



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

FACULTADE DE CIENCIAS DA SAÚDE

MESTRADO EN ASISTENCIA E INVESTIGACIÓN SANITARIA

ESPECIALIDADE: FUNDAMENTOS DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA

Curso académico 2011-2012

TRABALLO DE FIN DE MESTRADO

**Estudio de la Función de los Canales de Conexina en
Condrocitos de Cartílago Adulto**

Paula Carpintero Fernández

30 de Mayo 2012

María D. Mayán Santos, doutora en Bioloxía e investigadora Isidro Parga Pondal do Complexo Universitario de A Coruña (INIBIC) xunto con **Francisco Javier Blanco García**, doutor en medicina, Reumatólogo, Presidente da Comisión de Investigación do Complexo Universitario de A Coruña e Director do INIBIC

INFORMAN:

Que Paula Carpintero Fernández, Licenciada en Bioloxía, realizou o traballo titulado: “Estudio de la Función de los Canales de Conexinas en Condrocitos de Cartílago Articular Adulto” no INIBIC baixo a nosa dirección e para que así conste firmámolo en A Coruña, a 30 de maio del 2012

Dr. Francisco J. Blanco García
Director do INIBIC

Dra. María D. Mayán Santos
Investigadora Isidro Parga
Pondal (INIBIC)

INDICE

| | |
|--|----|
| 1. RESUMEN | 3 |
| 2. INTRODUCCIÓN | 5 |
| 3. MATERIAL Y MÉTODOS | 10 |
| 3.1 Obtención de muestras de cartílago | 10 |
| 3.2 Procesamiento del cartílago y cultivo de condrocitos..... | 10 |
| 3.3 Extracción de ARNm y ensayos de PCR a tiempo real..... | 11 |
| 3.4 Técnicas histológicas y ensayos de inmunohistoquímica..... | 13 |
| 3.5 Ensayos de electrofisiología..... | 15 |
| 3.5.1 <i>Dual voltage-clamp</i> | 15 |
| 3.5.2 Inyección del fluoróforo | 16 |
| 3.6 Western-blot | 16 |
| 3.7 Estudios del ciclo celular y proliferación en condrocitos articulares... 17 | |
| 3.7.1 Bloqueo de los canales de conexina..... | 17 |
| 3.7.2 Análisis del ciclo celular..... | 17 |
| 3.8 Estudios de transferencia de aminoácidos..... | 18 |
| 3.8.1 Adherencia de las células no marcadas a la membrana..... | 18 |
| 3.8.2 Adherencia de las células marcadas a la membrana..... | 19 |
| 3.8.3 Lisado y filtrado..... | 19 |
| 3.8.4 Análisis de la transferencia de aminoácidos | 20 |
| 4. RESULTADOS | 21 |
| 4.1 Los condrocitos primarios expresan Cx43 | 21 |
| 4.2 Los condrocitos forman canales funcionales voltaje-dependientes. .. | 24 |
| 4.3 Función metabólica de las UG en condrocitos articulares | 27 |
| 4.4 Los canales de Cx43 de condrocitos adultos están implicados en proliferación..... | 30 |

| | |
|--------------------------------|-----------|
| 5. DISCUSIÓN..... | 35 |
| 6. CONCLUSIONES..... | 39 |
| 7. AGRADECIMIENTOS..... | 39 |
| 8. BIBLIOGRAFÍA..... | 40 |

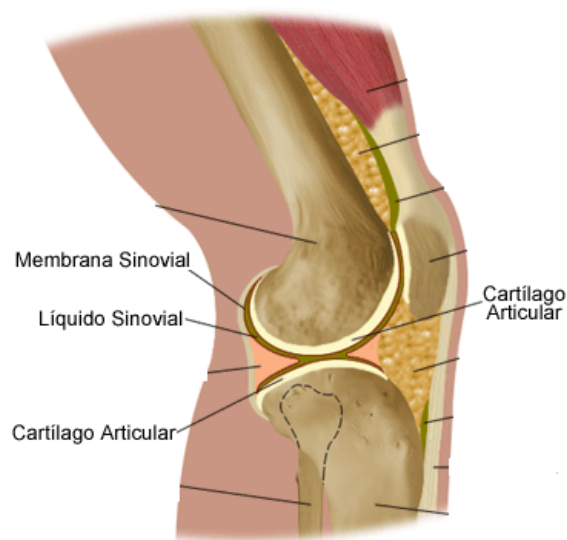
1. RESUMEN

El cartílago articular se caracteriza por ser un tejido avascular, aneuronal y alinfático que recubre las superficies óseas de las articulaciones. Está formado células denominadas condrocitos y por una densa matriz extracelular. Los condrocitos sólo ocupan de un 2-5% del volumen total del tejido y se encuentran embebidos en la matriz, localizados en lagunas y separados uno de otros de 5 a 60µm. Las uniones *gap* (UG) están formadas por proteínas de la familia de las conexinas (Cxs) y son canales que conectan directamente el citoplasma de dos células adyacentes lo que permite el intercambio de pequeñas moléculas. En diferentes estudios, utilizando modelos animales, se ha descrito que los condrocitos articulares expresan conexina 43 (Cx43); esto combinado con resultados previos de nuestro grupo donde se demuestra que los condrocitos son capaces de formar proyecciones citoplasmáticas de hasta 200µm de longitud, llevó al desarrollo de este trabajo donde se pretende estudiar y caracterizar la funcionalidad de los canales de Cxs en condrocitos humanos combinado con el estudio de la implicación de los canales en otros procesos como la proliferación y regulación del ciclo celular. Para llevar a cabo el estudio, los condrocitos se cultivaron durante 3-5 semanas a 37°C y 5%CO₂ en un incubador. Posteriormente se realizaron ensayos de PCR a tiempo real e inmunohistoquímica que permitieron determinar la expresión de Cxs en cartílago y su localización en las diferentes capas. La funcionalidad de los canales fue testada mediante la técnica del *dual voltage-clamp* y la capacidad de intercambio de moléculas mediante un co-cultivo en *transwel* y espectrometría de masas. Para testar si los canales de Cxs estaban implicados en otros procesos como proliferación, se trató a los condrocitos primarios en cultivo con drogas inespecíficas que bloquean los canales de Cxs y el efecto sobre el ciclo celular fue analizado mediante citometría de flujo y ensayos de expresión génica. Los resultados demuestran que los condrocitos en cultivo provenientes de donantes sanos expresan altos niveles de Cx43

que se localiza en múltiples puntos de la membrana plasmática. Los resultados aquí mostrados demuestran que los canales formados por Cx43 son canales funcionales dependientes de voltaje y formados exclusivamente por Cx43. Hemos demostrado que los condrocitos a través de los canales de Cxs intercambian moléculas como *Lucifer Yellow* u oligos de 12 nucleótidos. Además el co-cultivo en *transwell* reveló que los condrocitos se transfieren aminoácidos libres como L-lisina y posiblemente, péptidos y proteínas. El efecto sobre el ciclo celular determinó que el bloqueo de los canales de Cxs arresta a las células en G0/G1, afectado a la expresión de proteínas implicadas en la regulación del ciclo celular.

2. INTRODUCCIÓN

El cartílago articular es un tejido con propiedades únicas que recubre las superficies óseas de las articulaciones, evita el roce mecánico y por lo tanto permite la movilidad de la articulación sin que se produzca dolor. ⁽¹⁾ (Figura 1). En adultos, se caracteriza por ser un tejido conectivo avascular, aneuronal y alinfático cuyos componentes principales son los condrocitos y la matriz extracelular (MEC), que está principalmente formada por agua, colágeno tipo II y proteoglicanos. La composición proteica de la MEC proporciona una serie de propiedades al cartílago que le hacen apto para soportar el peso impuesto durante el movimiento. ⁽²⁾ Los condrocitos son el único tipo celular descrito en este tejido, se encuentran localizados en el interior de lagunas inmersas en la MEC y separados unos de otro de 5 a 60µm. Morfológicamente el cartílago adulto puede dividirse en cuatro zonas diferenciadas: superficial, intermedia, profunda y zona calcificada que difieren en la expresión de moléculas de la matriz, enzimas y factores de crecimiento; todos ellos responsables de la integridad y función del tejido.



<http://fisiostar.com/anatomia/la-articulacion-de-la-rodilla.html>

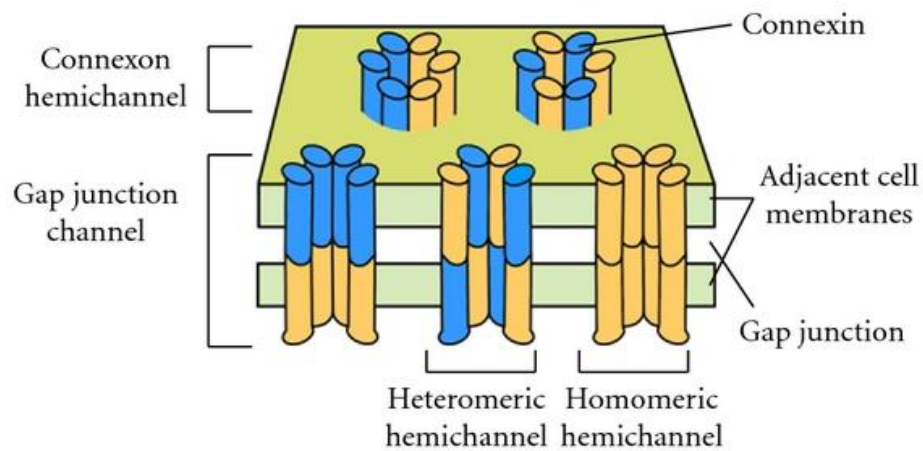
Figura 1: Articulación de la rodilla

La osteoartrosis (OA) es la enfermedad degenerativa articular más común de la población occidental. El desarrollo de esta patología se caracteriza por la degeneración y pérdida del cartílago articular. El impacto de la enfermedad en la sociedad actual es cada vez más importante; la OA está presente en una gran proporción de los individuos de edad superior a 50 años, se trata de una de las primeras causas de discapacidad laboral y supone una importante carga médica y financiera.⁽³⁾ Hasta el momento se desconoce la causa por la cual se desarrolla y, por lo tanto, no existe ningún tratamiento eficaz más que el reemplazamiento total de la articulación dañada por una prótesis. Los cambios que dan lugar a la aparición de la OA se asocian con cambios a nivel de la actividad metabólica de los condrocitos: aumento en la actividad de las metaloproteasas (MMPs), disminución de la síntesis de agreganos y proteoglicanos, mayoritariamente en la capa superficial, pérdida de colágeno tipo II y aumento de otro tipo de colágenos como colágeno tipo I y tipo X. En estadios más avanzados de la enfermedad se produce rotura y fibrilación del tejido acompañado por aumento de condrones (agrupación de condrocitos en pequeños grupos) y finalmente pérdida total del cartílago.^(4,5,6,7)

A pesar de que en la literatura está aceptado que los condrocitos se encuentran en sus lagunas aislados unos de otros sin posibilidad de comunicación directa célula – célula; existen diversos estudios, en modelos animales, que demuestran que los condrocitos en cultivo o en micromasas expresan Cxs, unas proteínas que forman UG y están implicadas en la comunicación directa vía unión entre el citoplasma de dos células.^(8,9)

Prácticamente en todos los tejidos y en particular, por ejemplo, en el hueso, las células están comunicadas mediante UG lo que facilita la comunicación intercelular permitiendo una respuesta coordinada frente a cualquier estímulo de tipo mecánico, humoral o cualquier tipo de daño

tisular.^(10,11) En vertebrados las Cxs, e inexas y panexas en invertebrados, son proteínas transmembrana que permiten la comunicación intercelular gracias a la formación de UG. Una UG (Figura 2) consiste la unión de dos canales denominados conexones localizados cada uno de ellos en el citoplasma de dos células adyacentes; cada canal está compuesto por seis Cxs que pueden ser idénticas (formando canales homoméricos) o diferentes (formando canales heteroméricos). En humanos han sido descritos 21 tipos diferentes de Cxs que se nombran de acuerdo con su peso molecular.⁽¹²⁾ Las propiedades del canal dependen del tipo de conexina (Cx) que lo forme y la capacidad de formar canales homoméricos o heteroméricos se encuentra en la propia Cx, así pues la Cx43 no puede formar canales, por ejemplo con la conexina 26 (Cx26)^(13,14) Las UG son esenciales en la mayoría de los procesos fisiológicos desde la diferenciación hasta la tumorigenesis.



<http://www.hindawi.com/journals/crp/2012/496904/fig1/>

Figura 2: Estructura de las UG

A través de las UG, las células pueden intercambiar iones, metabolitos y segundos mensajeros e incluso pequeñas moléculas de ácidos nucleicos (micro ARN o pequeños ARN interferentes (siARN)). El hecho de que los condrocitos en cartílago expresasen Cxs y fuesen capaces de formar

hemicanales y/o UG favorecería la homeostasis tisular al permitir el flujo de moléculas implicadas en señalización celular o bien al permitir el flujo de metabolitos entre células adyacentes, o bien, entre las células y la matriz, en el caso de los hemicanales. Por ejemplo, se cree que el líquido sinovial es la principal fuente de oxígeno y nutrientes, por lo que los condrocitos localizados en la capa más superficial podrían dispensar glucosa y otros metabolitos a las células localizadas en las capas intermedia y profunda.

Los canales que forman las UG adoptan una conformación abierta o cerrada en función de las necesidades celulares. Además, que una célula exprese Cxs no significa que sea capaz de formar canales funcionales. Los cambios conformacionales que regulan la conformación del canal, están regulados por varios mecanismos entre los que se incluyen la concentración de calcio, el pH, el potencial de membrana y la fosforilación de proteínas u otras modificaciones postraduccionales de la Cx. La apertura y cierre de los canales, así como la permeabilidad a iones y metabolitos, depende de cambios de voltaje, al ser canales voltaje-dependientes.^(15,16) Además las Cxs y/o UG han sido implicadas en diferentes procesos celulares como crecimiento, diferenciación, proliferación, apoptosis o muerte celular.⁽¹⁷⁾ Incluso se ha sugerido que por ejemplo, la Cx43, es capaz de translocarse al núcleo y modificar la expresión génica.⁽¹⁸⁾

Resultados no publicados de nuestro grupo, demuestran que los condrocitos en tejido están físicamente conectados mediante proyecciones del citoplasma que atraviesan la MEC y alcanzan 200 μm de longitud. Estos brazos citoplasmáticos unen físicamente dos células localizadas en lagunas distantes. Además resultados de nuestro grupo revelan que la comunicación célula-célula podría estar ocurriendo a través de canales formados por Cx43. Los canales de Cxs se han relacionado con varias funciones, las más importantes se nombran a continuación: (a)

señalización celular e intercambio de segundos mensajeros, iones, ATP, NAD⁺, (b) función metabólica a través del intercambio de metabolitos como glucosa, (c) regulación de la proliferación celular y modulación de cascadas de señalización celular.

Los objetivos de este trabajo han sido:

- La caracterización y el estudio de las funciones de los canales de conexina en condrocitos articulares humanos. Intercambio de moléculas y metabolitos.
- El estudio de la implicación de los canales de conexinas en la regulación del ciclo celular y proliferación en condrocitos articulares.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 Obtención de las muestras de cartílago

Los estudios se llevaron a cabo usando cartílago humano de rodilla o cadera, proveniente de donantes sanos y pacientes con OA del Complejo Hospitalario Universitario de A Coruña (CHUAC); con la aprobación del banco de tejidos del CHUAC. El consentimiento informado fue obtenido previamente a la intervención. Pacientes y donantes de ambos sexos y edad superior a 50 años fueron incluidos en este estudio de acuerdo con el *American College of Rheumatology* (ACR). Este estudio fue aprobado por el Comité Ético de Galicia.

3.2 Procesamiento del cartílago y cultivo de condrocitos

El tejido fue cortado y digerido con 0,5 mg/mL de tripsina (Sigma-Aldrich) y colagenasa tipo IV (Gibco BRL, Invitrogen). Las enzimas estaban preparadas en *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM, Lonza) suplementado con 5% suero bovino fetal (SBF) (Gibco, Invitrogen), 5µg/mL de penicilina (Gibco, Invitrogen), 5 unidades/mL de estreptomycin (Gibco, Invitrogen). El cartílago troceado se dejó durante toda la noche a 37°C en un agitador (Thermoshake, Gerhardt) . El digerido celular fue filtrado a través de filtros (Milipore) de 0,22µm y la suspensión celular resultante lavada dos veces con DMEM suplementado con 10% SBF. Las células obtenidas se reparten a razón de 2,5 millones en frascos de cultivo de 75 y/o 162 cm² (Costar) resuspendidas en DMEM suplementado con 20% SBF. El cultivo se llevó a cabo durante dos semanas a 37°C y 5% CO₂ en un incubador hasta que los condrocitos alcanzasen la confluencia; en este momento se subcultivaron usando DMEM suplementado con 15% suero de embrión bovino (SFT, Gibco Invitrogen) y 100µg/mL de primocín (Invivo Gen PrimocinTM).

Los explantes de cartílago provenientes de cirugía, fueron inmediatamente fijados y congelados en OCT-TissueTek y nitrógeno líquido, etiquetados correctamente y almacenados a -80°C. Los explantes de cartílago que cultivaron durante 17 horas en DMEN sin suero suplementado con 100µg/mL de primocín a 37°C y 5% CO₂ en un incubador; fueron congelados *in situ* en nitrógeno líquido para su almacenamiento a -80°C después del tratamiento o periodo de incubación. Para los estudios de inmunohistoquímica las células fueron sembradas en *chamber slides* (Milipore) y fijadas con acetona a 4° durante 10 minutos. Las *chamber slides* se guardaron a -20°C.

3.3 Extracción de ARNm y ensayos de PCR a tiempo real

La extracción de ARNm se llevó a cabo siguiendo el protocolo descrito en el manual de instrucciones de *Tryzol[®] Reagent* (Invitrogen). Las muestras se trataron con etanol frío al 70% para mejorar la precipitación del ARNm. Para eliminar los posibles restos de ADN, las muestras se sometieron a un tratamiento con el *kit RNAase Free-DNAase* (Invitrogen); a cada muestra se añadió 1µL de desoxirribosil nucleasa I, 2µL del tampón de reacción 10X (200mM Tris-HCL pH 8,4, 20mM MgCl₂, 500mM KCL) completando con agua hasta un volumen final de 20µL. La reacción se incubó durante 15 minutos a 37°C y se paró con ácido etilendiaminotetraacético pH 8 (EDTA) durante 15 minutos a 65°C. La cuantificación de la concentración de ARNm se realizó usando técnicas espectrofotométricas (Nanodrop ND-1000).

Los explantes de cartílago congelados se sometieron a una digestión con 200mM Tris-HCl, 200mM NaCl, 5%SDS, 100mM citrato sódico y proteinasa K (Quiagen[®] Proteinase K) durante toda la noche a 37°C y en agitación. La extracción del ARNm se llevó a cabo siguiendo el protocolo descrito anteriormente.

Posteriormente la síntesis de ADN complementario (ADNc) se realizó utilizando *Superscript[®] VILOTM cDNA Synthesis Kit* (Invitrogen) para la retrotranscripción en una reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Para el estudio de la expresión de determinados genes (Tabla I) se utilizaron cebadores inespecíficos en todos los experimentos; las secuencias de los cebadores se detallan en la tabla II. Como gen de referencia se usó hipoxantina fosforibosiltransferasa 1 (HPRT1) en todos los casos. La cuantificación se realizó usando *SYBR-Green* (Roche) para la PCR a tiempo real (LightCycler 480 Instrument Roche Applied Science). Las reacciones de PCR se llevaron a cabo por duplicado en placas ópticas usando 5µL del ADNc obtenido en la retrotranscripción, 5µL de cada cebador (100µM) y 10µL de *SYBR-Green*. Las condiciones empleadas en la reacción fueron: una incubación de 10 minutos a 95°C; amplificación de 45 ciclos de: 10 segundos a 95°C, 10 segundos a 60°C y 12 segundos a 72°C, un programa de 10 segundos a 95°C y 1 minuto a 65°C y finalmente un enfriamiento durante 20 segundos a 4°C. En esta reacción la cantidad de fluorescencia emitida por la sonda es proporcional a la cantidad de producto que se ha amplificado.

| Genes |
|--|
| GJA1 : Proteína alpha 1 que forma UG. Cx43 |
| GJC1 : Proteína gamma 1 que forma UG. Cx45 |
| GJA3 : Proteína alpha 3 que forma UG. Cx46 |
| GJB2 : Proteína beta 2 que forma UG.Cx26 |
| GJB1 : Proteína beta 1 que forma UG. Cx32 |
| p21 : inhibidor de ciclinas dependientes de quinasa |
| CCND1 : ciclina D1 |
| HPRT1 : hipoxantina fosforibosiltransferasa 1 |

Tabla I: Genes para el estudio de los niveles de ARNm

| Gen | | Cebador sentido 5'→3' | Cebador antisentido 5'→3' |
|--------------|-------|------------------------------|----------------------------------|
| GJA1 | Cx43m | CAATCACTTGGCGTGACTTC | AACGAAAGGCAGACTGCTCA |
| | Cx43p | TTGCAATCTGTGATCCTTGAA | AACGAAAGGCAGACTGCTCA |
| GJC1 | Cx45m | TGGGTAACCGAAGTTCTGGA | CAAATTTGCTTTGCTCATCG |
| | Cx45p | TGGGTAACCGAAGTTCTGGA | TCCAGGATCCAGGTAAAAACC |
| GJA3 | Cx46m | ACCGCACGTGTGAAAGGAAT | GAAGATGAACAGCACGGTCA |
| | Cx46p | ATGCCTGTCCTGTGGAGAAG | GAAGATGAACAGCACGGTCA |
| GJB2 | Cx26m | CTTCCTCCCGACGCAGAG | GCTCATCTCCCCACACCTC |
| | Cx26p | AAGTCCAGGGAGGAGGAAAA | TCGTATCACACCGGAAATCA |
| GJB1 | Cx32m | TGAGACCATAGGGGACCTGT | TCATCACCCCACACACTCTC |
| p21 | | GACTCTCAGGGTCGAAAACG | GCCAGGGTATGTACATGAGGA |
| CCND1 | | TCCTCTCCAAAATGCCAGAG | AGCGTGTGAGGCGGTAGTAG |
| HPRT1 | | TTGAGTTTGGAAACATCTGGAG | GCCCAAAGGGAACTGATAGTC |

Tabla II: Secuencias cebadores

3.4 Técnicas histológicas y ensayos de inmunohistoquímica

Las técnicas histológicas fueron realizadas por los Servicios Centrales de Histomorfología del Instituto de Investigación Biomédica de A Coruña (INIBIC). Los explantes de cartílago se cortaron en secciones de 4µm en el criostato. Las secciones se colocaron en un portaobjetos y se fijaron por deshidratación celular con acetona a 4°C durante 10 minutos, posteriormente se dejaron secar y se almacenaron a -20°C o se usaron directamente para las técnicas histológicas. Para todas las muestras incluidas en este estudio se realizaron dos técnicas: hematoxilina-eosina y safranina-O Fast-green que nos permitieron valorar el aspecto de los cortes de cartílago realizados. En la hematoxilina-eosina, los cortes se descongelaron si procedían de -20°C, se tiñeron con hematoxilina de Harris (Merck) durante 5 minutos, luego se realizó el viraje con agua destilada. Finalmente se tiñeron con eosina (Merck) durante 5 minutos. Los cortes fueron deshidratados en una batería de alcoholes (96°-100°, Panreac química SAU) y finalmente aclarados en xileno (Panreac

Química SAU) y montados con DePeX (BDH Gun[®]). La safranina O Fast-green se realizó para ver el contenido en proteoglicanos y colágeno tipo I de las muestras. Los cortes se tiñeron con Safranina-O (33,33 gramos safranina-O, 483,3 mL agua destilada, 516,6 mL alcohol 96^o) durante 30 minutos, se lavaron con agua destilada y se tiñeron con verde luz (1 gramo de verde luz, 100 mL agua destilada, 0,5 mL ácido acético glacial, 0,5% agua acética) dándoles 4 pases. Fueron deshidratados con alcohol 100^o, se aclararon en xileno (Panreac Química SAU) y se montaron con DePeX (BDH Gun[®]).

Para la inmunohistoquímica, los cortes histológicos se rodearon con un lápiz de aceite y se lavaron durante 10 minutos con PBS (Dako, PBS). El bloqueo de la peroxidasa endógena se llevó a cabo con 100µL peróxido de hidrógeno (H₂O₂, Dako) y metanol durante 10 minutos con un posterior lavado con PBS. Posteriormente se procedió a la incubación con 100µL del anticuerpo primario durante 1 hora; la dilución del anticuerpo primario estaba preparada en un tampón que contenía 0,05 mol/L Tris-HCl pH 7,6 y 1% de suero bovino de albúmina. Después de tres lavados con PBS, las secciones de cartílago se incubaron 100µL del anticuerpo secundario de cabra anti-ratón marcado con peroxidasa (Dako, Dinamarca). Se hicieron tres lavados con PBS y la actividad peroxidasa fue revelada con una solución tampón que contiene H₂O₂ pH 7,5 y con diaminobenzidina (DAB, Dako) en una proporción 1:50. Se añade a cada muestra 100µL de DAB y se incuba durante 2-5 minutos monitorizando la señal. Las secciones fueron posteriormente lavadas con agua destilada para frenar la reacción y contrateñidas con hematoxilina de Gill's III (Merck), deshidratadas en una batería de alcoholes (70^o-96^o-100^o) y montadas en xileno (Panreac Química SAU) con DePeX (BDH Gun[®]). Para las *chamber slides* (Milipore) el protocolo de inmunohistoquímica fue idéntico. Con el objetivo de identificar el grado de lesión de cada muestra, se realizó el *Mankin score* que se trata de un protocolo que permite valorar la integridad estructural del tejido a través de una serie de puntuaciones. Las muestras

se organizaron en grupos (grado I, II, III o IV), según la puntuación obtenida en el test the Mankin. Las muestras fueron analizadas en el microscopio Olympus BX61 usando la cámara digital DP71 (Olympus) y los programas DP Controller y DP Manager. Los anticuerpos utilizados se resumen en la tabla III.

| |
|--|
| Anti-Cx43 (610062) BD Transduction Laboratories |
| Anti-Cx45 (MAB3101) Milipore |
| Anti-collagen-II (MAB1330) Milipore |
| Anti-PCNA (NA03) Calbiochem |

Tabla III: Anticuerpos para inmunohistoquímica

3.5 Estudios de electrofisiología

3.5.1 *Dual voltage-clamp*

La técnica fue realizada en colaboración con el laboratorio de Peter Brink y Virgin Valiunas de Stony Brook, *University, New York*.^(19,20) Los experimentos se llevaron a cabo con células crecidas durante 2-5 semanas en DMEN suplementado con 15% SFT y 100µg/mL de primocín enviadas desde el INIBIC. Los experimentos se realizaron con pares de células. Las células se colocaron sobre una *chamber* experimental y se llevaron a un microscopio invertido acoplado a un sistema de fluorescencia (Olympus IX71). La *chamber* fue tratada a temperatura ambiente (22°C) con una solución que contenía 150mM NaCl, 150mM KCl, 150mM CaCl₂, HEPES pH 7,4 y glucosa 5mM. Además se añadió 2mM CsCl y 2mM BaCl₂. Posteriormente las pipetas *patch* se rellenaron con una solución que contenía 120 mM K⁺ aspartato-, 10mM NaCl, 3mM MgATP, HEPES pH 7,2, EGTA (pCa 8) filtrada a través de filtros de 0,22 µm de poro. Las pipetas cargadas tenían una resistencia de 1-4 MΩ. Para

perforar las células la pipeta contenía una solución con 30-50 μ M b-escin⁽²¹⁾. El protocolo para generar UG fue: un voltaje positivo y negativo de 2 segundos de duración seguido de otro de amplitud similar de diferente polaridad e igual duración. Los diferentes pasos se aplicaron desde 10 mV en incrementos de 20 mV hasta alcanzar los 110 mV. Las señales de voltaje emitidas fueron recogidas mediante amplificadores (Axopatch 200B). Las señales se digitalizaron utilizando un convertidor (Digidata 1322A, Molecular Devices) y guardados en un ordenador. Los datos y el análisis de los mismos fue realizado con el programa pClamp9 (Molecular Devices). El análisis estadístico se llevó a cabo con el programa SigmaPlot y SigmaStat (Jandel Scientific).

3.5.2 Inyección del fluoróforo

La técnica fue realizada en colaboración con el laboratorio de Peter Brink y Virgin Valiunas de la Stony Brook, *University, New York*⁽¹⁹⁾. El Lucifer Yellow (LY, Molecular Probe) se cargó en las pipetas disuelto hasta una concentración final de 2mM. Las células analizadas estaban en contacto, el LY fue inyectado mediante dual voltage-clamp a una de ellas con el objeto de que se transfiriese a la otra a través de los canales formados célula-célula. La fluorescencia se midió utilizando una cámara digital (CCD-camera, HRm Axiocam, 14-bit, Carl Zeiss) y un programa informático *AxionVision* (Carl Zeiss). La emisión de fluorescencia de las células inyectadas y las receptoras se midió a lo largo del tiempo.

3.6 Western-blot

Los cultivos primarios de condrocitos se enviaron al laboratorio de Peter Brink y Virgin Valiunas de la Stony Brook *University, New York* para que realizasen el western-blot. Las mismas cantidades de proteína celular se cargaron en un gel SDS-PAGE al 10% y se transfirieron a una membrana

de nitrocelulosa (Bio-Rad). Los western-blot se incubaron con el anticuerpo anti-Cx43.

3.7 Estudios del ciclo celular y proliferación en condrocitos articulares

3.7.1 Bloqueo de los canales de conexina

Los cultivos de condrocitos se sometieron a diferentes tratamientos con drogas inespecíficas; se utilizó octanol 1mM (Sigma-Aldrich) y ácido 18- β glicirretínico 50 μ M (AGA, Sigma-Aldrich). Las células se recogieron con tripsina (Sigma-Aldrich) y se sembraron en placas Petri de 35cm para facilitar los tratamientos. Como grupos control se utilizaron condrocitos crecidos en DMEN suplementado con 15% SFT y 100 μ g/mL de primocín; además de condrocitos crecidos en DMEN sin suero suplementado con 100 μ g/mL de primocín, durante 48 horas a 37°C y 5% CO₂ en un incubador. Las células fueron recogidas con tripsina y se guardaron a -80°C o se procesaron directamente para citometría de flujo.

3.7.2 Análisis del ciclo celular

Las fases del ciclo celular se analizaron mediante citometría de flujo. Las células se recogieron con tripsina, se fijaron con etanol frío al 70% y se almacenaron a 4°C. Las células se lavaron dos veces con tampón fosfato-salino (PBS, MP) pH 7 y se centrifugaron durante 15 minutos a 2000rpm. Tras la centrifugación se eliminó el sobrenadante y las células se incubaron durante 20 minutos a temperatura ambiente con 4mg/mL de RNAasa (Roche) y 1mg/mL de yoduro de propidio. 20 x 10⁴ células se analizaron en el sorter (BD FACScalibur).

3.8 Estudio de la transferencia de aminoácidos

Los condrocitos primarios se cultivaron en *SILAC[®] Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (SILANTES) marcado con 73mg/mL de L-lisina [¹³C₆] (SILANTES), y en algunos casos con 28mg/mL de L-arginina [¹³C₆, ¹⁵N₄] (SILANTES) suplementado con 10% SBF dializado (SILANTES), 100X de glutamina (SILANTES), 5µg/mL de penicilina (Gibco, Invitrogen) y 5 unidades/mL de estreptomycin (Gibco, Invitrogen). Se disponía de otros condrocitos primarios cultivados en *SILAC[®] Dulbecco's Modified Eagle's Medium* no marcado suplementado con 10% SBF dializado, 73 mg/mL de L-lisina (SILANTES), 28mg/mL de L-arginina (SILANTES), 100X de glutamina, 5µg/mL de penicilina (Gibco, Invitrogen) y 5 unidades/mL de estreptomycin (Gibco, Invitrogen). Se dejó crecer a las células durante una noche en cada uno de los medios o bien, se crecieron durante 3-4 semanas a 37°C y 5% CO₂ en un incubador. Se realizó un co-cultivo en *transwell* para ver la transferencia de aminoácidos utilizando membranas de poliéster de 3µm de poro (Transwell[®] Permeable Support, Corning-NY) adaptables a placas de 6 pocillos. Este protocolo se divide en cuatro etapas: (1) adherencia de las células no marcadas a la membrana, (2) adherencia de las células marcadas a la membrana, (3) lisado y filtrado, (4) análisis de la transferencia de aminoácidos, péptidos y proteínas.

3.8.1 Adherencia de las células no marcadas a la membrana

Las células se lavaron dos veces con *Hank's Balanced Salt Solution* (HBSS, Gibco-Invitrogen) suplementado con 100µg/mL de primocín; se trataron con tripsina y tras una centrifugación de 5 minutos a 1800 rpm se resuspendieron en medio fresco no marcado. 1mL de células se añadió a la parte inferior de la membrana y se dejaron a 37°C y 5%CO₂ 3-4 horas en un incubador para asegurarnos de que estaban totalmente adheridas. Como grupo control 1mL de células se añadieron en una placa de 6

pocillos y se dejaron 3-4 horas en un incubador a 37°C y 5% CO₂. El grupo control se utilizó para determinar que la adherencia de las células había sido satisfactoria.

3.8.2 Adherencia de las células marcadas a la membrana

Las células se trataron con HBSS y tripsina como en el caso anterior. Tras la centrifugación, se resuspendieron en medio fresco marcado. 1mL de células se añadió a la parte superior de la membrana y se dejaron 3-4 horas en un incubador a 37°C y CO₂. Como grupo control 1mL de células se añadieron en una placa de 6 pocillos y se dejaron 3-4 horas en un incubador a 37°C y 5% CO₂. Como en el caso anterior, el grupo control se utilizó para ver que la adherencia había sido satisfactoria.

3.8.3 Lisado y filtrado

Las células se lavaron dos veces con PBS, se rasparon con gomas estériles (Sigma-Aldrich), se recogieron en tubos de 1,5 mL (Eppendorf), se centrifugaron a 2000 rpm durante 5 minutos, se eliminó el sobrenadante y se guardaron a -80°C. Para obtener el lisado celular, las células se resuspendieron en 112,5 µL de la solución de lisis (10mM Tris-HCl pH 8, 10mM EDTA pH 8, 1% NP40, 1mM PMSF (fluoruro de fenilmetilsulfonil)) y se dejaron durante 20 minutos a 4°C. Posteriormente se añadió a cada tubo 634,5 µL de la solución de dilución (10mM Tris-HCl pH 8, 10mM EDTA pH 8) y se pasó el contenido de cada tubo por columnas de 50 kiloDaltons (KDa, Amicon[®] Ultra-50K, Milipore) centrifugando durante 40 minutos a 4000g. Después de la centrifugación, el líquido retenido en la parte superior de la columna se guardó a -80°C (extracto mayor de 50KDa). El líquido de la parte inferior de la columna, se puso en columnas de 3KDa (Amicon[®] Ultra-3K, Milipore) y se

centrifugó durante 40 minutos a 4000g. Tras la centrifugación se guardó a -80°C el líquido contenido tanto en la parte superior (extracto mayor de 3kDa) como inferior de la columna (extracto menor 3KDa).

3.8.4 Análisis de la transferencia de aminoácidos, péptidos y proteínas

Las fracciones correspondientes a las moléculas del extracto menor de 3 KDa fueron secadas usando la *speedvac* (Savant SPD 121P, Thermo) para ser analizadas en el estudio de la transferencia de aminoácidos libres (L-lisina y L-arginina) mediante el *kit EZ:faast™* (Phenomenex) y espectrometría de masas utilizando el Orbitrap (Thermo) para determinar la masa exacta de cada aminoácido y poder cuantificar la transferencia de aminoácido marcado. Este análisis fue realizado en los Servicios Centrales de la Universidad de A Coruña (UDC). Los péptidos y las proteínas se analizaron usando nanocromatografía líquida (Tempo™ Nano-LC, Applied Biosystems) acoplada a espectrometría de masas (MALDI TOF/TOF, ABSciex) realizado por el Servicio de Proteómica del INIBIC. Los péptidos eluidos en la columna usada en la nanocromatografía, se mezclaron con la matriz α -ciano-4-hidroxiciano (3 mg/mL TFA, 70% acetonitrilo) y se plaquearon sobre la placa del MALDI. Los péptidos presentes en cada una de las gotas de la placa de MALDI se separaron en el espectrómetro de masas en función de la relación masa/carga (m/z) obteniendo como resultado los espectros de “huella peptídica”, donde la intensidad de cada pico se usó para la cuantificación. Las proteínas se identificaron a partir de los espectros de fragmentación obtenidos mediante espectrometría de masas en tándem tipo TOF/TOF.

4. RESULTADOS

4.1 Los condrocitos articulares humanos expresan Cx43

El cultivo de condrocitos articulares en monocapa presenta limitaciones ya que si su cultivo se prolonga en el tiempo pueden diferenciarse a otro tipo celular. A pesar de ello, el cultivo en monocapa ha sido una estrategia que ha permitido el uso de los condrocitos articulares como modelo para el estudio de los mecanismos moleculares implicados en la homeostasis del cartílago articular adulto. Los condrocitos se crecieron a 37°C y 5%CO₂ en un incubador durante 2-5 semanas. Para asegurarnos de que mantenían su fenotipo y que no se habían diferenciado a otro tipo celular, se testó el colágeno tipo II (Col2A) mediante inmunohistoquímica (Figura 3A) y se observó que era positivo frente a su control negativo. Mediante análisis de PCR a tiempo real se pudo comprobar que los condrocitos expresan altos niveles del ARNm de la Cx43 con respecto al gen de referencia HPRT1. Hemos analizado tanto el transcrito primario (intrón-exón, transcrito primario; Cx43p) como el mensajero (exón-exón, ARN mensajero; Cx43m) y se observó una mayor expresión de CX43m con respecto a los bajos niveles observados para el transcrito primario (Cx43p) (Figura 3B). Además los experimentos de western-blot realizados por Peter Brink y Virgin Valiunas, confirman que la Cx43 se expresa a altos niveles, en comparación con una línea celular que contiene altos niveles de la proteína. (Figura 3C).

Una vez formada la proteína, la Cx43 oligomeriza para formar los conexones en el retículo endoplasmático (RE) y aparato de Golgi (AG), para ser así posteriormente, introducida en vesículas que serán transportadas a la membrana. Aunque los condrocitos expresen Cxs, pueden no formar canales funcionales en la membrana. Con el objetivo de testar cual era la localización de la Cx43 en los condrocitos, y más especialmente, para determinar si se encuentra localizada en la

membrana, se realizó una inmunohistoquímica (anti-Cx43) contrateñida con hematoxilina de Gill's. Con esta técnica podemos diferenciar el núcleo (púrpura) del citoplasma (rosa) como se observa en el control negativo. (Figura 3D) La Cx43 está principalmente localizada en el citoplasma de las células, aunque también puede detectarse entre el citoplasma de dos células vecinas (flechas rojas). Además hemos detectado pequeños puntos positivos en el margen del citoplasma (flechas verdes) lo que indica que la célula puede estar comunicándose a través de estos canales con el medio extracelular, lo que se denominarían hemicanales.

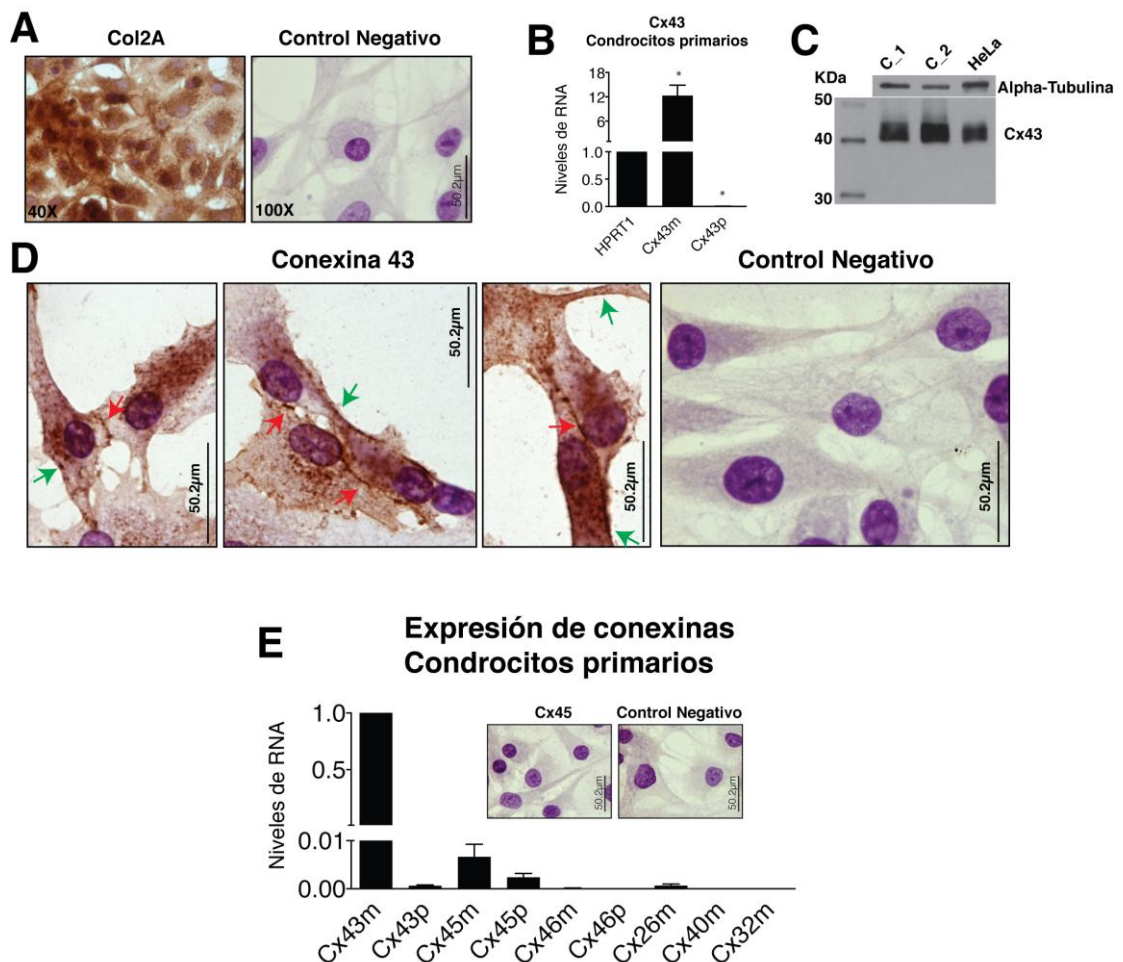


Figura 3: (A) Los condrocitos mantienen altos niveles de Col2A en cultivo. (B) Los datos se mostraron con $\text{media} \pm \text{S.E.M. n=4, p}<0,05$; test Mann-Whitney. (C) Western-blot utilizando condrocitos primarios en cultivo (C_1 y C_2), HeLa y el anticuerpo anti-Cx43. (D) Localización citoplasmática en los bordes de la membrana (flechas verdes) así como puntos positivos entre dos células en contacto (flechas rojas) para la Cx43.

Debido a que hemos detectado la presencia de altos niveles de Cx43 en condrocitos primarios de donantes sanos, decidimos estudiar la expresión de otras Cxs. Elegimos la Cx45, Cx32, Cx46 y Cx26 basándonos en la expresión de conexinas en células mesenquimales, células de la membrana sinovial y hueso. Como muestra la figura 3E sólo detectamos expresión de Cx43 y Cx45 (Figura 3E). Aunque los datos revelan bajos niveles del ARNm de la Cx45, con ensayos de inmunohistoquímica (anti-Cx45) no fuimos capaces de detectar la proteína.

Los resultados obtenidos nos llevaron a trasladar los experimentos a explantes de cartílago congelado. Se extrajo el ARNm de las secciones de tejido congeladas y se analizó la expresión de conexinas mediante PCR a tiempo real, demostrando que el cartílago de donantes sanos expresa ARNm de la Cx43 (Figura 4A). Sin embargo, el patrón de expresión en tejido difiere del observado en los condrocitos en cultivo (Figura 3B). En tejido se detecta tanto mensajero de la Cx43 (Cx43m) como transcrito primario (Cx43p), los condrocitos en cultivo presentaban altos niveles de Cx43m; pero no Cx43p.

El cartílago está estructuralmente organizado y puede dividirse en tres zonas diferentes: capa superficial, capa intermedia y capa profunda (Figura 4B y 4C). Debido a que hemos estudiado la expresión de la Cx43 en tejido, decidimos investigar su presencia en las diferentes zonas del cartílago. Para ello se realizó una inmunohistoquímica (anti-Cx43) contrateñida con hematoxilina de Gill's, para detectar la presencia y localización de la proteína en el tejido. Se detectaron puntos correspondientes a la Cx43 en todas las capas del tejido (Figura 4D). La población de condrocitos inmuno-positivos en las capas superficial e intermedia, es similar a los detectados en la capa más profunda. Además, encontramos que la Cx43 se localiza mayoritariamente en el margen de las células formando puntos que pueden representar a los hemicanales o

UG. De hecho, se han detectado puntos positivos localizados entre dos células vecinas (flechas verdes).

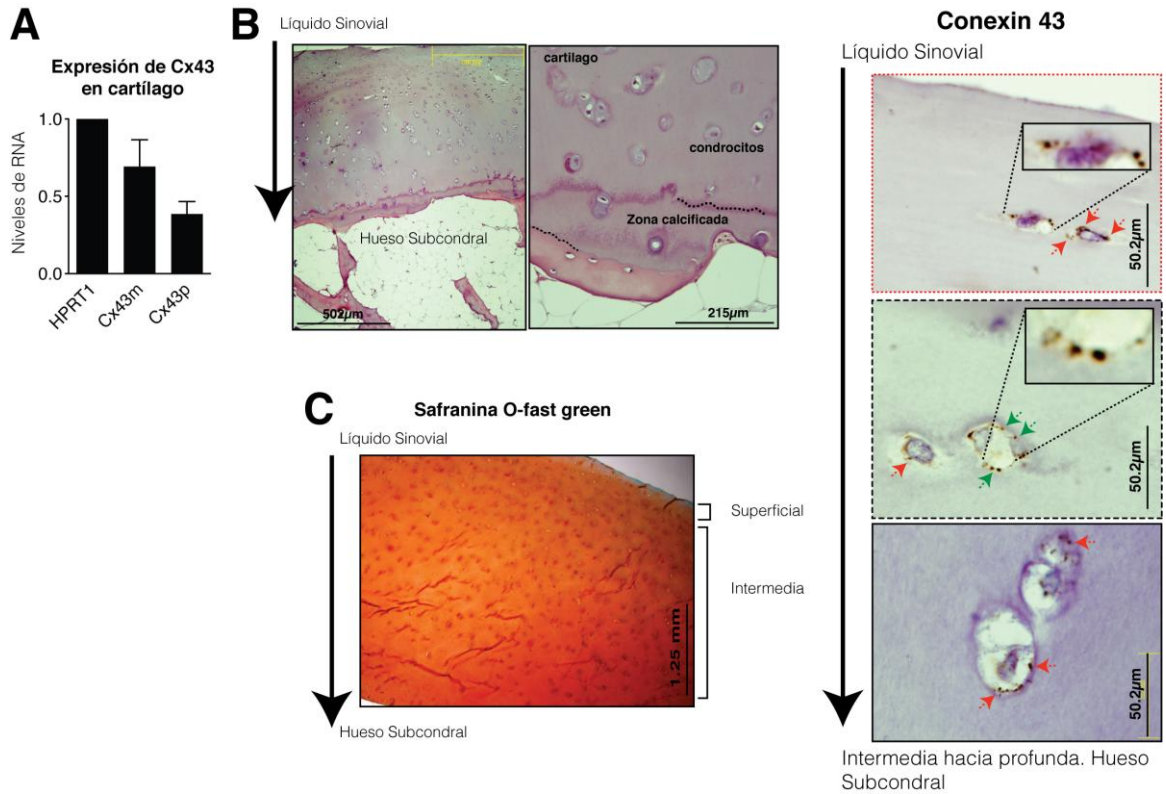


Figura 4: (A) Expresión de Cx43 en tejido. Los resultados obtenidos representados como media \pm S.E.M. $n=4$ (B) Estructura histológica del cartílago articular. La imagen corresponde a una hematoxilina-eosina. (C) Safranina-O Fast green del cartílago articular. (D) Localización de la Cx43 en las diferentes capas del cartílago articular, flechas rojas indican localización en el borde del citoplasma, flechas verdes indican puntos positivos entre dos células adyacentes de la misma laguna.

4.2 Los condrocitos forman canales funcionales voltaje-dependientes formados exclusivamente por Cx43.

La localización de la Cx43 en la membrana plasmática sugiere que los condrocitos, tanto en cultivo como en el cartílago podrían formar UG lo que permitiría el paso de iones, metabolitos y segundos mensajeros entre células adyacentes. Para estudiar si los canales de Cxs en condrocitos en

cultivo son canales funcionales utilizamos la técnica denominada *dual voltage-clamp* descrita en material y métodos. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 5A donde puede observarse el patrón de voltaje típico de las UG formadas exclusivamente por Cx43. Además mediante la inyección de fluoróforos como el LY, se comprobó que los condrocitos son capaces de transferir moléculas a través de los canales de conexina. (Figura 5B). El LY es una molécula fluorescente e impermeable de modo que cuando es inyectada en una célula no puede salir al medio externo; si detectamos la presencia de esta molécula en las células adyacentes, la única vía de transporte es a través de los canales funcionales de conexinas. Como se puede ver en la figura 5B la célula fueron inyectadas con LY y se midió la señal en la célula en contacto directo a los 2, 7 y 12 minutos observando que la emisión de fluorescencia va en aumento progresivamente al tiempo. Los resultados obtenidos con estas dos técnicas demuestran que los condrocitos de cartílago adulto son capaces de comunicarse a través de canales funcionales voltaje-dependientes formados por Cx43.

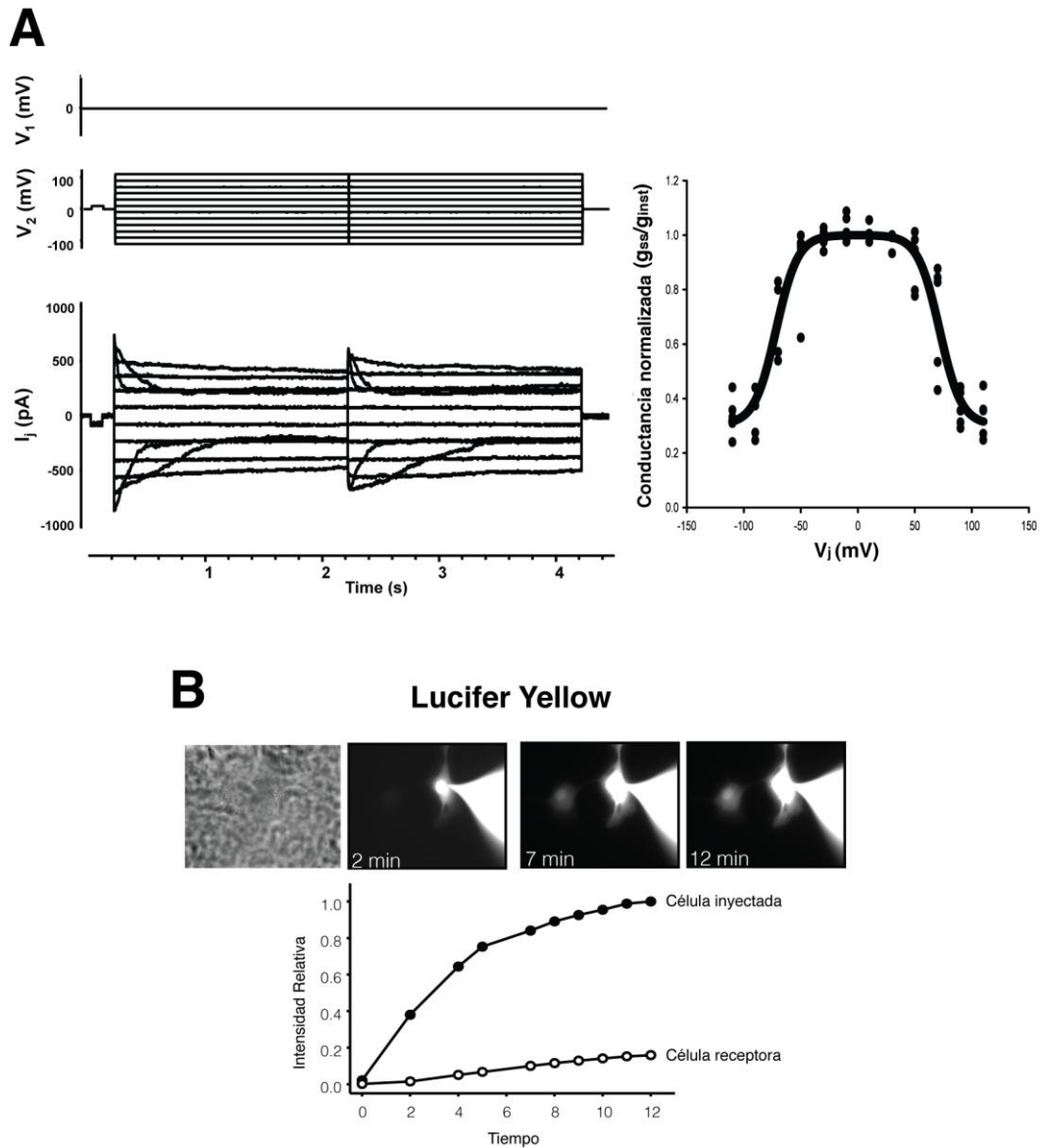


Figura 5: (A) Patrón de voltaje de condrocitos que demuestran que forman canales funcionales voltaje-dependientes formados por Cx43. (B) Transferencia de LY a través de los canales de Cxs.

Resultados obtenidos utilizando la tinción DAPI en tejido, sugirieron que los condrocitos podrían estar intercambiándose pequeñas moléculas de ácidos nucleicos (Figura 6A). Para estudiar si a través de las UG, los condrocitos podrían intercambiar oligonucleótidos, se diseñó una sonda de 12 oligonucleótidos modificados químicamente (morfolinos) para aumentar la estabilidad en solución, y se estudió su transferencia al marcarlos con fluorescencia (Figura 6B). Los resultados muestran que los

condrocitos podrían transferirse pequeñas moléculas de ácidos nucleicos y que la transferencia del oligo es proporcional al tiempo.

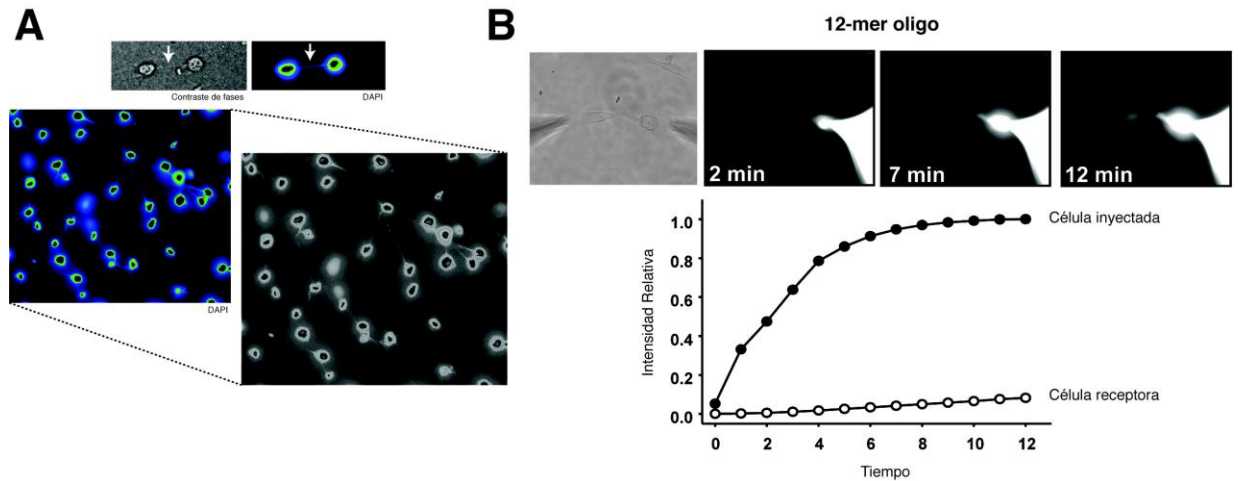


Figura 6: (A) Tinción DAPI en cartílago articular. Abajo a la derecha se muestra una imagen tratada para aumentar las señales obtenidas en el microscopio de fluorescencia. La imagen original está a la izquierda. (B) Los resultados mostrados, demuestran que los condrocitos articulares son capaces de intercambiar a través de las UG, pequeñas moléculas de ácido nucleico

4.3 Función metabólica de las UG en condrocitos articulares humanos

Utilizando el sistema de co-cultivo en *transwell*, donde dos poblaciones celulares provenientes del mismo donante se cultivaron conjuntamente separadas por membranas de 3µm de poro para permitir el contacto celular a través de las UG; pero evitando la transferencia de metabolitos a través del medio de cultivo. Una población de células fueron crecidas en medio SILAC marcado con L-lisina [$^{13}\text{C}_6$], éstas actúan de células donantes ya que estaban marcadas con aminoácidos no presentes de manera natural en las células y por lo tanto se colocaron en la parte superior de la membrana para facilitar la transferencia. La otra población, consta de células crecidas en medio SILAC sin marcar que contenía L-

lisina y L-arginina, aminoácidos presentes de forma natural. Estas células se colocaron en la parte inferior de la membrana y actuarían como células receptoras. Además, un grupo control de células se colocaron en la base del pocillo donde se llevaron a cabo los experimentos de manera que si detectamos la incorporación de los aminoácidos marcados en estas células, determinaría que la transferencia se produce a través de difusión y no mediante las UG (Figura 7).

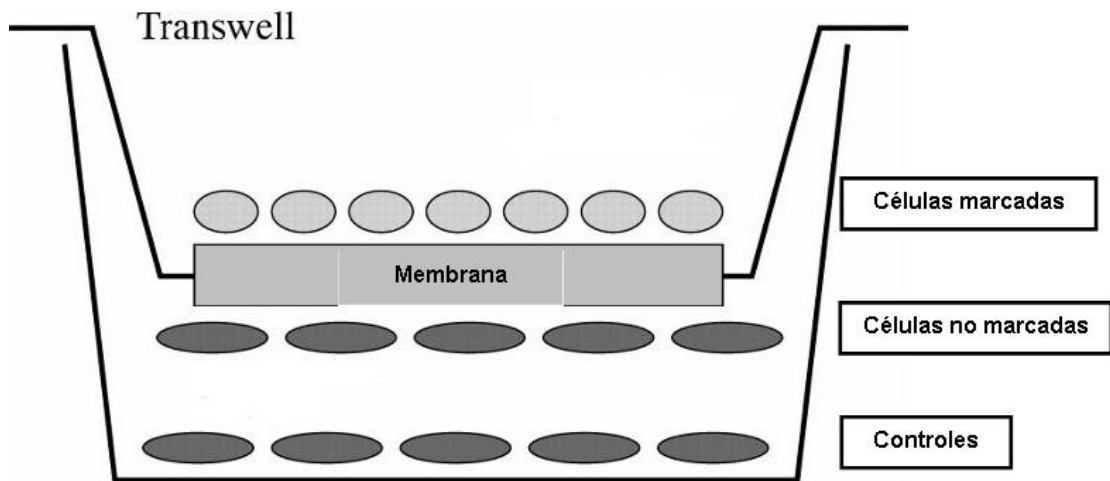


Figura 7: Estructura de la membrana y colocación de las células para el co-cultivo en *transwell*

Resultados obtenidos con esta técnica revelan que los condrocitos en cultivo son capaces de intercambiar aminoácidos libres como L-lisina y L-arginina. Las poblaciones de condrocitos se cultivaron conjuntamente en la membrana durante 4 horas, posteriormente se recogieron las células, se separaron las fracciones y se realizó el análisis de la transferencia de aminoácidos mediante Orbitrap. Las células que estuvieron creciendo durante toda la noche con L-lisina marcada incorporaron una cantidad del orden de 0,0235 nmol/mL de este aminoácido y fueron capaces de transferir 0,0175 nmol/mL a las células receptoras durante las 4 horas que

estuvieron en la membrana conjuntamente. (Figura 8A) Como grupo control del experimento y de la cuantificación se analizó por Orbitrap la presencia de L-arginina en un cultivo celular que no estuvo en contacto con L-arginina marcada por lo que no se detectó L-arginina marcada en ningún momento (Figura 8B).

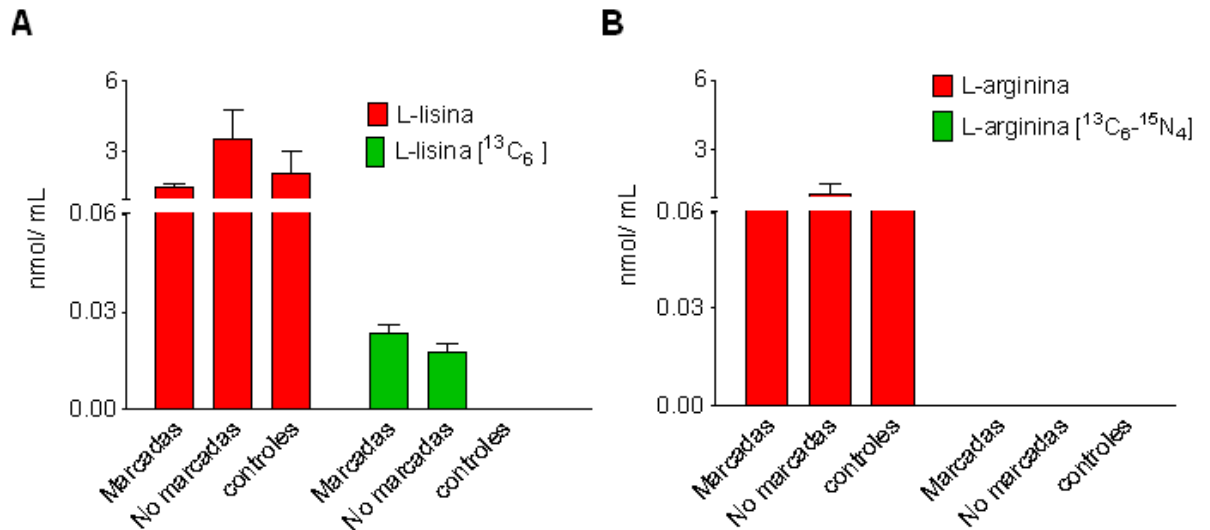


Figura 8: (A) Transferencia de L-lisina [¹³C₆] entre células marcadas y no marcadas en co-cultivo en transwell. (B) Detección y cuantificación de L-arginina [¹³C₆-¹⁵N₄]

La transferencia de aminoácidos a través de los canales podría implicar a las UG directamente en funciones metabólicas de la célula. Para confirmar que los condrocitos a través de estos canales podrían intercambiarse otros metabolitos como la glucosa, le enviamos condrocitos primarios en cultivo al laboratorio de Peter Brink y Virgin Valiunas. La glucosa fluorescente fue inyectada con la micropipeta en la célula marcada con la flecha amarilla de la figura 9. Las células fueron monitorizadas hasta un total de 22 y 35 minutos por microscopía fluorescente (Figura 9).

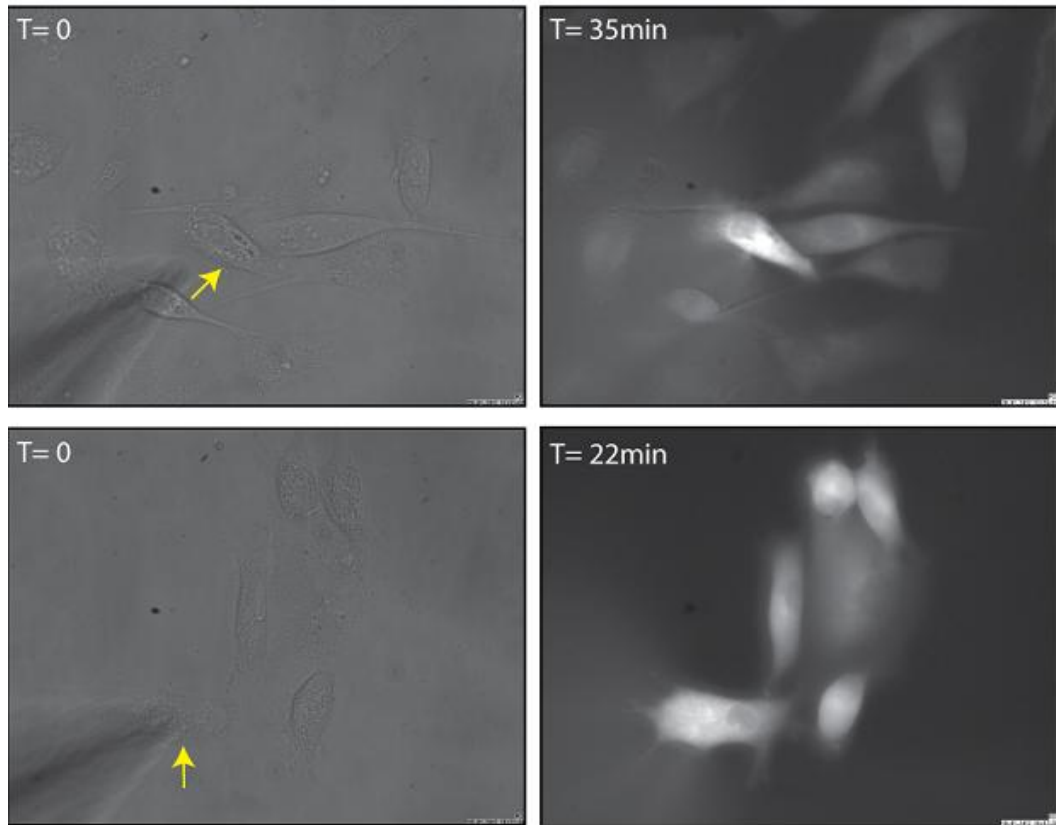


Figura 9: Transferencia de glucosa entre células en contacto

4.4 Los canales de Cx43 de condrocitos adultos están implicados en proliferación celular

El PCNA es una proteína importante en el metabolismo de ácidos nucleicos y en los procesos de replicación y reparación del ADN y se localiza en el núcleo de las células que están en división. Las técnicas histológicas (Figura 10A) revelan que existen bajos niveles de PCNA en el citoplasma de cartílago de donantes sanos; sin embargo, el cartílago de pacientes con OA presenta valores elevados de PCNA nuclear tanto en la capa superficial como en la intermedia donde el cartílago está muy dañado. Cuando comparamos las células positivas para Cx43 (Figura 10B) detectamos niveles muy elevados de Cx43 en agrupaciones celulares que aparecen exclusivamente en la capa superficial del cartílago de alguno de los pacientes con OA. Es importante decir que estas

agrupaciones de células en la capa superficial presentan proyecciones y elevadas tasas proliferativas al ser comparadas con los condrocitos que aparecen normalmente en la capa superficial.⁽²²⁾ Además, resultados obtenidos por Raquel Gago demuestran que los condrocitos de cartílago de pacientes con OA tienen mayores niveles de Cx43 en las capas superficial e intermedia, que se corresponden con las mismas zonas donde detectamos mayores niveles de PCNA a nivel nuclear. Estos resultados sugieren que un aumento de Cx43 podría correlacionarse con el aumento de la proliferación celular (altos niveles de PCNA en el núcleo).

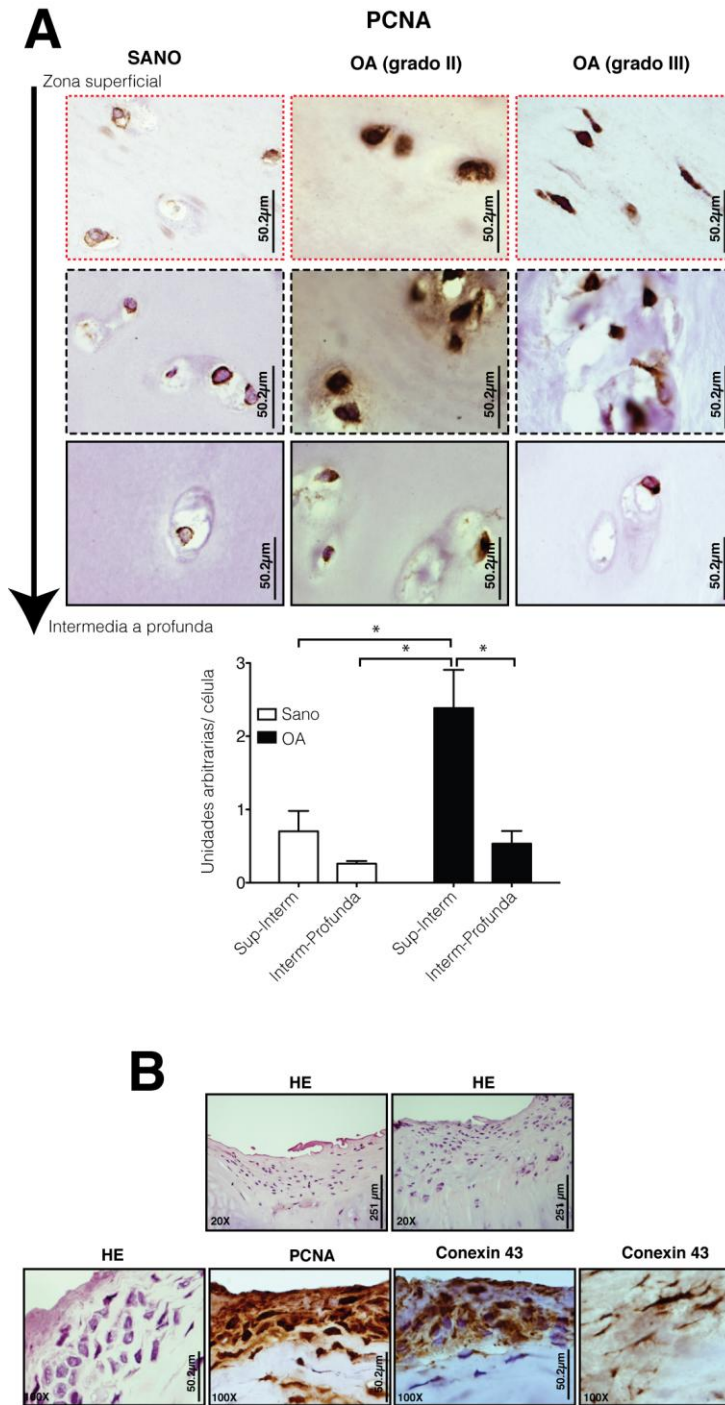


Figura 10: (A) Las imágenes corresponden con los resultados obtenidos por inmunohistoquímica utilizando un anticuerpo anti-PCNA. (B) Hematolixina-eosina, PCNA y Cx43 en cartílago de pacientes con OA.

Para poder estudiar el posible efecto de la actividad de los canales de Cxs en condrocitos articulares humanos en proliferación celular, decidimos utilizar condrocitos primarios en cultivo. Los canales de Cxs fueron bloqueados utilizando octanol 1mM. Los resultados mostrados en la figura 11 corresponden a condrocitos en cultivo provenientes de un solo paciente con OA; por lo que se corresponde con resultados preliminares. Las células fueron crecidas en presencia de DMEN suplementado con 15% SFT durante 48 horas. El mismo número de células fueron crecidas en DMEN sin suero para arrestarlas en fase G0/G1 del ciclo celular. Una vez alcanzadas las 48 horas, se añadió medio con 15% SFT para permitir el avance o entrada en el ciclo celular en presencia o ausencia de octanol 1mM. Los resultados obtenidos del análisis de expresión génica muestran altos niveles del inhibidor del ciclo celular, p21, cuando las células fueron incubadas en ausencia de suero (Figura 11A, barra verde) y disminución de la expresión cuando se le añadió suero al cultivo. En cambio, los niveles de p21 no disminuyeron significativamente en presencia de 1mM de octanol (Figura 11A, barra azul y púrpura). Los resultados de citometría de flujo, confirmaron el arresto del ciclo celular en ausencia de suero y la salida de G0/G1 cuando le añadimos medio con 15% SFT al cultivo (Figura 11C, verde). Sin embargo, cuando las células fueron incubadas con octanol 1mM no fueron capaces de salir de G0/G1 a fase S (Figura 11C, rojo). Los resultados de expresión génica muestran que en este caso, la inhibición de los canales de conexina no permitió la disminución de la expresión de p21 y mostró muy bajos niveles de la ciclina D1 (CCND1) en comparación con el grupo no tratado (Figura 11A,11B, barras púrpura).

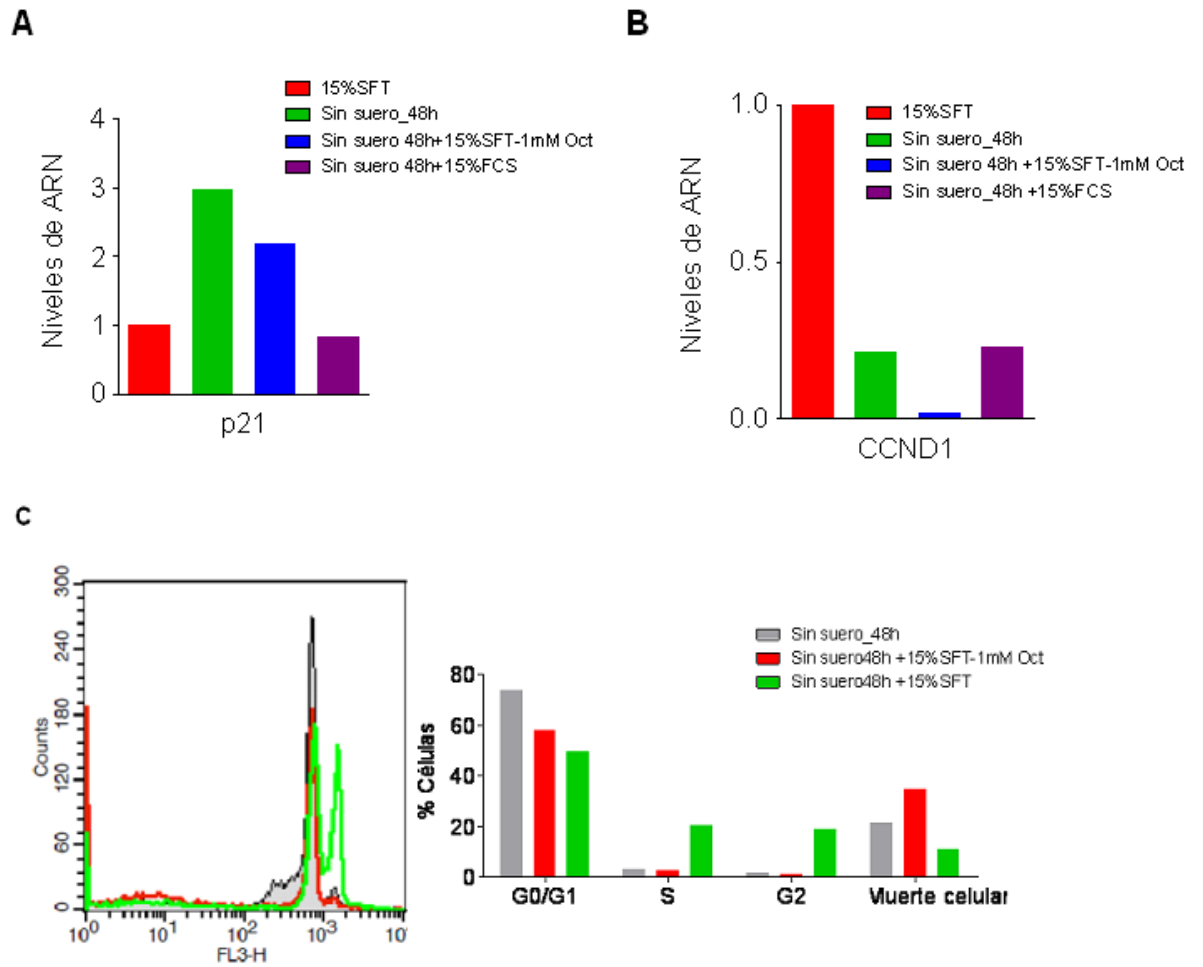


Figura 11: (A) Análisis de la expresión de p21 en condrocitos tratados y no tratados con octanol 1mM y crecidos en presencia/ausencia de suero. A las células crecidas en ausencia de suero se les añadió durante 24h suero para permitir la entrada en fase S/M del ciclo celular. (B) Análisis de la expresión de la CCND1. (C) Análisis del ciclo celular y cuantificación mediante citometría de flujo.

5. DISCUSIÓN

El objetivo de este trabajo ha sido la caracterización y el estudio de los canales de conexina en condrocitos articulares combinado con el estudio de la implicación de los canales en otro tipo de procesos como la proliferación celular. Los resultados de este proyecto demuestran que los condrocitos en cultivo expresan altos niveles de Cx43. Aunque en los ensayos de expresión génica pudimos detectar Cx45, cuando realizamos las inmunohistoquímicas no fuimos capaces de detectar positividad para la proteína. Por otro lado, la Cx43 mostró gran positividad. Previamente en otros estudios utilizando condrocitos de diferentes especies ^(8,9), se demostró que los condrocitos articulares expresaban Cx43. Esto no fue relevante ya que hasta ese momento, los condrocitos estaban considerados como células aisladas, no comunicadas y localizadas en el interior de lagunas en la MEC. En este trabajo se demuestra que los condrocitos expresan Cx43 tanto en cultivo como en tejido. Es posible que los condrocitos en cultivo también formen UG o hemicanales funcionales ya que los resultados de las inmunohistoquímicas mostraron positividad muy bien localizada en el margen de las células probablemente en la membrana plasmática. Las UG permiten la propagación de potenciales de acción en el corazón y proporcionan la base para la sinapsis eléctrica en las células nerviosas ⁽²³⁾. Además se ha descrito que los canales de conexinas son esenciales en el funcionamiento de todos los tejidos estudiados. Mediante experimentos de *dual voltage-clamp*, hemos demostrado que los condrocitos en cultivo retienen la capacidad de formar canales funcionales voltaje dependientes formados exclusivamente por Cx43 (Figura 5). Los resultados mostrados en las figuras 5B y figura 6, demuestran que los condrocitos pueden intercambiar moléculas como LY e incluso pequeñas moléculas de ácidos nucleicos. La transferencia de solutos como el ARN o pequeños ARN interferentes entre células a través de sus canales, ha sido observada por primera vez en el año 1971 ⁽²⁴⁾; pero el tipo de intercambio al que se refería está actualmente asociado

con procesos de exocitosis y endocitosis. Más tarde, Peter Brink y colaboradores ^(25,26), demostraron utilizando diferentes líneas celulares que las células en contacto eran capaces de intercambiar pequeñas moléculas de ácidos nucleicos a través de canales voltaje dependientes formados por Cx43. La transferencia de ácidos nucleicos de pequeño tamaño entre condrocitos podría ser importante ya que el intercambio entre células adyacentes podría estar implicado en procesos celulares fundamentales como el silenciamiento a través de los pequeños ARN interferentes ⁽²⁷⁾.

Una vez caracterizada la funcionalidad de los canales de Cxs, decidimos investigar si a través de las UG los condrocitos podrían estar intercambiándose glucosa o aminoácidos. El cartílago al igual que el cristalino, es un tejido avascular, por lo que al igual que ocurre en el cristalino ⁽²⁸⁾, las UG podrían estar jugando un papel fundamental para mantener los niveles de metabolitos y glucosa constantes en todas las zonas del tejido. Los resultados obtenidos de la combinación del cocultivo en *transwell* con el análisis mediante Orbitrap mostrados en la figura 8 demuestran que los condrocitos pueden intercambiar aminoácidos como L-lisina. El intercambio de aminoácidos solamente pudo haber sido a través de las UG formadas ya que la membrana que separaba las células presentaba un tamaño de poro de 3µm, lo que permite la migración de las proyecciones o brazos citoplasmáticos (200µm de ancho aproximadamente), pero no el paso de las células de un lado al otro. Por otro lado, los resultados obtenidos después de la inyección de glucosa fluorescente, mostrados en la figura 9, demuestran que los condrocitos en contacto también son capaces de intercambiar glucosa.

Después de demostrar la funcionalidad de los canales de Cxs y caracterizada su función metabólica, decidimos estudiar su papel en proliferación celular. El cartílago de pacientes con OA muestra niveles ligeros de proliferación celular en forma de condrones o agrupamiento de

células, especialmente en las zonas más superficiales y dañadas del tejido. Se sabe, que por algún mecanismo no del todo conocido, los canales de Cxs y/o las Cxs, afectan a proliferación celular de diferentes tipos celulares ^(29, 30), y en especial en el caso de las células tumorales. De hecho, la Cx43 se sabe que es un potente factor supresor de tumores ⁽³¹⁾. Además añadir el hecho de que diferentes quinasas y fosfatasas que regulan el ciclo celular, también modulan la función de la Cx43 ^(32,33,34). Los resultados mostrados en la figura 10A revelan que el aumento de los niveles de PCNA nuclear se correlaciona con el aumento de los niveles de Cx43. Estos resultados nos animaron a investigar si los canales de Cxs regulan de alguna forma el ciclo celular de los condrocitos articulares humanos. Para ello realizamos un experimento *in vitro*, donde condrocitos articulares aislados de cartílago articular fueron crecidos en diferentes condiciones y tratados con un inhibidor de los canales de Cxs. Los resultados obtenidos sugieren que la inhibición de los canales de Cxs disminuye la transcripción de la ciclina D1 y evita la bajada de la expresión de p21, lo que probablemente impide el paso de G0/G1 a fase S. Estos resultados son muy preliminares porque sólo fueron realizados utilizando células de un solo donante; además el donante padecía OA. De cualquier forma, los resultados obtenidos sugieren que la comunicación celular a través de UG en condrocitos procedentes de cartílago humano afectaría a la proliferación celular.

A lo largo de este trabajo hemos demostrado que a través de las UG, los condrocitos pueden intercambiar moléculas del tipo LY, pequeñas moléculas de ácidos nucleicos y además presentan una función metabólica al permitir el intercambio de glucosa y aminoácidos esenciales. Los resultados muestran la importancia de la comunicación directa célula-célula a través de las UG, de lo que se puede sugerir que la pérdida de la comunicación celular a través de las UG podría afectar a diferentes rutas de señalización celular y al metabolismo de los condrocitos en tejido. Alteraciones en estas funciones podrían afectar a la

síntesis proteica de los condrocitos así como, probablemente, a su capacidad proliferativa. Los resultados mostrados en este proyecto, han abierto diferentes líneas de investigación que se llevarán a cabo durante mi proyecto de tesis donde intentaremos estudiar si las alteraciones en la funcionalidad de los canales de conexinas podrían ser los responsables de la degeneración del cartílago que se observa en los pacientes que padecen OA.

6. CONCLUSIONES

- Los condrocitos articulares humanos expresan Cx43 y retienen la capacidad de formar canales funcionales dependientes de voltaje y formados por Cx43.
- A través de las UG, los condrocitos son capaces de intercambiar moléculas y ácidos nucleicos.
- A través de las UG, los condrocitos son capaces de intercambiar glucosa y aminoácidos esenciales. Función metabólica de la UG
- La inhibición de los canales de Cxs probablemente afecte a la proliferación celular en condrocitos articulares.

7. AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi agradecimiento a la Dra María Mayán y al Dr Francisco Blanco por darme la oportunidad de formar parte de este proyecto, especialmente a la Dra María Mayan por sus horas de trabajo, su ayuda y su comprensión en muchos momentos. A Purificación Filgueira, María José Sánchez, Noa Goyanes y Patricia Fernández por el esfuerzo y dedicación que han puesto en este trabajo. A Raquel Gago porque sin ella parte de este proyecto no habría salido adelante y, finalmente a todo el profesorado del máster por las horas dedicadas a nuestra formación. Gracias a la Unidad de Técnicas Cromatográficas de la Universidad de A Coruña, especialmente a Verónica Fernández-Villarrenaga.

8. BIBLIOGRAFÍA

- 1.** Hall AC, Hortwitz ER, Wilkings RJ. The cellular physiology of articular cartilage. *Exp Physiol.* 1996;181: 535-545
- 2.** Ker RF. The design of soft collagenous load-bearing tissues. *J Exp Biol.* 1999; 202: 34-48
- 3.** Tchetina VE. Developmental Mechanisms in Articular Cartilage Degradation in Osteoarthritis. *Arthritis.* 2011
- 4.** Chi SS, Rattner BJ, Matyas RJ. Communication between paired chondrocytes in the superficial zone of articular cartilage. 2004; 205: 363-370
- 5.** Pfander D, Swoboda B, Kirsch T. Expression of early and late differentiation markers (proliferating cell nuclear antigen, syndecan-3, annexin VI and alkaline phosphatase) by human osteoarthritic chondrocytes. *AJP.*2001; 159 (5): 1777-1783
- 6.** Dumond H, Presle N, Pottie P. Site specific changes in gene expression and cartilage metabolism during early experimental osteoarthritis. *Osteoarthritis and cartilage.* 2004; 12(4): 284-295
- 7.** Fernandes C.J., Martel-Pelletier J., Lascau-Coman V. Collagenase-1 and collagenase-3 synthesis in normal and early experimental osteoarthritic canine cartilage: an immunohistochemical study. *J Rheumatol.* 1998; 25(8): 1585-1594
- 8.** Knight MM, McGlashan SR, Garcia M, Jensen CG, Poole CA. Articular chondrocytes express connexin 43 hemichannels and P2 receptors- a

putative mechanoreceptor complex involving the primary cilium? J Anat. 2009; 214: 275-283

9. D'Andrea P, Vittur F. Gap junctions mediate intracellular calcium signalling in cultured chondrocytes. Cell calcium. 1996; 20: 389-397

10. Donahue HJ, Guilak F, Vander Molen MA. Chondrocytes isolated from mature articular cartilage retain capacity to form gap-junctions. J Bone Miner. 1995; 10: 1359-1364

11. Zhang W, Green C, Stott NS. Bone morphogenetic protein-2 modulation of chondrogenic differentiation in vitro involves gap-junction-mediated intracellular communication. J Cell Physiol. 2002; 193: 233-243

12. Dbouk Ha, Mroue RM, El-Sabban ME, Talhouk RS. Connexins: a myriad of functions extending beyond assembly of gap junction channels. Biomed central. 2009; 7(4): 1-17

13. Gemel J, Valiunas V, Brink PR, Beyer EC. Connexin43 and connexin26 form gap-junctions, but not heteromeric channels in coexpressing cells. J Cell Sci. 2004; 117: 2469-2480

14. Ayad WA, Locke D, Koren IV, Harris AL. Heteromeric, but not homomeric, connexion channels are selectively permeable to inositol phosphates. J Biol Chem. 2006; 281: 16727-16739

15. Anumonwo JM, Taffet SM, Gu H, Chanson M, Moreno AP, Delmar M. The carboxyl terminal domain regulates the unitary conductance and voltage dependence of connexin40 gap junction channels. Circ Res. 2001; 88: 666-673

- 16.** Ecker R. pH gating of lens fibre connexins. *Pflugers Arch.* 2002; 443: 843-851
- 17.** Burra S, Jiang XJ. Regulation of cellular function by connexion hemichannels. *Int J Biochem Mol Biol.* 2011; 2(2): 119-128
- 18.** Stains JP, Lecande F, Screen J, Towler DA, Civitelli R. Gap junctional communication modulates gene transcription by altering the recruitment of Sp1 and Sp3 to connexin-response elements in osteoblast promoters. *JBC.* 2003; 278(27): 24377-21387
- 19.** Valiunas V, Beyer EC, Brink PR. Cardiac gap junction channels show quantitative differences in selectivity. *Circ Res.* 2002; 91(2): 104-111
- 20.** Valiunas V, Gemel J, Brinck PR, Beyer EC. Gap junction channels formed by coexpressed connexin40 and connexin43. *Am J Physiol Heart Cir Physiol.* 2001; 281(4): H1675-1689
- 21.** Fan JS, Palade P. Perforated patch recording with beta-escin. *Pflugers Arch.* 1998; 436(6): 1021-1023
- 22.** Holloway I, Kayser M, Lee DA, Bader DL, Bentley G, Knight MM. Increased presence of cells with multiple elongated processes in osteoarthritic femoral head and cartilage. *Osteoarthritis cartilage.* 2004; 12: 17-24
- 23.** Barr L, Dewey M, Berger W. Propagation of action potentials and the structure of nexus in cardiac muscle. *J General Physiol.* 1965; 48: 797-823
- 24.** Kolodny GM. Evidence for transfer os macromolecular RNA between mammalian cells in culture. *Exp Cell Res.* 1971; 65: 313-324

- 25.** White TW, Wang H, Mui R, Litteral J, Brink PR. Cloning and functional expression of invertebrate connexin from *Halocynthia pyroformis*. FEBS. 2004; 577: 42-48
- 26.** Valiunas V, Polosina YY, Miller H, Patapova IA, Valiunienne L, Dorowin S et al. Connexin-specific-cell-to-cell transfer of short interfering RNA by gap junctions. J Physiol. 2005: 459-468
- 27.** Alisky JM, Davidson BL. Towards therapy using RNA interference. Am J Pharmacogenomics. 2004; 4: 45-51
- 28.** White TW, Bruzzone R, Wolfram S, Paul DL, Goodenough DA. Selective interactions among the multiple connexion proteins expressed in the vertebrate lens: the second extracellular domain is a determinant of compatibility between connexins. J Cell Biol. 1994; 125(4):879-892
- 29.** Vinken M, Vanheacke T, Papeleu P, Snykers S, Henkens T, Rogiers V. Connexins and their channels in cell growth and cell death. Cell Signalling. 2006; 18: 592-600
- 30.** Gramsh B, Gabriel HD, Wiemann M, Grummer R, Winterhager E, Biugmann D et al. Enhancement of connexin43 expression increases proliferation and differentiation of an osteoblast-like cell line. Exp Cell Res. 2001; 264: 397-407
- 31.** Zhang YW, Morita I, Ikeda M, Ma KW, Murota S. Connexin43 supresses proliferation of osteosarcoma U2OS cells through post-transcripcional regulation of p27. Oncogene. 2001; 20: 4138-4149

- 32.** Lampe PD, Lau AF. The effects of connexin phosphorylation on gap-junctional communication. *Int J Biochem Cell Biol.* 2004; 36: 1171-1186

- 33.** Koo Sk, Kim DY, Park SD, Kang KW, Joe CO. PKC phosphorylation disrupts gap junctional communication at Go/S phase in clone 9 cells. *Mol Cell Biochem.* 1997; 167(1-2): 41-49

- 34.** Kojima T, Yamamoto T, Murata M, Lau M, Tamako K, Go M et al. Role of the p38 MAP-kinase signalling pathway for connexin32 and claudin-1 in rat liver. *Cell Commun Adhes.* 2003; 10(4-6): 437-443