLO DE FIN DE MESTRADO

**Estudio de Mecanismos de Comunicación
Celular en Condrocitos Articulares Humanos:
Posible Implicación en el Desarrollo de la
Artrosis y Búsqueda de una Diana
Terapéutica.**

Marta Varela Eirín

20 de Xuño de 2014

María D. Mayán Santos, doutora en Bioloxía e investigadora Isidro Parga Pondal do Complexo Universitario de A Coruña (INIBIC) e Fundación Profesor Novoa Santos.

INFORMA:

Que Marta Varela Eirín, Licenciada en Bioloxía, realizou o traballo titulado “Estudio de Mecanismos de Comunicación Celular en Condrocitos Articulares Humanos: Posible Implicación en el Desarrollo de la Artrosis y Búsqueda de una Diana Terapéutica” no INIBIC baixo a miña dirección e para que así conste, firmo o presente certificado en A Coruña, a 20 de Xuño de 2014.

Dra. María D. Mayán Santos

Investigadora Isidro Parga Pondal

(INIBIC)

ÍNDICE

1.- Abreviaturas.....	4
2.- Resumen.....	6
3.- Introducción.....	10
4.- Material y métodos.....	18
4.1.- Obtención de las muestras de cartílago.....	18
4.2.- Obtención y cultivo primario de condrocitos.....	18
4.3.- Línea celular condrocítica HCS/2-8.....	19
4.4.- Diseño de un vector para disminuir la expresión de la Cx43.....	19
4.5.- Ensayo MTT.....	20
4.6.- Vector utilizado para sobreexpresar la Cx43.....	21
4.7.- Transformación en células competentes DH5 α TM	23
4.8.- Purificación analítica de ADN plasmídico.....	23
4.8.1.- Validación de la transformación y análisis de los fragmentos de restricción.....	24
4.8.2.- Análisis de la secuencia del inserto: Secuenciación.....	24
4.9.- Selección final de transformantes y extracción de ADN plasmídico.....	25
4.10.- Métodos de transfección: Transfección HCS/2-8.....	26
4.10.1.- Método químico: lípidos catiónicos.....	26
4.10.2.- Método físico: electroporación.....	27

4.10.3.- Método químico: polímeros catiónicos.....	27
4.11.- Tratamiento y cultivo de explantes de cartílago.....	28
4.12.- Ensayos de inmunohistoquímica.....	29
4.13.- Análisis de expresión génica.....	30
4.14.- Modelo animal para estudio <i>in vivo</i>	31
4.14.1.- Prueba de inducción de daño	31
4.14.2.- Tratamiento con MASL.....	32
5.- Resultados.....	33
5.1.- Ensayo MTT.....	33
5.2.- Análisis de clones de la cepa DH5 α TM de <i>E. coli</i>	34
5.2.1.- siRNA.....	34
5.2.2.- Sobreexpresión.....	36
5.3.- Transfección línea HCS/2-8.....	39
5.3.1.- Transfección con Lipofectamina.....	39
5.3.2.- Electroporación.....	40
5.3.3.- Transfección con CANFAST.....	40
5.4.- Análisis de explantes de cartílago tratados con MASL.....	41
5.5.- Inducción de daño en ratones con LPS.....	43
6.- Discusión.....	45
7.- Conclusiones.....	47
8.- Agradecimientos.....	47
9.- Bibliografía.....	48

1.- ABREVIATURAS

ADNc– Ácido desoxirribonucleico complementario

Amp –Ampicilina

BSA – *Bovine serum albumin*; Albúmina de suero bovino

CHUAC – Complejo Hospitalario Universitario de A Coruña

CMV – Citomegalovirus

COX-2 – Ciclooxygenasa 2

Cx43 – Conexina 43

Cxs – Conexinas

DAB – 3,3'-diaminobenzidina tetrahidroclorada

DAPI – 4',6-diamino-2-fenilindol

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

FCS – *Fetal Calf Serum*; Suero de ternero recién nacido

GFP – *Green Fluorescent protein*; Proteína verde fluorescente

GJ – *Gap Junctions*; Uniones Comunicantes

GlcNAc – *N-acetilgalactosamina*

IL-6 – Interleuquina 6

Kb – Kilobases

LB – Luria Bertani

LPS – Lipopolisacáridos de *Salmonella enterica*

MASL – *Maackia amurensis seed lectin*

MEB – Microscopio electrónico de barrido

MEC – Matriz Extracelular

MMP-3 – Metaloproteasa 3

MMP-13 – Metaloproteasa 13

MTT – 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltretrazol

OA – *Osteoarthritis*; Artrosis

PBS – *Phosphate buffered saline*; Tampón fosfato salino

PBST –*PBS with Tween*; Tampón fosfato salino con Tween

PCR – *Polymerase chain reaction*; Reacción en cadena de la polimerasa

PGs – Proteoglicanos

P/S – Penicilina/ Estreptomina

ROS – *Reactive oxygen species*; Especies reactivas de oxígeno.

RT-PCR – *Real Time PCR*; PCR en tiempo real

SFB – Suero fetal bovino

SiaTs – Sialiltransferasas

siRNA – ARN interferente

VSV-G – Proteína G del virus de la estomatitis vesicular

2.- RESUMEN

El cartílago articular es un tejido que recubre la superficie de los huesos en las articulaciones y permite el movimiento del esqueleto sin que se produzca dolor y fricción entre las superficies óseas. Los condrocitos articulares son las células responsables del mantenimiento del cartílago durante la vida adulta. La artrosis se caracteriza por la degeneración progresiva del cartílago articular. Los condrocitos se comunican entre sí a través de canales formados por conexina 43 (Cx43) y denominados *Gap Junctions* (GJs). La actividad y presencia de estos canales podrían ser esenciales para mantener la homeostasis y correcto funcionamiento del tejido modulando la comunicación célula-célula y célula-matriz. Además, la Cx43 posee múltiples funciones independientes de la actividad de los canales, y la sobreexpresión de Cx43 se correlacionó con la degeneración de la matriz extracelular del cartílago articular. En este trabajo de Máster hemos decidido investigar las funciones de la Cx43 en condrocitos de donantes sanos y artrósicos, con el objetivo de encontrar alguna alteración funcional que pueda explicar el cambio de fenotipo celular que ocurre en los condrocitos de los pacientes que sufren artrosis. Para ello, hemos diseñado un vector que contiene una secuencia de siRNA para disminuir la expresión de la Cx43 y un segundo vector para sobreexpresar este gen, pudiendo estudiar de esta manera los efectos de la Cx43 en expresión génica, proliferación y fenotipo celular. Por otro lado, también decidimos estudiar el efecto de la glicosilación de proteínas, incluida la Cx43, presentes en el cartílago y en la membrana de los condrocitos y relacionadas con la adhesión y comunicación celular. Para ello utilizamos la lectina denominada MASL que se une específicamente a residuos terminales de ácido siálico α -2,3, modificación que ha sido relacionada con el desarrollo de artrosis y artritis reumatoide.

Los resultados obtenidos demuestran que concentraciones nanomolares de MASL protegen la estructura y composición del cartílago frente a un

insulto o dano que desencadena a degradación da matriz extracelular por incremento de mediadores proinflamatorios ou metaloproteasas.

RESUMO

A cartilaxe articular é un tecido que recobre a superficie dos ósos nas articulacións e permite o movemento do esqueleto sen que se produza dor ou rozamento entre as superficies óseas. Os condrocitos articulares son as células responsables do mantemento da cartilaxe durante a vida adulta. A artrose caracterízase pola dexeneración progresiva da cartilaxe articular. Os condrocitos comunícanse entre sí a través dos canais formados por conexina 43 (Cx43) e denominados *Gap Junctions* (GJs). A actividade e presenza destes canais poderían ser esenciais para manter a homeostase e correcto funcionamento do tecido modulando a comunicación célula-célula e célula-matriz. Ademais, a Cx43 posúe múltiples funcións independentes da actividade dos canais, e a sobreexpresión de Cx43 correlacionouse coa dexeneración da matriz extracelular da cartilaxe articular. Neste traballo de Mestrado decidimos investigar as funcións da Cx43 en condrocitos de donantes sáns e artrósicos, co obxectivo de encontrar algunha alteración funcional que poida explicar o cambio de fenotipo celular que ocorre nos condrocitos dos pacientes que sofren artrose. Para levalo a cabo, deseñamos un vector que contén a secuencia de siRNA para disminuir a expresión da Cx43 e un segundo vector para sobreexpresar este xene, poidendo estudar desta maneira os efectos da Cx43 na expresión xénica, proliferación e fenotipo celular. Por outro lado, tamén decidimos estudar o efecto da glicosilación de proteínas, incluída a Cx43 de proteínas, incluída a Cx43, presentes na cartilaxe e na membrana dos condrocitos e implicadas en adhesión e comunicación celular. Para facelo utilizamos a lectina chamada MASL que se une especificamente a residuos terminais

de ácido siálico α -2,3, modificación que foi relacionada co desenvolvemento da artrose e artrite reumatoide. Os resultados obtidos demostran que concentracións nanomolares de MASL protexen a estrutura e composición da cartilaxe fronte a un dano que da lugar a unha degradación da matriz extracelular por increment de mediadores proinflamatorios ou metaloproteasas.

ABSTRACT

Articular cartilage is a tissue that covers the surfaces of articular bones allowing the painless movement of the skeleton. Articular chondrocytes are the cells responsible for the synthesis and maintenance of cartilage during adult life. Osteoarthritis is characterized for the progressive degeneration of cartilage. Chondrocytes communicate each other through channels formed by connexin 43 (Cx43) called Gap Junctions (GJs). The presence of functional GJs channels might be essential to the maintenance of the homeostasis and proper functioning of the tissue by modulating the cell-cell and cell-matrix communication. Moreover, Cx43 has multiple functions independently of the activity of channels, and the overexpression of Cx43 was correlated with the degeneration of the extracellular matrix of articular cartilage. In this research work we have decided to investigate the functions of Cx43 in chondrocytes from healthy and osteoarthritic donors, with the goal of finding some functional impairment that might explain the change in the phenotype that it is observed in osteoarthritic chondrocytes. For this purpose, we have designed (i) a vector containing a siRNA sequence in order to reduce the Cx43 expression, and (ii) a vector to overexpress Cx43. We will investigate the role of Cx43 in gene expression, cell growth, proliferation and phenotype. Furthermore, we have also decided to study the effect of the glycosylation of glycoproteins, including Cx43, presented in the

cartilage and in the membrane of chondrocytes, and related with cell adhesion and cell communication. We have used a lectin called MASL that specifically binds to terminal residues of α -2, 3 sialic acid, modification that has been previously associated with the development of osteoarthritis and rheumatoid arthritis. The results presented here show that nanomolar concentrations of MASL can preserve cartilage structure when cartilage or primary chondrocytes are treated with oligomycin, which triggers the extracellular matrix degradation through the increase of inflammatory cytokines or metalloproteinase.

3.- INTRODUCCIÓN

Las superficies de los huesos de las articulaciones se encuentran recubiertas de un tejido conectivo denominado cartílago articular (Figura 1) necesario para su correcto funcionamiento al proporcionar una superficie con bajo coeficiente de fricción¹. El cartílago articular de adultos es un tejido avascular, aneuronal y alinfático compuesto por dos partes: una matriz extracelular (MEC) y un único tipo celular descrito denominado condrocito².

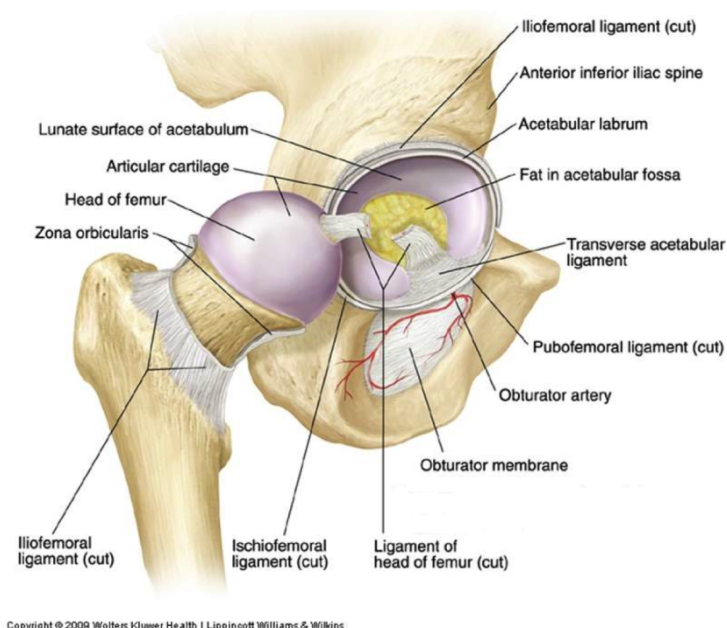


Figura 1. Articulación de la cadera en la que se puede observar el cartílago en color violeta en la cabeza del fémur y en el acetábulo de la pelvis (Adaptado de: Tank PW, Gest TR. Lippincott Williams & Wilkins Atlas of Anatomy. 1ª Ed. 2009.)

La composición de la matriz extracelular determina la capacidad del cartílago para absorber las distintas fuerzas a las que es sometido el esqueleto. Dentro de la MEC podemos encontrar: (i) fibras de colágeno, especialmente colágeno tipo II; (ii) proteoglicanos (PGs) cargados negativamente y localizado entre la malla de fibras de colágeno, atrayendo cationes y (iii) agua, además de otros componentes entre los que destacan gran cantidad de glicoproteínas³. El contenido de agua en la

MEC es variable, constituyendo entre un 60-80% del peso total y encontrándose principalmente asociada a aglomeraciones de agregano-hialurano⁴. Los condrocitos son células altamente especializadas embebidas en la MEC, dentro de pequeñas lagunas denominadas condroplastos. Su función celular es la síntesis, mantenimiento y reparación de la propia matriz extracelular. En el cartílago se produce un equilibrio entre la síntesis y degradación de la MEC y si alguno de estos procesos se ve alterado, su composición y propiedades cambiarán, lo que repercutiría en alteraciones funcionales de la articulación³.

El cartílago articular adulto puede dividirse en cuatro capas diferenciadas (Figura 2): (i) superficial o tangencial, (ii) intermedia o transicional, (iii) profunda o radial y (iv) zona calcificada. Cada una de estas regiones presenta una diferente subpoblación de condrocitos que difieren en morfología (desde discoidal a esferoidal), distribución dentro de la MEC y actividad metabólica².

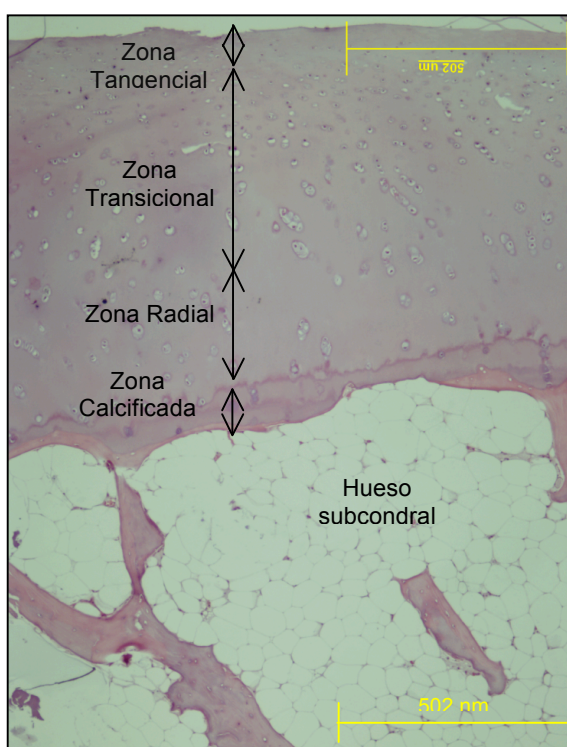


Figura 2. Zonas del cartílago articular en un corte histológico teñido con Hematoxilina-Eosina. La *Tidemark* es el margen visible con esta técnica que marca el inicio de la zona calcificada.

La artrosis (OA) es la enfermedad reumática más común, siendo una importante causa de discapacidad y pérdida de calidad de vida especialmente en la población mayor de 60 años. La OA supone una degeneración progresiva del cartílago articular, afectando principalmente a manos, rodillas, caderas y columna vertebral⁵. Durante el desarrollo de la OA se observa una primera pérdida gradual de PGs y posteriormente de la MEC, con degradación de la red de colágeno debido al aumento en la síntesis de colagenasas y otras proteasas como, por ejemplo, la metaloproteasa 13 (MMP-13)⁶. Los condrocitos artrósicos presentan mayores niveles de proliferación celular e incrementan la síntesis proteica, aumentando la producción de enzimas degradadoras, dando lugar a una reestructuración de la matriz y pérdida de las propiedades físicas del cartílago que son las responsables de la correcta función del tejido¹.

A pesar de que la OA es una enfermedad con alta prevalencia en todo el mundo y de que supone un importante gasto sanitario, no existe una cura ni tratamiento eficaz para combatirla. La etiología de la OA no está clara, destacándose la edad y peso como factores de riesgo. Sin embargo, diversos estudios indican que existen factores genéticos que pueden causar predisposición a su desarrollo, especialmente en la artrosis de aparición temprana^{5, 7, 8}.

Las conexinas (Cxs) son proteínas transmembrana implicadas en comunicación celular; son sintetizadas en el Retículo Endoplasmático Rugoso y viajan al Aparato de Golgi donde oligomerizan para ser transportadas a la membrana plasmática, ejerciendo en esta estructura su función. En la membrana, las conexinas se organizan en grupos de seis formando hemicanales o conexones (Figura 3). Cuando los hemicanales de dos células adyacentes se unen forman lo que se conoce como uniones comunicantes o *Gap Junctions* (GJ) y a través de ellas las células pueden intercambiar pequeñas moléculas hidrofílicas menores de 1 KDa tales como nutrientes, aminoácidos esenciales o segundos mensajeros^{9,10}. Existen por lo menos 21 tipos distintos de conexinas en

humanos y, aunque en general las conexas presentan una estructura muy conservada, aparecen dominios variables entre las distintas isoformas que otorgan a las GJs diferentes propiedades biofísicas y mecanismos de regulación¹¹.

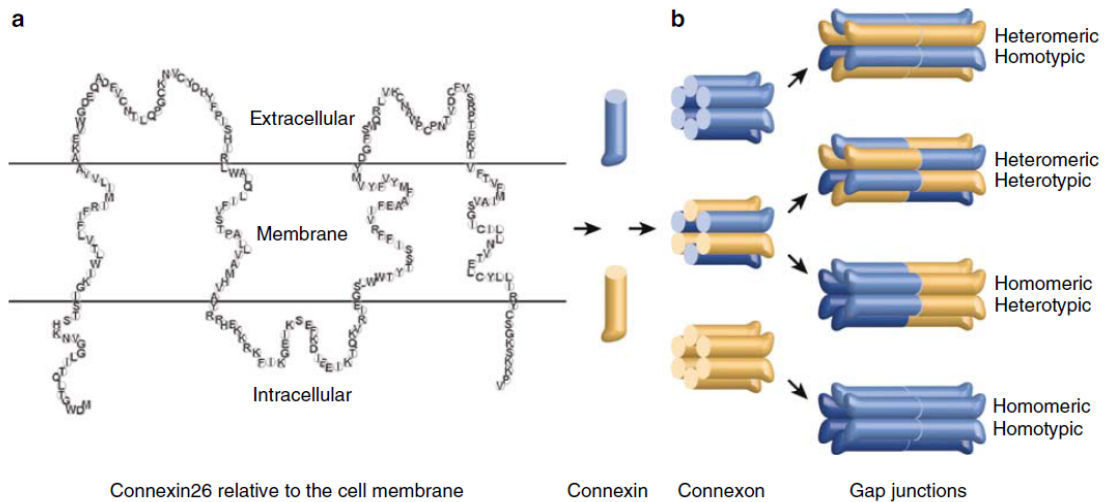


Figura 3. Representación esquemática de los dominios de conexas (Cxs) y estructura de las *Gap Junctions* (GJs). **a.** Las Cxs presentan cuatro dominios transmembrana, dos extracelulares y tres dominios citoplasmáticos donde podemos destacar el dominio C-terminal por su importancia en la regulación de la función y estabilidad de la proteína. **b.** Seis conexas oligomerizan para formar un conexón, y cuando dos de ellos se alinean pueden dar lugar a una GJ, que serán de distinto tipo dependiendo del tipo de Cxs que lo formen. Meçe G, Richard G, White TW. *Gap Junctions: Basic Structure & Function.* J Invest Dermatol. 2007; 127: 2516-2524.

Resultados recientemente publicados por nuestro grupo de investigación demuestran que los condrocitos en tejido presentan proyecciones citoplasmáticas de entre 5-150 μm de longitud y unos 200 nm de anchura que comunican físicamente condrocitos localizados en lagunas distantes¹². Estas proyecciones fueron primero observadas en microscopía óptica convencional y microscopía confocal, siendo posteriormente confirmadas mediante microscopía electrónica de barrido (MEB) (Figura 4). La comunicación célula-célula¹² y célula-matriz¹³ se produce a través de los canales de conexas formados por conexina 43 (Cx43).

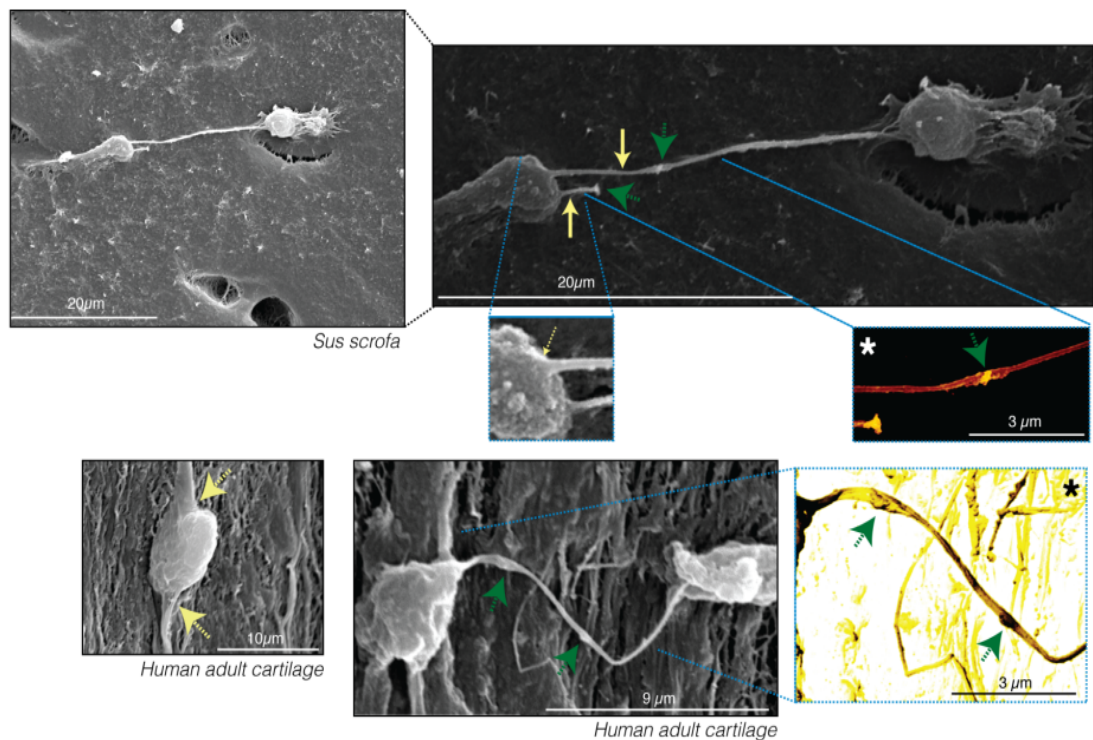


Figura 4. Proyecciones citoplasmáticas observadas mediante MEB en *Sus scrofa* y cartílago humano adulto (Mayan MD, Gago-Fuentes R, Carpintero-Fernandez P, Fernandez-Puente P, Filgueira-Fernandez P, Goyanes N *et al.* Articular chondrocyte network mediated by gap junctions: role in metabolic cartilage homeostasis. *Ann Rheum Dis.* 2013; Nov 13 doi: 10.1136/annrheumdis-2013-204244). Las flechas amarillas señalan las proyecciones citoplasmáticas. Las flechas verdes sugieren presencia de vesículas u otros componentes en la proyección.

Mediante el uso de las técnicas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), Western Blot, inmunohistoquímica, *Dual Voltage-Clamp method* y *Whole-cell/perforated patch method* nuestro grupo ha demostrado que los condrocitos de donantes adultos expresan altos niveles de Cx43 y la comunicación célula-célula ocurre a través de canales voltaje-dependientes, las GJ¹⁴. A través de estos canales los condrocitos son capaces de intercambiar moléculas como el colorante *Lucifer Yellow*, oligonucleótidos tipo ARN interferente (siRNA), glucosa y aminoácidos esenciales como la arginina o lisina^{12, 14}.

Los resultados publicados en la revista *American Journal of Pathology*¹⁴ demostraron una mayor positividad de Cx43 en donantes OA, de hasta 40

veces mayor que en cartílago sano, además de pérdida de localización en la membrana plasmática en los condrocitos localizados en las capas más profundas de los explantes estudiados. Aumento de los niveles de Cx43 se correlacionaron con incrementos en proliferación celular en el caso de cartílago de pacientes con OA¹⁴. Estos resultados sugieren la posibilidad de que un aumento en esta proteína o una pérdida de localización en la membrana puedan estar relacionados con mecanismos moleculares alterados que puedan explicar el cambio de fenotipo que sufren los condrocitos de donantes artrósicos.

En base a los resultados obtenidos recientemente por nuestro grupo de investigación, hemos decidido estudiar las funciones de la Cx43 en condrocitos de donantes sanos y pacientes con artrosis, en la búsqueda de alguna alteración funcional que pueda explicar el cambio de fenotipo celular que ocurre en pacientes con OA. Con este objetivo, hemos decidido diseñar siRNA para disminuir la expresión de la Cx43 y utilizar un vector para sobreexpresar la Cx43 y poder ver su efecto en expresión génica, proliferación celular y fenotipo celular.

Por otro lado, hemos abierto un segundo estudio basado en el efecto de la glicosilación de proteínas transmembrana -incluida la Cx43- y de matriz extracelular relacionadas con adhesión celular y comunicación célula-célula y célula-matriz.

Las proteínas de la MEC y de la membrana de los condrocitos sufren distintas modificaciones postraduccionales que median la interacción entre célula-célula o células-matriz, siendo la más común la glicosilación. La glicosilación se basa en la adición de carbohidratos de distintos tipos a determinadas proteínas mediante un enlace *N*-glicosídico a un residuo de asparagina (Asn), o mediante enlace *O*-glicosídico a un residuo de serina (Ser) o treonina (Thr)¹⁵. La glicosilación de proteínas depende del tejido o tipo celular y además varía durante el desarrollo o la oncogénesis, entre otros procesos celulares¹⁶. Los ácidos siálicos son azúcares cargados negativamente que suelen encontrarse en posición terminal dentro de los

oligosacáridos añadidos a las glicoproteínas. Los ácidos siálicos son transferidos a las glicoproteínas mediante la acción de la familia de enzimas denominadas sialiltransferasas (SiaTs), enzimas con patrones de expresión distintos entre tejidos y que pueden unir los ácidos siálicos en posición α -2,3, α -2,6 ó α -2,8 siendo las dos primeras posiciones mutuamente excluyentes¹⁷. La sialización α -2,6 puede aparecer en una galactosa terminal o en una *N*-acetilgalactosamina (GlcNAc) terminal o subterminal en vertebrados, mientras que la sialización en posición α -2,3 se encuentra sólo en un residuo de galactosa terminal¹⁸. El cambio de sialización en posición α -2,6 a α -2,3 es capaz de modificar la capacidad de unión de las proteínas al sustrato y por tanto afecta al anclaje celular, comunicación célula-célula, célula-matriz y a la transducción de señales. De hecho, alteraciones en el ratio de sialización en posición α -2,3/ α -2,6 se han visto asociadas, por ejemplo, al desarrollo de diferentes tipos de cáncer¹⁹. Debido a que la presencia de ácidos siálicos terminales en glicoproteínas está relacionada con múltiples funciones celulares, perturbaciones en su síntesis o degradación pueden dar lugar a distintas situaciones patológicas. Cambios en los patrones de sialización también se ha relacionado con enfermedades degenerativas como Alzheimer¹⁸. En el caso del cartílago articular, varios estudios recientes indican que un incremento de glicoproteínas sializadas en posición α -2,3 se podría correlacionar con el cambio de fenotipo celular que experimentan los condrocitos durante el desarrollo de enfermedades reumáticas, incluyendo artritis reumatoide y OA^{17, 20}.

Las lectinas son proteínas de unión específica a carbohidratos. A través de la colaboración con Gary S. Goldberg (*Rowan University, New Jersey*) pudimos obtener una lectina denominada MASL (*Maackia amurensis* seed lectin) que se une de forma específica a *O*-glicoproteínas que contienen ácido siálico terminal en posición α -2,3.

Resultados recientes de nuestro grupo demuestran que la unión del MASL a glicoproteínas sializadas en posición α -2,3 podría atenuar la

degeneración articular e inflamación durante el desarrollo de la OA²¹. De hecho, concentraciones nanomolares de esta lectina (MASL) no afectan a la viabilidad, adhesión o crecimiento celular, pero protegen de forma eficiente del incremento de especies reactivas de oxígeno (ROS), del incremento de mediadores inflamatorios como son la Ciclooxygenasa 2 (COX-2) o Interleuquina 6 (IL-6) y de proteasas como MMP-3 y MMP-13^{21, 22}.

Estos resultados fueron obtenidos utilizando células en cultivo, y debido a los resultados obtenidos decidimos comprobar si el efecto protector del MASL podría ser reproducible sobre explantes de cartílago sometidos a un proceso patológico como puede ser la presencia de un compuesto inhibidor de la ATPasa mitocondrial, denominado oligomicina.

Uno de los objetivos de este trabajo de Máster fue el comienzo de ensayos de experimentación animal utilizando como modelo ratones a los que se les inyectarían lipopolisacáridos de *Salmonella enterica* (LPS) para generar daño e inflamación en la articulación y poder estudiar el posible efecto protector de la lectina *in vivo*.

OBJETIVOS:

1. Estudio del efecto de la disminución y sobreexpresión de la Cx43 en fenotipo celular, proliferación celular y síntesis/degradación de los componentes de la MEC.
2. Estudio del efecto de la lectina MASL en explantes de cartílago en cultivo y en ratones *in vivo* sometidos a condiciones patológicas.

4.- MATERIAL Y MÉTODOS

4.1.- Obtención de las muestras cartílago

Las muestras de cartílago humano adulto se han obtenido de donantes sanos o pacientes con OA que han sido sometidos a cirugía de amputación de miembros inferiores o de sustitución de rodilla o cadera por una prótesis en el Complejo Hospitalario Universitario de A Coruña (CHUAC) y el Hospital San Rafael de A Coruña, a través del Banco de Tejidos del CHUAC y en concreto a través de la colección privada gestionada por el Dr. Francisco Blanco. Se ha obtenido el consentimiento informado de los donantes en cada caso y el estudio ha sido aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica de Galicia (CEICG, 2012/094-PI13/00591).

Se han obtenido explantes o *punches* de cartílago con un diámetro de 4 mm inmediatamente tras la cirugía usando un instrumento similar a un sacabocados (Biopsy Punch BP-40F; Kai Corporation, Japan). Los explantes se han cultivado en placas de 48 pocillos en medio DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's Medium*; Gibco, Life Technologies) sin suero durante toda la noche, cambiándose tras este tiempo a medio DMEM con 0.1 % de suero de ternero recién nacido (FCS, *Fetal Calf Serum*; Gibco, Life Technologies).

4.2.- Obtención y cultivo primario de condrocitos

Las muestras de cartílago se lavaron con suero salino, fueron digeridas en primer lugar mecánicamente con ayuda de un bisturí y posteriormente de manera enzimática con 0.5 mg/mL de Tripsina (Sigma-Aldrich) durante 10 minutos a 37°C. Tras retirar el sobrenadante, que contiene la tripsina pero es carente de condrocitos, la muestra se digirió con 2 mg/mL de Colagenasa tipo IV diluida en medio DMEM suplementado con una mezcla de antibióticos al 1 % (P/S; Penicilina 100 U/mL, Estreptomina

100 µg/mL) y 5 % de Suero Fetal Bovino (SFB) toda la noche a 37 °C y en agitación (Thermoshake, Gerhard). Tras este tiempo, los condrocitos se recogieron del precipitado obtenido al centrifugar el medio durante 10 minutos a 1700 rpm. Las células resuspendidas en DMEM suplementado con 20 % SFB se repartieron en frascos de cultivo de 25 cm² (25·10⁵ células), 75 cm² (2·10⁶ células) ó 162 cm² (3·10⁶ células).

Una vez en los frascos de cultivo, los condrocitos se incubaron en estufas de cultivo a 37 °C, 5 % CO₂ y saturación de humedad hasta alcanzar una confluencia de aproximadamente 80 - 90 %. Se realizó entonces un subcultivo en medio DMEM suplementado con 15 % FCS y 100 µg/mL de Primocín™ (InvivoGen).

4.3.- Línea celular condrocítica HCS/2-8

La línea celular HCS/2-8, generosamente cedida por el grupo de investigación del Dr. Takigawa (*Okayama University, Japan*), procede de células aisladas de un condrosarcoma humano. Presenta características típicas de condrocitos humanos primarios como son la morfología o la producción de colágeno tipo II y proteoglicanos. Las células HCS/2-8 fueron mantenidas en cultivo en medio DMEM suplementado con 10 % SFB y 1% P/S y en condiciones óptimas para su crecimiento (37 °C, 5 % CO₂ y saturación de humedad).

4.4.- Diseño de un vector para disminuir la expresión de la Cx43

Hemos utilizado un plásmido que contiene y expresa la secuencia complementaria a la Cx43 o ARN interferente (siRNA) con el objetivo de disminuir la expresión de este gen. El plásmido pRNAT-CMV3.2/Hygro (Figura 5), proporcionado por GenScript, contiene el promotor de citomegalovirus humano (CMV) para la expresión del inserto (siRNA) y el promotor SV40 para la expresión del gen de resistencia a higromicina, a

modo de marcador de selección. Además, presenta el gen reportero de la proteína verde fluorescente (GFP) que ayuda a la identificación de las células que lo han adquirido al ser excitadas con una longitud de onda de 395 nm ó 475 nm. A este plásmido se le ha introducido un pequeño inserto de 66 pares de bases entre las dianas de restricción de *BamH I* y *Xho I*, que contiene la secuencia del siRNA.

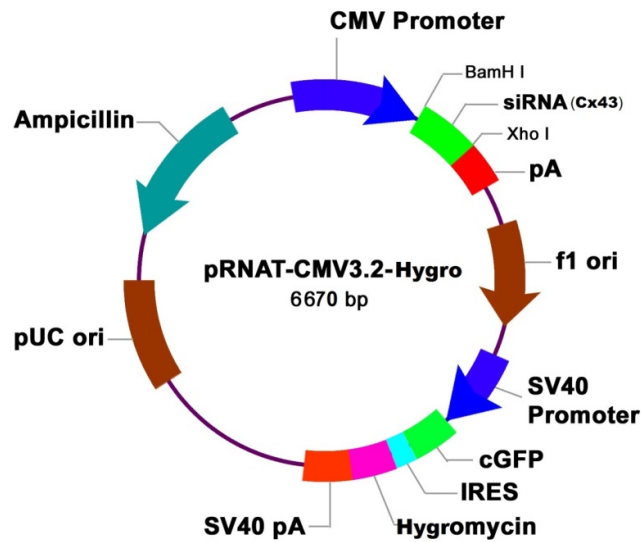


Figura 5. Representación circular del plásmido pRNAT-CMV3.2/Hygro. Puede observarse la localización del inserto, así como los promotores y genes reporteros.

4.5.- Ensayo MTT

Se ha llevado a cabo un ensayo colorimétrico basado en la reducción del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) para determinar la resistencia celular frente al antibiótico higromicina. El MTT, de color amarillo, es reducido por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa a un compuesto de color violeta, el formazán (Figura 6). La cantidad de células vivas va a ser proporcional al formazán producido, o lo que es lo mismo, a la intensidad del color violeta formado.

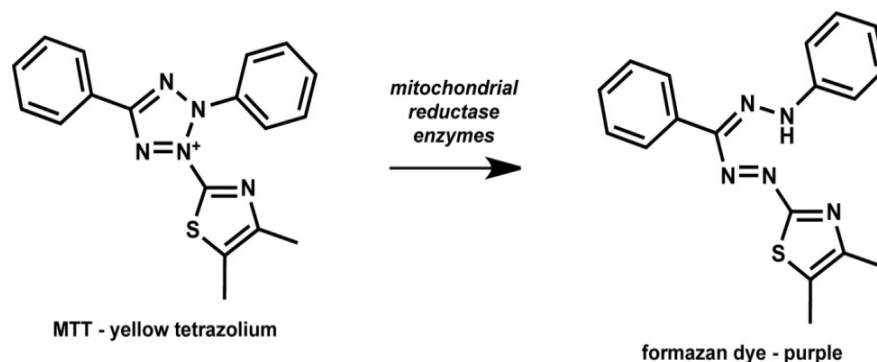


Figura 6. Esquema de la reacción de reducción del MTT para dar lugar a formazán por acción de enzimas mitocondriales.

Para llevar a cabo este ensayo se sembraron condrocitos primarios humanos y condrocitos de la línea HCS/2-8 en placas de 96 pocillos hasta una confluencia aproximada del 60 %. Se ha probado un rango de concentraciones de higromicina B (Invitrogen, Life Technologies) desde 1 µg/mL a 800 µg/mL, añadida directamente sobre el medio de cultivo y dejando un pocillo sin antibiótico como control positivo de crecimiento. Tras 10 días de cultivo se añadió 10 µL del reactivo MTT (Cell Proliferation Kit I; Roche) en cada pocillo para una concentración final de 0.5 mg/mL, incluido un pocillo sin células a modo de control negativo, y se incubó durante 4 horas. Posteriormente se añadió a cada pocillo 100 µL de solución solubilizadora (Dodecilsulfato sódico al 10 % en HCl 0.01 M) para solubilizar los cristales de formazán, y además la higromicina correspondiente para no variar su concentración final. Se incubó toda la noche a 37 °C y se procedió a la medida del color resultante en un lector de microplacas modular (NanoQuant Infinite® 200 PRO, Tecan) a 570 nm. Los datos fueron analizados con el programa GraphPad Prism V.6.

4.6.- Vector utilizado para sobreexpresar la Cx43

Para sobreexpresar el gen de la Cx43 utilizamos un vector cedido generosamente por el Dr. Oleg Tolmachov (*Imperial College, London*).

Este vector se denomina pMLV-Cx43-EGFP (Figura 7), y presenta el gen de la GFP como marcador.

La producción del vector lentiviral se realiza mediante la co-transfección del plásmido pMLV-CX43-EGFP y otros dos plásmidos necesarios para su empaquetamiento dentro de la línea celular Lenti-X 293T (Clontech). El segundo plásmido (pMLV-gag-pol) presenta los genes necesarios para expresar la poliproteína Gag y la poliproteína catalítica GagPol, mientras que el tercer plásmido (pMD2.G) codifica para la proteína G del virus de la estomatitis vesicular (VSV-G), proteína de empaquetamiento que otorga tropismo hacia células de casi cualquier tipo, incluyendo células de mamíferos.

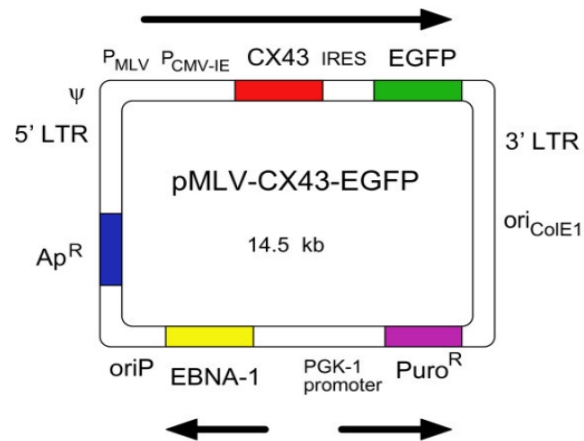


Figura 7. Representación circular del plásmido pMLV-Cx43-EGFP empleado en la obtención de un vector que permita reducir la expresión de la Cx43.

Los tres plásmidos se transcriben en el interior de las células de empaquetamiento: el gen de la Cx43 es ensamblado y transportado a la membrana celular, recubriéndose de la proteína VSV-G. Los viriones maduros salen de la célula y pueden ser recogidos del medio celular. El medio recogido que contiene las partículas virales se utiliza para la transfección de las distintas células dianas.

4.7.-Transformación en células competentes DH5α™

Para la transformación de los plásmidos en bacterias elegimos la cepa competente DH5α™ de *Escherichia coli* (Life Technologies). La introducción del plásmido se realizó mediante choque térmico de un minuto a 42 °C, con 0.2 µg de ADN por cada 150 µL de células *E.coli*. Las células transformadas se sembraron con ayuda de perlas de vidrio en placas Petri con medio Luria Bertani (LB) (Tryptona, extracto de levadura, NaCl) y 70 µg/mL de Ampicilina (Amp). Se dejaron las bacterias creciendo toda la noche a 37 °C y seleccionamos distintos clones para hacer una resiembra en placa, que se dejaron crecer otras 24 horas a 37 °C.

4.8.- Purificación analítica de ADN plasmídico

La extracción de ADN plasmídico de los distintos clones de *E.coli* se llevó a cabo con el kit comercial *Gene Jet Plasmid Miniprep Kit* (Thermo Scientific) basado en la lisis alcalina de las bacterias y el uso de membranas de gel de sílice para retener el ADN. Para llevarlo a cabo se recogieron los clones de la placa con un palillo estéril y se depositaron sobre tubos Eppendorf con 250 µL de una solución tampón con RNasa. Una vez disuelta la masa celular se añadió 250 µL de una solución de lisis que contiene hidróxido de sodio (NaOH) y dodecilsulfato sódico (SDS), y se invirtieron los tubos para llevar a cabo la lisis alcalina. Posteriormente se añadió 350 µL de una solución de neutralización que presenta ácido acético y cloruro de guanidino, de manera que se amortigua la concentración salina del medio, y se centrifugó 5 minutos a 13.000 *rpm*, transfiriendo el sobrenadante a la columna proporcionada en el kit. Se centrifugó la columna un minuto a la misma velocidad, se desechó la solución que efluye y se añadió 500 µL de una solución de lavado que contiene etanol. Se centrifuga un minuto - 13.000 *rpm* descartando el eluido y se repite el lavado. La columna se depositó sobre otro tubo Eppendorf y se añadió 50 µL de una solución de elución (1 mM Tris·Cl,

pH 8.5) o agua bidestilada en el centro de la columna, se dejó reposar 2 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó 1 minuto a 13.000 *rpm*. Los tubos con el ADN plasmídico de los clones se almacenaron a 4°C hasta su análisis.

4.8.1.- Validación de la transformación y análisis de los fragmentos de restricción

En el caso de los clones transformados con el plásmido siRNA se realizó posteriormente una digestión enzimática de comprobación de 1 µg del ADN extraído con 20 unidades de *BamH I* (R0136S; New England Bio Labs) y 20 unidades de *Xho I* (R0146S; New England Biolabs) en una solución tamponadora (100 mM NaCl; 50 mM Tris-HCl; 10 mM MgCl₂; 100 µg/mL BSA; pH 7.9) (NEBuffer 3.1, New England Bio Labs), durante 1 hora a 37 °C. Los plásmidos de sobreexpresión se digirieron con 30 unidades de *BamH I*, con la misma solución tamponadora y condiciones que en el caso de los siRNAs.

Los fragmentos de ADN digeridos y sin digerir con las enzimas de restricción se cargaron en geles de agarosa al 1 % con SYBR® Safe (Invitrogen, Life Technologies) para su separación mediante electroforesis y visualización posterior en la cámara Luminiscent Image Analyzer LAS-3000 (Fujifilm) por exposición a luz ultravioleta.

4.8.2.- Análisis de la secuencia del inserto: Secuenciación

La secuenciación de los plásmidos se llevó a cabo en el secuenciador automático 3130xl (Applied Biosystems). El análisis de los resultados se ha llevado a cabo con los programas BioEdit v7.2.5 y Gene Construction Kit 3.5.

Para la secuenciación del ADN de los clones procedentes del plásmido siRNA se utilizaron cebadores indicados en la Tabla I y la Figura 8.

Tabla I. Cebadores sentido y antisentido utilizados para secuenciar el plásmido pRNAT-CMV3.2/Hygro.

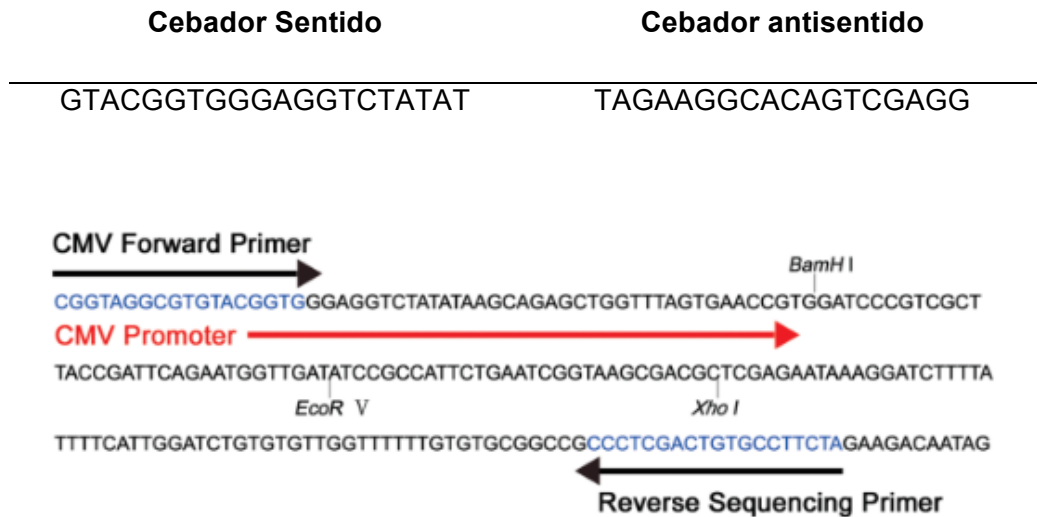


Figura 8. Zona de hibridación de los cebadores al plásmido pRNAT-CMV3.2/Hygro

El plásmido de sobreexpresión (pMLV-CX43-EGFP) se secuenció utilizando cebadores que reconocen el ADNc de la Cx43 (Tabla II).

Tabla II. Cebadores sentido y antisentido utilizados para secuenciar el plásmido pMLV-Cx43-EGFP

Cebador Sentido	Cebador antisentido
GAAACCATCTTCATCATCTTCATGC	CTAGATCTCCAGGTCATCAGG

4.9.- Selección final de transformantes y extracción de ADN plasmídico

Una vez elegido el clon bacteriano que contiene el inserto de interés se resembró en 100 mL de medio líquido LB + Amp durante 24 horas a 37 °C para obtener gran cantidad de densidad celular de la que extraer ADN.

La extracción de ADN plasmídico se llevó a cabo mediante un protocolo de alto rendimiento con el kit comercial *QIAGEN Plasmid Plus Maxi Kit* (QIAGEN®). Al igual que en el proceso de extracción analítica, el ADN plasmídico se extrae mediante lisis alcalina y el uso de filtros que retienen el ADN. Se obtiene de esta manera un mayor volumen de ADN altamente purificado y con una concentración aproximada de 1 µg/mL, pudiendo utilizarse para experimentos posteriores.

4.10.- Métodos de transfección: Transfección de la línea celular HCS/2-8

4.10.1.- Método químico: lípidos catiónicos

Para la transfección de la línea condrocítica HCS/2-8 hemos utilizado un método químico basado en lípidos catiónicos que van a rodear a la molécula de ADN, cargada negativamente. El lípido empleado se denomina Lipofectamina (Lipofectamine® LTX Reagent; Invitrogen, Life Technologies). Para llevar a cabo el experimento se cultivaron las células HCS/2-8 en una placa de 24 pocillos hasta una confluencia aproximada del 90 %, y se dejaron 24 horas en medio DMEM sin antibiótico suplementado con 1 % SFB. Tras testar distintas cantidades, decidimos utilizar 2 µL de Lipofectamina y 5 µg de ADN por pocillo. Aproximadamente a las 6 horas de incubación se cambió el medio por su medio normal de crecimiento. Al día siguiente se le añadió 10 µg/mL de higromicina B (Invitrogen, Life Technologies) para proceder a la selección de las células transfectadas.

La eficiencia de transfección se lleva a cabo por observación de la placa en un microscopio invertido de fluorescencia (Inverted Research Microscope Eclipse Ti, Nikon) y el programa de análisis de imagen NIS-element AR, V.3.0.

4.10.2.- Método físico: electroporación

Hemos utilizado el equipo Nucleofector™ 2b (Lonza) y el Amaxa® Human Chondrocyte Nucleofector® Kit (Lonza) para la transfección de la línea HCS/2-8.

Las células procedentes de un frasco de cultivo de 162 cm² se levantaron y resuspendieron en medio DMEM sin suero, centrifugándolas a 1500 *rpm* durante 10 minutos. El precipitado celular se secó con una pipeta Pasteur, se resuspendió en 100 µL de *Nucleofector Solution* y se repartió en tubos Eppendorf para tener 10⁶ células en cada uno. Posteriormente añadimos 4 µg de ADN y pasamos el contenido de cada Eppendorf a una cubeta de electroforesis. Colocamos cada cubeta en el Nucleofector™ 2b y aplicamos el programa U-23 para llevar a cabo la transfección. Al finalizar añadimos 500 µL de medio en la cubeta y recogimos las células electroporadas, que sembramos en una placa de 6 pocillos en la que previamente se añadió 1.5 mL de medio atemperado.

A las 24 horas añadimos higromicina B a las células: una réplica con 10 µg/mL y la otra con 25 µg/mL.

4.10.3.- Método químico: polímero catiónico

Los polímeros catiónicos empleados en procesos de transfección celular son muy estables, fáciles de manejar y más resistentes al suero presente en los medios de cultivo en comparación a los lípidos catiónicos. Hemos utilizado el polímero CANFAST Transfection Reagent (Canvax) a una concentración inicial de 1 mg/mL.

La transfección la llevamos a cabo en la línea HCS/2-8 en una placa de 24 pocillos. Dejamos crecer las células hasta que alcanzaron una confluencia aproximada del 80 %, con 0.5 mL de medio en cada pocillo.

Por otro lado, preparamos dos tubos Eppendorf con 30 μL de medio DMEM sin suero para cada pocillo. En uno de ellos añadimos el ADN y en el otro el reactivo CANFAST. Para intentar optimizar el proceso elegimos dos cantidades de ADN (0.1 y 0.6 μg) y dos cantidades de CANFAST (1 y 3 μL). Hicimos una réplica para cada condición.

Una vez tenemos los reactivos preparados, la solución con el CANFAST se añadió gota a gota sobre el ADN y se dejó incubar durante 15 minutos a temperatura ambiente. Los 60 μL resultantes fueron añadidos en los pocillos correspondientes pasado el tiempo de incubación, agitando la placa suavemente.

Pasadas 3 horas retiramos el medio de una de las réplicas y añadimos nuevo medio con 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de higromicina B. La otra réplica se dejó durante 24 horas y entonces se procedió al reemplazamiento del medio por medio con 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de higromicina B.

4.11.- Tratamiento y cultivo de explantes de cartílago

Los explantes de cartílago procedentes de un donante OA de grado I fueron cultivados en medio DMEM con 0.1 % FCS y han sido sometidos a distintas condiciones para estudiar el efecto del MASL:

- I. Medio DMEM 0.1 % FCS como control.
- II. Medio DMEM 0.1 % FCS + 400 nm MASL
- III. Medio DMEM 0.1 % FCS + 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de oligomicina
- IV. Medio DMEM 0.1 % FCS + 400 nm MASL; 40 minutos después se añadió 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de oligomicina

La oligomicina, compuesto que bloquea la ATPasa mitocondrial e inhibe la fosforilación oxidativa, la usamos para emular un insulto o proceso patológico.

Estas condiciones se dejaron durante 7 días, reemplazándose el medio cada 2 días. Tras este tiempo los explantes se dividieron a la mitad, siendo una parte utilizada para el aislamiento de ARN y la otra mitad se congeló en un criomolde (Cryomold® Standard, Tissue-Tek®) en O.C.T.TM (Tissue-Tek®) enfriado en isopentano (VWR Prolabo) sobre nitrógeno líquido. Posteriormente se almacenó a -80 °C para llevar a cabo ensayos de inmunohistoquímica.

4.12.- Ensayos de inmunohistoquímica

Los explantes de cartílago que fueron congelados a -80 °C se cortaron en serie en un criostato (Leica CM1510) en secciones de 4 µm, y fijadas con acetona durante 10 minutos a 4 °C. Se dejaron secar a temperatura ambiente y se lavaron durante 10 minutos en tampón fosfato salino (PBS; MP Biomedicals, LLC) con Tween® 20 (Sigma-Aldrich) al 0.1 % y pH 7.6 (PBST). La actividad peroxidasa endógena se bloqueó con H₂O₂ en metanol durante 10 minutos, lavando posteriormente con PBST. Los anticuerpos primarios utilizados fueron ratón-anti-MMP-3 humano (MAB3369; Merck Millipore) y ratón-anti-MMP-13 (MS-850-P1; Thermo Fisher Scientific), que se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente, realizándose posteriormente tres lavados con PBST. Las secciones fueron entonces incubadas con anticuerpos secundarios anti-ratón conjugados con polímeros marcados con peroxidasa de rábano (Dako, Denmark) durante 1 hora. Se volvió a realizar tres lavados con PBST y la visualización de la actividad peroxidasa se llevó a cabo por incubación con 3,3-diaminobenzidina (DAB) y H₂O₂ (Dako). Posteriormente las secciones se lavaron con agua destilada y se contratiñeron con hematoxilina/eosina ó 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI; Sigma-Aldrich).

En otras secciones de los explantes de cartílago fueron llevadas a cabo tinciones con hematoxilina/eosina y Safranina O/Fast Green.

Las muestras se analizaron en un microscopio óptico (Olympus BX61) usando una cámara digital (Olympus DP71) y calibrando/cuantificando las imágenes con el software AnalySIS^D 5.0 (Olympus Biosystems Hamburg, Germany).

4. 13.- Análisis de expresión génica

Para medir los niveles de ARNm en los explantes de cartílago se ha llevado a cabo una PCR cuantitativa en tiempo real (RT-PCR). Para la extracción del ARN se trituró la muestra de cartílago en un mortero previamente enfriado, recogiendo el polvo formado con 1 mL del reactivo de lisis de QIAzol (74804, QIAgen). Tras 5 minutos de incubación en hielo se añadieron 200 µL de cloroformo a cada muestra, se agitaron enérgicamente durante 15 segundos y se incubaron a temperatura ambiente durante otros 3 minutos. El ARN se extrajo con el QIAcube (QIAgen) de acuerdo a las instrucciones del fabricante y se trató con DNasa (RNase-free DNase, Invitrogen) para degradar completamente el posible ADN presente en la muestra. 1 µg del ARN extraído fue transformado en su ADN complementario (ADNc) con un kit (The SuperScript® VILO™ cDNA Synthesis Kit; Invitrogen). Posteriormente se llevó a cabo la RT-PCR usando la mezcla de reacción LightCycler® 480 SYBR Green I Master (Roche) en un termociclador en tiempo real (LightCycler® 480 System, Roche) con los cebadores indicados en la Tabla III.

Tabla III. Cebadores sentido (S) y antisentido (AS) utilizados para medir la expresión de los genes COX-2 y MMP-3 mediante RT-PCR.

Gen	Oligo
COX-2	S CTTCACGCATCAGTTTTTCAAG
	AS TCACCGTAAATATGATTTAAGTCCAC
MMP-3	S CCCTGGGTCTCTTTCACCTCA
	AS GCTGACAGCATCAAAGGACA

4.14.- Modelo animal para estudio *in vivo*

4.14.1.- Prueba de inducción de daño

Para comenzar la experimentación con ratones (*Mus musculus*, cepa BALB/c), elegimos 3 ejemplares para realizar una primera prueba de inducción de inflamación con LPS. En la rodilla control (derecha) se introdujo 25 µL de una solución con PBS y suero de albúmina bovina (BSA; Sigma-Aldrich) al 0.1 %. La rodilla izquierda fue tratada, además de con BSA y PBS, con 5 µg de LPS. Se practicaron tres pinchazos durante una semana y tras este tiempo se realizó la extracción y fijación de las articulaciones para su posterior procesado.

Las articulaciones se fijaron en formol al 4 % y posteriormente se decalcificaron durante 5 - 6 horas. Tras lavar las piezas con alcohol de 70° se procedió a su tallado e introducción en casetes. Las piezas se deshidrataron con concentraciones crecientes de alcohol y se incluyeron en parafina. Por último se orientó la pieza en un molde y se añadió parafina líquida para formar un bloque.

A partir del bloque se realizaron cortes seriados en un microtomo y se tiñeron con Hematoxilina-Eosina y Safranina O-Fast Green para valorar el daño producido.

4.14.2.- Tratamiento con MASL

Este experimento se va a llevar a cabo con cuatro grupos de ratones ($n = 16$) de la cepa BALB/c, tratados con LPS y/o MASL de acuerdo a la Tabla IV. Los ratones son hembras y machos en ratio 1:1, de 5 semanas de edad y con un peso aproximado de 20 g.

El MASL se administrará de forma oral a través de un suplemento alimentario: diluimos 5 mg de MASL en 100 μ L de agua para una concentración de 50 mg/mL, y embebemos una pieza de alimento para ratones (~100 mg). Cada pieza absorberá 5 mg de MASL y se dejará secar toda la noche.

Los ratones de los grupos tratados con MASL se colocarán en jaulas separadas a la hora de recibir el tratamiento, administrándoseles las piezas de comida embebidas en la lectina; los grupos sin tratar recibirán comida sin MASL.

Tabla IV. Planificación por semanas del experimento con ratones

Grupos	n	S1		S2	S3	S4	S5	S6	S7
		Día 1	Días 2-4						
Control	4								Sacrificio
LPS	4		LPS	LPS					Sacrificio
MASL	4	MASL		MASL	MASL	MASL	MASL	MASL	Sacrificio
LPS + MASL	4	MASL	LPS	LPS+ MASL	MASL	MASL	MASL	MASL	Sacrificio

El grupo de ratones de las condiciones LPS y LPS + MASL serán pinchados en ambas rodillas en tres diferentes ocasiones según la planificación indicada en la Tabla IV. Una de las rodillas será utilizada tras

el sacrificio de los ratones para llevar a cabo experimentos de inmunohistoquímica, mientras que la segunda será enviada al Servicio de Cirugía Ortopédica del Complejo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela y a Trabeculae S.L. (<http://www.trabeculae.com>) para llevar a cabo la técnica de microtomografía computarizada (micro-CT). Esta técnica emplea los rayos X para proporcionar imágenes tridimensionales de la estructura de la articulación (cartílago y hueso trabecular).

5.- RESULTADOS

5.1.- Ensayo MTT

El ensayo MTT se utilizó para estudiar la viabilidad celular en presencia de diferentes concentraciones de higromicina B mediante un cultivo durante 10 días de condrocitos primarios y la línea condrocítica HCS/2-8. Los resultados obtenidos al medir la absorbancia de las placas en el NanoQuant Infinite® 200 PRO se muestran en la Figura 9.

Al tratar con higromicina, en los condrocitos de donantes OA (Figura 9A) observamos una muy baja resistencia al antibiótico. A partir de 1 µg/mL desciende la viabilidad celular, y a partir de 10 µg/mL las células se mueren.

En el caso de la línea celular HCS/2-8 (Figura 9B) la resistencia a la higromicina ha sido mayor, existiendo células viables a una concentración de 50 µg/mL.

Estos experimentos se realizaron para seleccionar la concentración de higromicina que posteriormente utilizaremos para los ensayos de transfección con ADN plasmídico y vectores lentivirales.

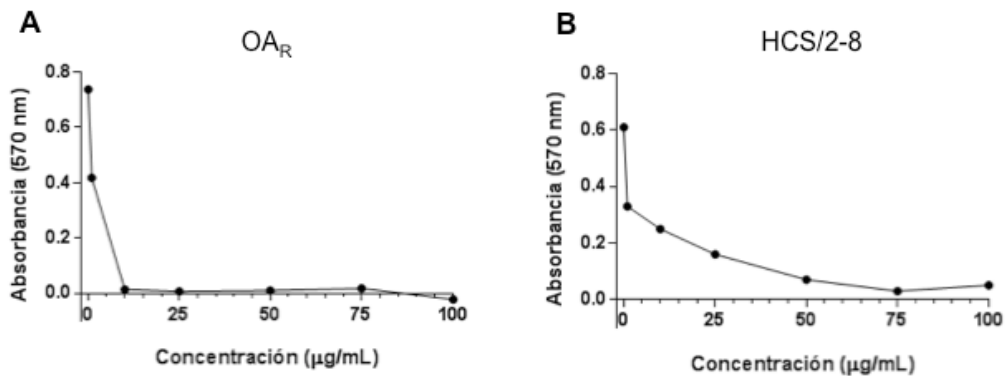


Figura 9. Gráficas representando los valores de absorbancia obtenidos a 570 nm en relación a distintas concentraciones de higromicina. **A.** Donante artrósico de rodilla. **B.** Línea condrocítica HCS/2-8.

5.2.- Análisis de los clones de la cepa DH5αTM de *E. coli*

5.2.1. siRNA

Tras la transformación de las células de *E. coli* con el vector pRNAT-CMV3.2/Hygro mediante choque térmico y posterior cultivo durante 24 horas, se recogieron diferentes clones para extraer su ADN y así analizar y validar la presencia de los insertos. Se llevó a cabo una validación inicial mediante análisis de fragmentos de restricción obtenidos a través de la digestión del ADN con *Bam*H I y *Xho* I y mediante secuenciación.

Al separar los fragmentos de ADN plasmídico de los cuatro clones se observó que todos seguían un patrón similar (Figura 10). En el caso del plásmido entero (I) se aprecian las bandas correspondientes a los topoisómeros del ADN plasmídico. Tras la digestión de cada clon con las enzimas de restricción (D) se detecta la forma linealizada, con una banda que corre cerca de 7.1 Kb; el pequeño fragmento correspondiente a Cx43 no se visualiza debido a su pequeño tamaño (66 pb).

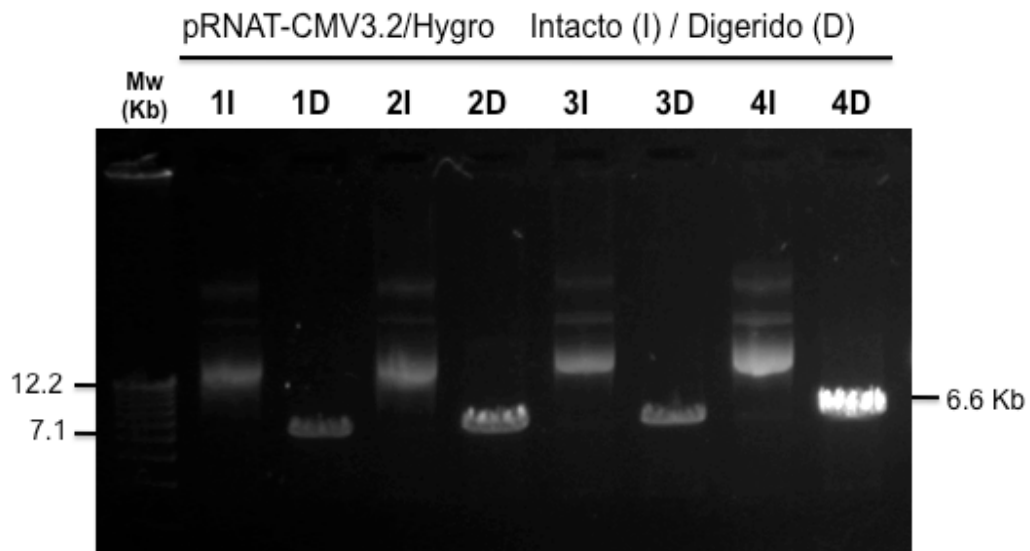


Figura 10. Separación del ADN plasmídico de los distintos clones (1-4) mediante electroforesis en gel de agarosa en comparación al marcador X (Roche). “I” indica el vector sin digerir. “D” indica el vector digerido con *BamH I* y *Xho I*.

Posteriormente se confirmó la presencia del inserto de Cx43 en los clones mediante secuenciación.

Tras la primera validación escogimos el clon número 3 de la cepa DH5 α TM, que resembramos en medio LB líquido para así extraer gran cantidad del vector. Obtuvimos 400 μ L de ADN altamente purificado con una concentración de 1.7 μ g/mL. A través del análisis del vector en un gel de agarosa (Figura 11) observamos la banda esperada tanto en la forma intacta como digerida. Por último, la presencia del inserto fue corroborada mediante secuenciación.

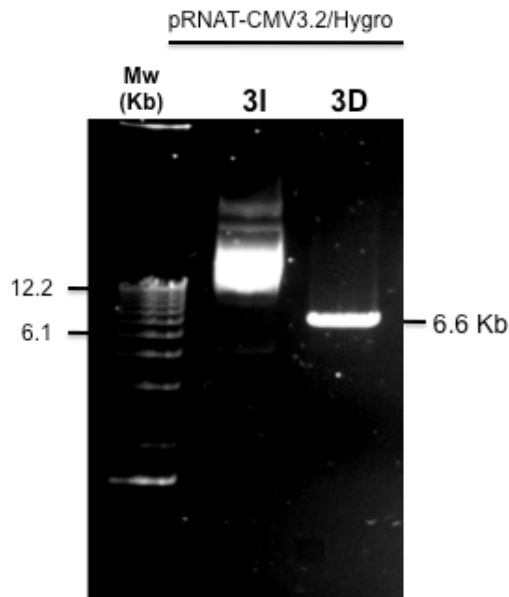


Figura 11. Separación del ADN del clon 3 extraído mediante *MaxiPrep* en comparación al marcador X (Roche). “I” indica el vector sin digerir. “D” indica el vector digerido con *BamH I* y *Xho I*.

5.2.2. Sobreexpresión

Transformamos mediante choque térmico células de *E. coli* con los tres vectores que necesitamos para llevar a cabo la sobreexpresión de la Cx43: pMLV-Cx43-EGFP, pMLV-gag-pol y pMD2.G.

En el caso del plásmido con la secuencia de la Cx43 (pMLV-Cx43-EGFP) hemos encontrado complicaciones a la hora de validar su correcta transformación, llevando a cabo este proceso en dos ocasiones separadas. En la primera transformación obtuvimos patrones de fragmentos de restricción tras la digestión con *BamH I* y visualización en gel de agarosa que no se correspondían con los esperados. Además, la secuencia de la Cx43 no pudo ser detectada mediante secuenciación. Por tanto, decidimos llevar a cabo una segunda transformación con nuevas células de la cepa competente DH5 α TM de *E. coli*. Elegimos nuevos clones y extrajimos su ADN para llevar a cabo la validación. En este caso observamos dos potenciales candidatos (Figura 12), eligiendo finalmente el clon 1 por resultar positivo en la secuenciación. Sin embargo, la resiembra de este clon en medio líquido dio lugar a una baja concentración de ADN (73 ng/mL) y a una banda inespecífica al correr los fragmentos de digestión en un gel de agarosa. Estos resultados

concuerdan con trabajos publicados sobre la obtención de ADN en bacterias provenientes de vectores lentivirales²³.

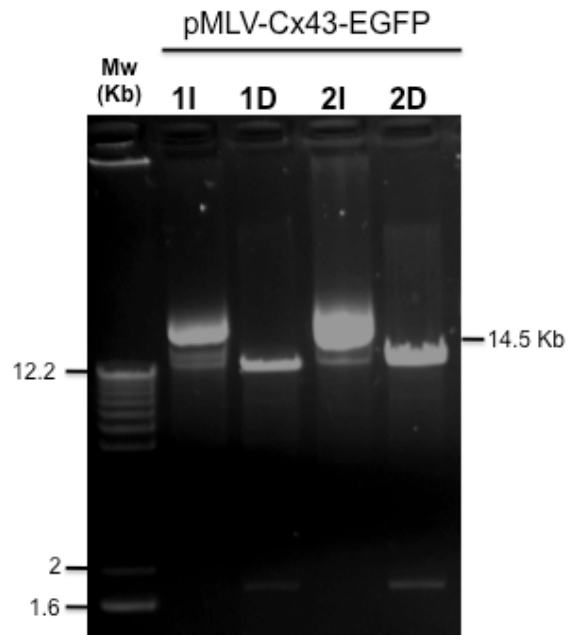


Figura 12. Extracción del vector pMLV-Cx43 de dos clones de *E.coli* tras la segunda transformación. En el gel de agarosa se visualizan las bandas correspondientes al ADN intacto (I) o digerido con *BamH* I (D). El marcador de peso molecular es el *marker X* de Roche.

Por otro lado, los vectores pMLV-gag-pol y pMD2.G fueron transformados en *E. coli*, al igual que en los casos anteriores mediante choque térmico de 1 minuto a 42 °C, tras lo que se extrajo el ADN de distintos clones. El ADN de cada vector fue entonces digerido con *BamH* I y visualizado en un gel de agarosa al 1 %, obteniéndose un patrón de bandas claro en todas los clones analizados (Figura 13). El vector pMLV-gag-pol (A) dio lugar a tres fragmentos de restricción cuya suma resulta en el valor total del plásmido (12.1 Kb). Lo mismo ocurrió en el vector pMD2.G (B), que dio lugar a un fragmento algo menor de 5 Kb y otro pequeño de cerca de 1 Kb, siendo el tamaño total sin digerir de 5.8 Kb.

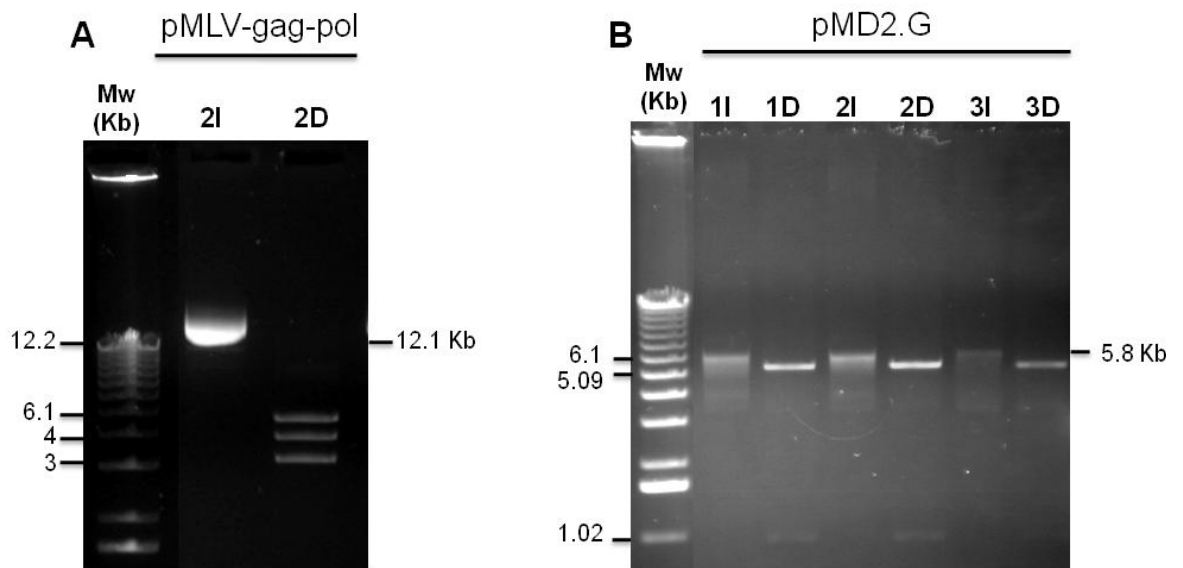


Figura 13. Separación de ADN en gel de agarosa al 1 % en comparación al marcador X (Roche). El ADN de clones sin digerir se representan como "I"; vectores digeridos con la enzima *BamH I* se representan con una "D". **A.** Vector pMLV-gag-pol, de 12.1 Kb en su forma intacta y dando lugar a tres bandas al ser digerido. **B.** Vector pMD2.G, de 5.8 Kb, da lugar a dos fragmentos de restricción.

Tras la primera validación seleccionamos un clon de los vectores pMLV-gag-pol y pMD2.G, que se resembró en medio LB líquido y se extrajo ya una mayor cantidad de ADN altamente purificado, obteniendo concentraciones de 582.1 ng/μl y 242.5 ng/μl respectivamente. La visualización del ADN (digerido con *BamH I* y sin digerir) en un gel de agarosa al 1 % (Figura 14) mostró el patrón de bandas esperado.

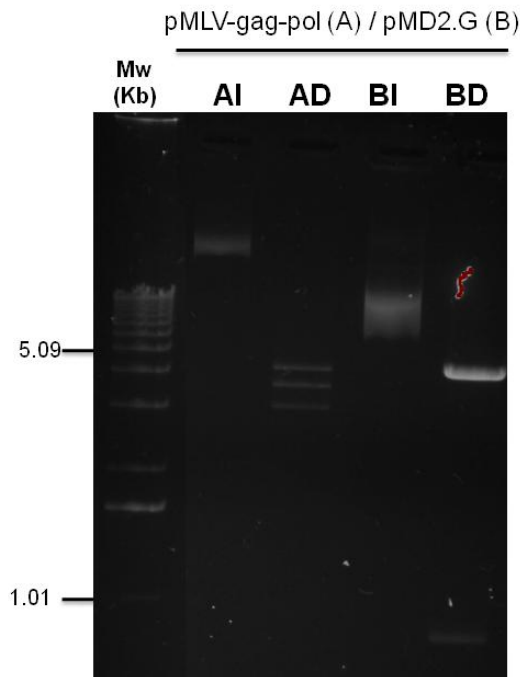


Figura 14. Separación del ADN en gel de agarosa al 1 % en comparación al marcador X (Roche). “I” indica el vector sin digerir; “D” indica el vector digerido con *Bam*H I. **A:** pMLV-gag-pol; **B:** pMD2.G.

5.3.- Transfección línea HCS/2-8

Una vez obtuvimos suficiente ADN del vector pRNAT-CMV3.2/Hygro, llevamos a cabo la transfección de células de la línea condrocítica HCS/2-8 mediante distintos métodos.

5.3.1.- Transfección con Lipofectamina

Tras la transfección con distintas cantidades del lípido catiónico denominado Lipofectamina, observamos que a partir de 2 - 4 μ L resultaba tóxico para las células. Al añadir 10 μ g/mL de higromicina B a los pocillos, las células comenzaron a levantarse hasta llegar a un punto en el que las células ya no eran viables, lo que podría indicar una baja eficiencia de transfección.

5.3.2.- Electroporación

Por otro lado llevamos a cabo la transfección mediante electroporación con pocillos por duplicado, y las réplicas fueron sometidas a distintas concentraciones de higromicina B (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Los condrocitos del pocillo con 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ sufrieron un descenso en número, pero se apreciaron colonias celulares con el fenotipo propio de las células HCS/2-8 (Figura 15). Sin embargo, en el pocillo con 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ las células se levantaron considerablemente y aquéllas todavía adheridas a la placa presentaban un fenotipo alargado.

Electroporación_HCS/2-8



Figura 15. Colonia de células HCS/2-8 transfectadas mediante electroporación y mantenidas en medio DMEM 10% SFB con 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de higromicina B, observadas en un microscopio invertido a 10X.

5.3.3.- Transfección con CANFAST

Después de llevar a cabo la transfección con el polímero catiónico CANFAST y tras el cultivo de las HCS/2-8 con 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ durante una semana se observó un índice de transfección muy bajo, aproximadamente un 5 %. Las células se levantaron en gran medida, pero aquéllas que permanecieron adheridas al frasco de cultivo mostraron positividad al ser

observadas al microscopio invertido de fluorescencia debido a la expresión de GFP (Figura 16).

CANFAST_HCS/2-8

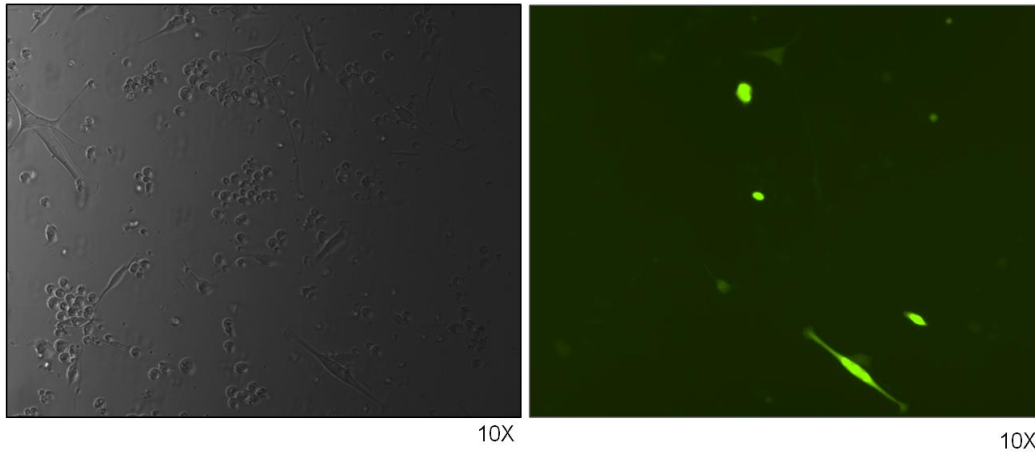


Figura 16. Células de la línea HCS/2-8 transfectadas con CANFAST y cultivadas en DMEM 10%SFB con 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de higromicina B. Imágenes tomadas en un microscopio invertido con luz visible (izquierda) y fluorescencia (derecha)

5.4.- Análisis de explantes de cartílago tratados con MASL

La sección de *punches* de explantes de cartílago cultivados en medio DMEM con MASL y/u oligomicina durante una semana fue valorada mediante ensayos inmunohistoquímicos. Los *punches* de cartílago fueron incubados toda la noche en medio DMEM sin suero, y al día siguiente se cambió el medio por DMEM 0.1 % SFB. Las imágenes de secciones teñidas con Safranina O-Fast Green pueden visualizarse en la Figura 17, en las que el tratamiento con oligomicina dio lugar a un incremento en la pérdida de proteoglicanos, representada por la disminución de captación de safranina, así como una disrupción en la estructura de la MEC con presencia de lagunas mayor tamaño. El explante tratado con MASL presenta una tinción y estructura similar al control. El pretratamiento con MASL redujo la pérdida de proteoglicanos y disrupción del cartílago que cabría esperar debido a la presencia de oligomicina.

Se realizaron ensayos inmunohistoquímicos para la detección de MMP-3 y MMP-13, observándose una mayor positividad de estas metaloproteasas en los explantes tratados con oligomicina. Sin embargo, aquellos explantes tratados con MASL o pretatados con MASL antes de añadir la oligomicina no mostraron ulceración del tejido ni sobreexpresión de MMPs (Figura 18).

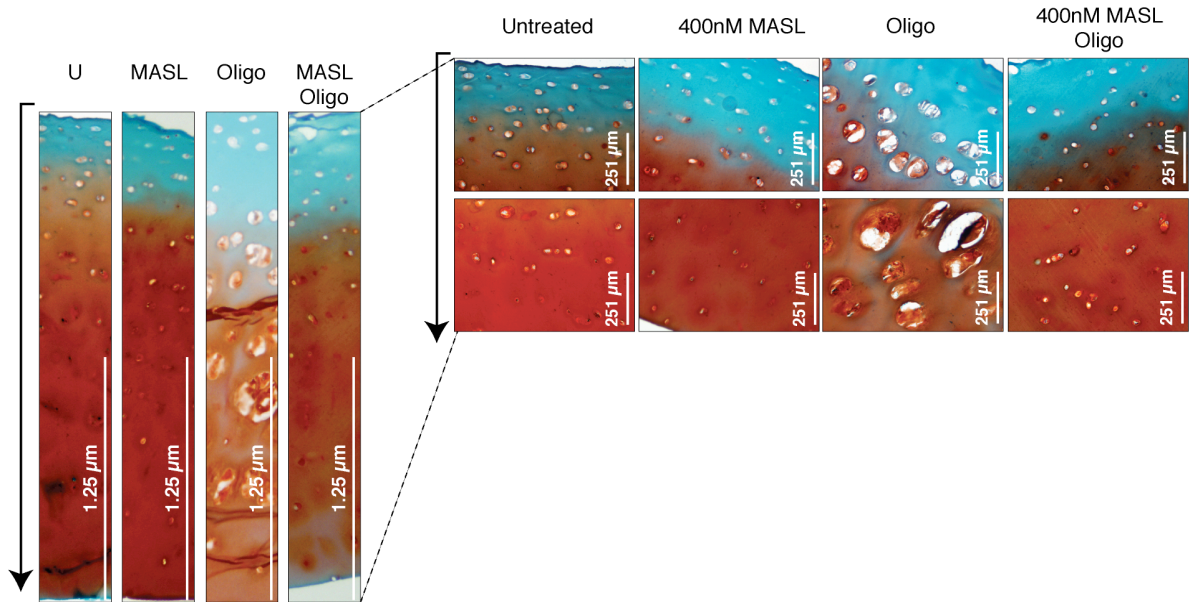


Figura 17. Las imágenes representan secciones de explantes de cartilago de un donante con grado I de OA, teñidas con Safranina O-Fast Green, tras ser sometidos durante 7 días a distintas condiciones. Las zonas superficiales dañadas por pérdida de proteoglicanos se tiñen de verde.

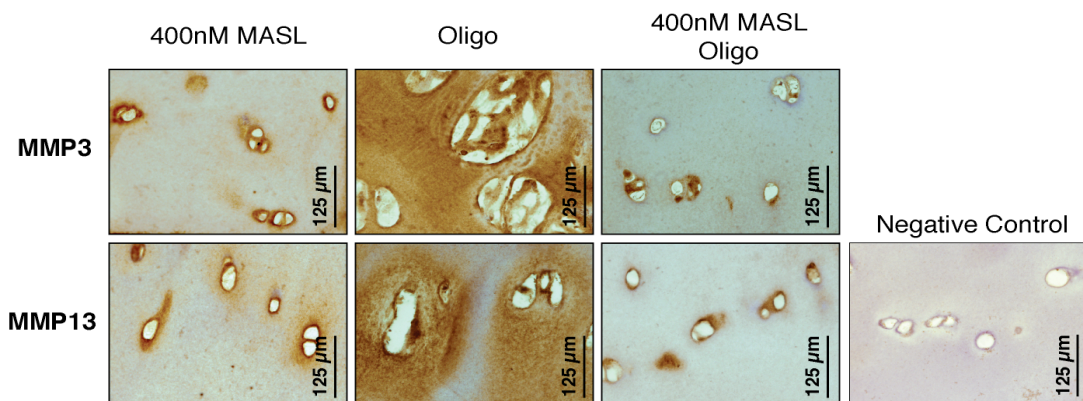


Figura 18. Detección de MMP-3 y MMP-13 mediante inmunohistoquímica en explantes tratados con oligomicina y/o MASL durante 7 días.

El análisis de la extracción de ARN y cuantificación de la expresión génica de COX-2 y MMP-3 reveló niveles altos de expresión de estos dos genes en el tratamiento de oligomicina, mientras que la previa adición de MASL suprime o protege del incremento de expresión de COX-2 y MMP-3 (Figura 19).

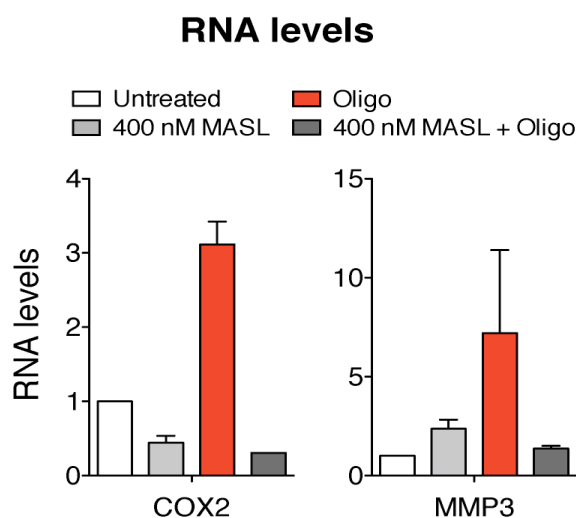


Figura 19. Medida de la expresión génica de COX-2 y MMP-3 en explantes de cartílago tratados con oligomicina y/o MASL durante 7 días. Los datos representan la Media \pm SEM; $n = 2$.

5.5.- Inducción de daño en ratones con LPS

Se llevó a cabo una prueba de inducción de daño en ratones BALB/c mediante la administración de tres pinchazos con LPS en la rodilla izquierda, en comparación a pinchazos sin LPS en la rodilla derecha (control). Al cabo de una semana, se recogieron las muestras y se analizaron mediante inmunohistoquímica. Tras comparar los cortes histológicos de la articulación de la rodilla tratada podemos observar cambios debido a la presencia o no de LPS. La tinción con Hematoxilina-Eosina no muestra un cambio importante en la estructura del cartílago. Por el contrario, al comparar la tinción obtenida mediante Safranina-O Fast Green en el caso de la rodilla con LPS y la control (Figura 20) se

observa una evidente disminución en la coloración roja en el cartílago tratado lo que se corresponde con pérdida de proteoglicanos. Estos resultados sugieren que este modelo nos podría servir para estudiar el efecto protector del MASL en modelos animales. A continuación hemos comenzado con los ensayos como se indica en materiales y métodos. Las muestras serán recogidas y analizadas al cabo de siete semanas.

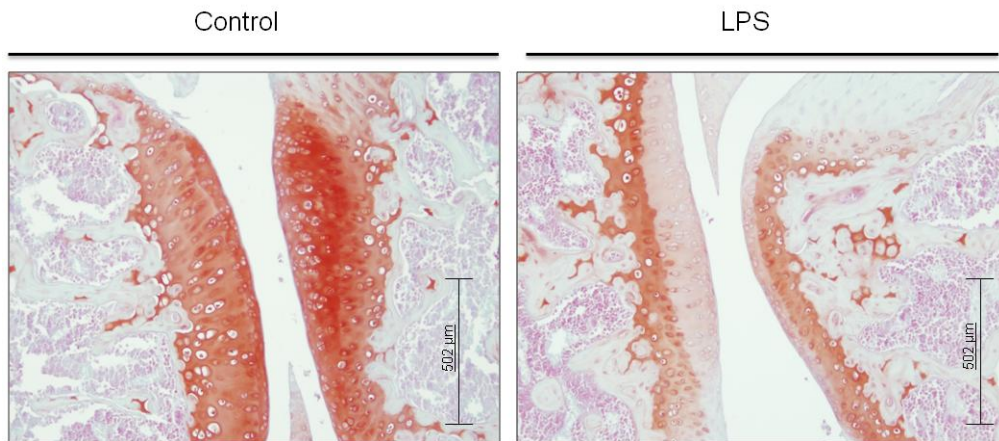


Figura 20. Secciones las articulaciones de rodilla de un ratón (cepa BALC/c) teñidas con Safranina O-Fast Green tras ser tratadas con LPS. La imagen de la izquierda representa la rodilla control; en la imagen de la derecha se observa la rodilla tratada con 5 μ g de LPS.

6.- DISCUSIÓN

Las GJs regulan el intercambio de pequeñas moléculas, así como el desarrollo y remodelado de los tejidos, incluyendo el cartílago. Por tanto, alteraciones en estos canales pueden dar lugar a estados patológicos como el presente durante la OA. Uno de los objetivos de este trabajo ha sido el estudio de las funciones de la Cx43 en condrocitos mediante la disminución de su expresión por un lado, y a través de su sobreexpresión por otro. Para llevar a cabo este objetivo comenzamos el diseño de dos vectores que al ser introducidos en las células diana llevarían a cabo el aumento o disminución de la expresión de la Cx43.

Por un lado, hemos transfectado células de la línea condrocítica HCS/2-8 con el vector siRNA mediante tres métodos (lípidos catiónicos, electroporación y polímeros catiónicos) y condiciones diferentes con el objetivo de lograr optimizar la eficiencia del proceso. Sin embargo, hemos visto que las células no logran captar correctamente el vector, de manera que su resistencia a la higromicina B es muy baja. Por otro lado, la disminución de expresión de la Cx43 podría repercutir en la viabilidad celular y por tanto impedir que las células se mantengan en cultivo a pesar de haber captado el vector. De todas formas, todavía no es posible saber si hemos obtenido algún clon positivo ya que las células necesitan pasar aproximadamente un mes en cultivo en presencia de selección (higromicina B) tras la transfección. En el caso de que pasado este tiempo no consigamos clones positivos recurriremos al uso de vectores lentivirales. Estas partículas retrovirales presentan altas eficiencias de transfección y ocasionalmente son capaces de integrarse de manera estable en el genoma de las células transfectadas dando lugar a una expresión a largo plazo del transgén²⁴. Además, los lentivirus son capaces de integrarse en células que no se están dividiendo y presentan un bajo perfil inmunogénico²⁵, lo que hace que sea un sistema más adecuado para trabajar con células primarias en cultivo.

En cuanto al vector lentiviral que estamos utilizando para sobreexpresar la Cx43, una vez tengamos ADN de las tres partículas necesarias para llevar a cabo la transfección (pMLV-Cx43-EGFP, pMLV-gag-pol, pMD2.G) podremos infectar la línea de empaquetamiento Lenti-X™ 293T y así obtener partículas capaces de transfectar condrocitos primarios o líneas celulares condrocíticas.

Una segunda línea de investigación de los mecanismos moleculares implicados en el desarrollo de la artrosis se ha enfocado en el estudio de la glicosilación de proteínas transmembrana y de la MEC relacionadas en múltiples procesos celulares. Distintos autores han demostrado recientemente que cambios en la posición de sialización de α -2,6 a α -2,3 en glicoproteínas presentes en el cartílago articular pueden tener relación con el desarrollo de enfermedades reumáticas^{17, 20}. Tras comprobar que la lectina MASL se une a este tipo de glicosilaciones sin ser nocivo para las células, y que presentaba cierto efecto protector en condrocitos en cultivo expuestos a oligomicina²¹, decidimos realizar experimentos *in vitro* utilizando explantes de cartílago. Los resultados obtenidos demostraron que la adición del MASL protege la estructura y composición de la MEC en presencia de condiciones patológicas emuladas, en este caso, mediante la adición de oligomicina.

Dentro de esta misma línea, hemos comenzado el estudio del efecto del MASL *in vivo* utilizando ratones como modelo animal. Limitaciones en el número de ratones disponibles y en la dificultad de purificación del MASL retrasaron el comienzo del experimento, que se está llevando a cabo primeramente con una $n = 7$. En un análisis futuro podremos observar si la administración oral de la lectina ejerce un efecto protector sobre las rodillas que han sido sometidas a inflamación y daño mediante la administración de LPS.

7.- CONCLUSIONES

- Concentraciones nanomolares de MASL protegen al cartílago articular de la degradación desencadenada por el incremento de mediadores proinflamatorios y MMPs.
- El enmascaramiento de las proteínas que sufren sialización α -2,3 con la lectina específica denominada MASL protege al cartílago articular en situaciones de estrés celular.

8.- AGRADECIMIENTOS

Quisiera expresar mi agradecimiento a todas las personas que han colaborado en la realización de este trabajo, llevado a cabo en la División de Reumatología del INIBIC, coordinado por el Dr. Francisco Blanco, y en concreto en el grupo de Biología del Cartílago dirigido por la Dra. María Mayán.

En primer lugar, gracias a la Dra. María Mayán por permitirme incorporarme al grupo de investigación y formar parte de este proyecto. En especial, quería expresarle mi gratitud por la paciencia y dedicación incondicional que me ha brindado.

A Paula Carpintero y Raquel Gago, compañeras y mentoras que todo principiante querría. Me gustaría resaltar su inconmensurable apoyo y comprensión, ya que sin ellas este trabajo no podría haber sido posible.

A la Dra. María Ángeles Freire, por facilitarme su conocimiento y recursos.

A Purificación Filgueira y Noa Goyanes, por su ayuda sin límites, siempre acompañada de una sonrisa. A María José Sánchez y Dra. Tamara Hermida, por sus explicaciones y disposición a ayudar en cualquier momento. Y, por supuesto, a todo el personal del INIBIC por resolver siempre mis dudas.

A Marta Grandal, por darme a conocer este Máster y por estos dos años compartiendo laboratorio y risas.

Por último, quería agradecer a mis padres el apoyo que siempre me han dado. Que sepan que no va a ser en vano.

GRACIAS a todos.

9.- BIBLIOGRAFÍA

1. Loeser RF, Goldring SR, Scanzello CR, Goldring MB. Osteoarthritis: A Disease of the Joint as an Organ. *Arthritis Rheum.* 2012; 64 (6):1697-707.
2. Chi SS, Rattner JB, Matyas JR. Communication between paired chondrocytes in the superficial zone of articular cartilage. *J Anat.* 2004; 205: 363-70.
3. Hall AC, Horwitz ER, Wilkins RJ. The Cellular Physiology of Articular Cartilage. *Exp Physiol.* 1996; 81:535-45.
4. Ross MH, Pawlina W. Tejido Cartilaginoso. *Histología: texto y atlas color con biología celular y molecular.* 5ª ed. Buenos Aires: Panamericana; 2007. 198-211.
5. Goldring MB, Goldring SR. Osteoarthritis. *J Cell Physiol.* 2007; 213: 626-34.
6. Tchetina EV. Developmental Mechanisms in Articular Cartilage Degradation in Osteoarthritis. *Arthritis.* 2011; 2011: 1-16.
7. Johnson VL, Hunder DJ. The epidemiology of osteoarthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol.* 2014; 28(1): 5-15.
8. [No authors listed] Osteoarthritis: GWAS identifies risk variants for severe hand OA. *Natur Rev Rheumatol.* 2014; 10: 320. doi:10.1038/nrrheum.2014.69
9. Dbouk HA, Mroue RM, El-Sabban ME, Talhouk RS. Connexins: a myriad of funciones extending beyond assembly of gap junction channels. *Cell Commun Signal.* 2009; 7 (4): 1-17.

10. Valiunas V, Polosina YY, Miller H, Potapova IA, Valiuniene L, Doronin S, *et al.* Connexin-specific cell-to-cell transfer of short interfering RNA by gap Junctions. *J Physiol.* 2005; 568 (2): 459-68.
11. Vinken M, Doktorova T, Decrock E, Leybaert L, Vanhaecke T, Rogiers V. Gap junctional intercellular communication as a target for liver toxicity and carcinogenicity. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 2009; 44 (4): 201-22.
12. Mayan MD, Gago-Fuentes R, Carpintero-Fernandez P, Fernandez-Puente P, Filgueira-Fernandez P, Goyanes N, *et al.* Articular chondrocyte network mediated by gap junctions: role in metabolic cartilage homeostasis. *Ann Rheum Dis.* Nov 2013; 1-10. doi: 10.1136/annrheumdis-2013-204244.
13. Gago-Fuentes R, Carpintero-Fernandez P, Goldring MB, Brink PR, Mayan MD, *et al.* Biochemical evidence for gap junctions and Cx43 expression in immortalized human chondrocyte cell line: a potential model in the study of cell communication in human chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage.* 2014; 22 (4): 586-90.
14. Mayan MD, Carpintero-Fernandez P, Gago-Fuentes R, Martinez-de-Illarduya O, Wang HZ, Valiunas V, *et al.* Human Articular Chondrocytes Express Multiple Gap Junction Proteins: Differential Expression of Connexins in Normal and Osteoarthritic Cartilage. *Am J Pathol.* 2013; 182 (4): 1337-46.
15. Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. *Carbohydrates. Biochemistry.* 5th ed. New York: W.H. Freeman and Company; 2002.
16. Wang PH, Lee WL, Juang CM, Yang YH, Lo WH, Lai CR *et al.* Altered mRNA expressions of sialyltransferases in ovarian cancers. *Gynecol Oncol.* 2005; 99 (3): 631-9.

17. Toegel S, Pabst M, Wu SQ, Grass J, Goldring MB, Chiari C *et al.* Phenotype-related differential alpha-2,6- or alpha-2,3-sialylation of glycoprotein N-glycans in human chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage* 2010; 18 (2): 240-8.
18. Varki A, Cummings RD, Esko JK, Freeze HH, Stanley P, Bertozzi CR *et al.* *Essentials of Glycobiology*. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2009.
19. Cui H, Lin Y, Yue L, Zhao X, Liu J. Differential expression of the α 2,3-sialic acid residues in breast cancer is associated with metastatic potential. *Oncol Rep.* 2011; 25: 1365-71.
20. Toegel S, Bieder D, André S, Altmann F, Walzer SM, Kaltner H *et al.* Glycophenotyping of osteoarthritic cartilage and chondrocytes by RT-qPCR, mass spectrometry, histochemistry with plant/human lectins and lectin localization with glycoprotein. *Arthritis Res Ther.* 2013; 15 (5): R147. doi: 10.1186/ar4330.
21. Carpintero-Fernandez P, Gago-Fuentes R, Varela-Eirin M, Goldberg GS, Mayan MD, Blanco FJ. Therapeutic potential of targeting sialic acid modified receptors in osteoarthritis. *Manuscript in preparation*.
22. Mayan MD, Blanco FJ, Goldberg GS, Carpintero P, Gago R. Targeting a specific receptor on cells with a specific compound for use in the treatment and/or prevention of osteoarthritis and rheumatoid arthritis. USPTO# is 61/842,195. *Patent pending (July 02), USA*.
23. Al-Allaf FA, Tolmachov OE, Zambetti LP, Tchetchelnitski V, Mehmet H. Remarkable stability of an instability-prone lentiviral vector plasmid in *Escherichia coli* Stbl3. *3 Biotech.* 2013; 3 (1): 61-70.

24. el Oakley RM, Brand NJ, Burton PB, McMullen MC, Adams GB, Poznansky MC *et al.* Efficiency of a high-titer retroviral vector for gene transfer into skeletal myoblasts. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1998; 115 (1): 1-8.
25. Tolmachov O, Tolmachova T, Al-Allaf FA. Designing Lentiviral Gene Vectors. *Viral Gene Therapy.* 2011. ISBN: 978-953-307-539-6, In Tech. Available from: <http://www.intechopen.com/books/viral-gene-therapy/designing-lentiviral-gene-vectors>