



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

FACULTADE DE CIENCIAS DA SAÚDE

GRAO/MESTRADO EN ASISTENCIA E INVESTIGACIÓN SANITARIA

ESPECIALIDADE: FUNDAMENTOS DA INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA

Curso académico 2011-2012

TRABALLO DE FIN DE GRAO/MESTRADO

Estudo da función da conexina 43 en condrocitos articulares humano. Identificación das proteínas que interaccionan co dominio C-terminal da Cx43

Raquel Gago Fuentes

Miércoles 30 de Maio de 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 Raquel Gago Fuentes, Licenciada en Bioloxía, realizou o traballo titulado: “Estudo da función da conexina 43 en condrocitos humanos articulares. Identificación das proteínas que interaccionan co dominio C-terminal da Cx43” 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)

ÍNDICE

1-Resumo	5
2-Introducción	6
3-Material e métodos	13
3.1-Cultivo celular	13
3.1.1-Obtención da cartilaxe	13
3.1.2-Obtención de condrocitos	13
3.2-Cultivo de condrocitos en diferentes concentracións de glicosa	14
3.2.1-Estudo da expresión de ARN	14
3.2.1.1-Extracción de ARN	14
3.2.1.2-Reacción en cadea da polimerasa retrotranscriptasa (RT-PCR)	15
3.2.1.3-Reacción en cadea da polimerasa a tempo real (qPCR)	15
3.3-Co-inmunoprecipitación	17
3.4-Western Blot	18
3.5- Tinguadura do xel con coomassie Brilliant Blue G-250 e extracción de péptidos	19
3.6-Purificación dos péptidos mediante columnas <i>Stage Tips</i> C ₁₈	20
3.7-Cromatografía líquida acoplada á espectrometría de masas (Nano-LC-MS/MS).....	20
3.8-Espectrometría de masas (MALDI TOF-TOF)	21
3.9-Identificación das proteínas	21
3.10-Estudos histolóxicos	22
3.10.1-Tecido.....	22

3.10.1.1-Procesamento da cartilaxe	22
3.10.1.2-Hematoxilina-Eosina	23
3.10.1.3-Safranina O Fast Green.....	23
3.10.1.4-Inmunohistoquímica.....	23
3.10.2-Condrocitos en cultivo	24
3.10.2.1-Procesamento dos condrocitos	24
3.10.2.2-Inmunohistoquímica	24
4-Resultados	26
4.1-Expresión de conexinas en condrocitos en cultivo	26
4.2-Localización da conexina 43 en condrocitos en cultivo	27
4.3-Localización de conexina 43 en tecido	28
4.4-Localización de conexinas: 32, 46 e 45	29
4.5-Localización da conexina 43 en tecidos sans e artrósicos	31
4.6-Proteínas unidas ó dominio C-terminal a conexina 43	32
4.7-Cultivo de condrocitos en diferentes concentracións de glicosa ...	38
4.8-Localización da conexina 43 en condrocitos en cultivo en diferentes concentracións de glicosa, estimulantes e drogas	39
5-Discusión	40
6-Conclusións	45
7-Agradecementos	46
8-Bibliografía	47

1-RESUMO

A conexina 43 é unha proteína amplamente distribuída en tódolos tecidos estudados, desenrolando un papel moi importante na comunicación celular. Neste traballo móstranse resultados que verifican a presenza de conexina 43 en cartilaxes articulares humanos, ademáis da existencia de proxeccións citoplasmáticas que comunican fisicamente ós condrocitos en tecido. Os resultados aquí mostrados suxiren que a Cx43 pode viaxar a través do citoplasma utilizando os microtúbulos e os filamentos de actina, alcanzando calquer punto da membrana plasmática incluídas as proxeccións citoplasmáticas. Ademáis, estudando a cartilaxe de pacientes con artrose (OA), puidemos demostrar que os condrocitos OA localizados nas capas superficiais e intermedia do tecido, teñen altos niveis de Cx43. Altos niveis de Cx43 relaciónanse con procesos inflamatorios e dano tisular noutros tecidos. No caso dos condrocitos, a IL1- β ou altos niveis de glicosa no medio de cultivo desencadearon nun incremento da Cx43. Incrementos da proteína, non só afectan á actividade das canles de conexina na membrana citoplasmática, tamén a outras actividades relacionadas ca Cx43 e que poden ocorrer de forma independente a función das canles. Moitas destas actividades modifican diferentes cascadas de sinalización celular e están relacionadas ca interacción de proteínas co dominio C-terminal da Cx43. Neste traballo utilizando co-inmunoprecipitación e espectometría de masas, identificáronse varias das proteínas que interaccionan ca Cx43 en condrocitos articulares provenientes de doadores sanos. Traballos previos no noso grupo de investigación demostraron que moitas das proteínas que interaccionan ca Cx43 como por exemplo a alpha-enolasa ou a anexina V, están alteradas en condrocitos de pacientes con OA. Ademáis detectáronse proteínas que suxieren que a Cx43 podría estar exercendo unha función a nivel nuclear encaixando ca localización nuclear da Cx43 detectada en condrocitos en cartilaxe OA.

2-INTRODUCCIÓN

A cartilaxe articular é o tecido que recobre as superficies óseas nas articulacións móbiles ^[1]. A cartilaxe articular proporciona un revestimento, apropiado caracterizado por ser un tecido liso e resbaladizo que impide o roce dos ósos durante o movemento ^[2]. En adultos é un tecido avascular e aneural composto por un único tipo celular, os condrocitos (representan 2-5% do total do tecido), illados en lagoas embebidas nunha matriz extracelular que eles mesmos sintetizan e manteñen ^[1]. Os principais componentes da matriz extracelular son os proteoglicanos, agreganos, coláxeno II e auga. Morfolóxicamente o tecido divídese en 4 zonas: (1) superficial ou tanxencial, (2), transición ou intermedia, (3) profunda ou radial e (4) zona calcificada ou *tidd line*; en cada unha das zonas os condrocitos teñen unha morfoloxía característica ^[3] (Figura 1).

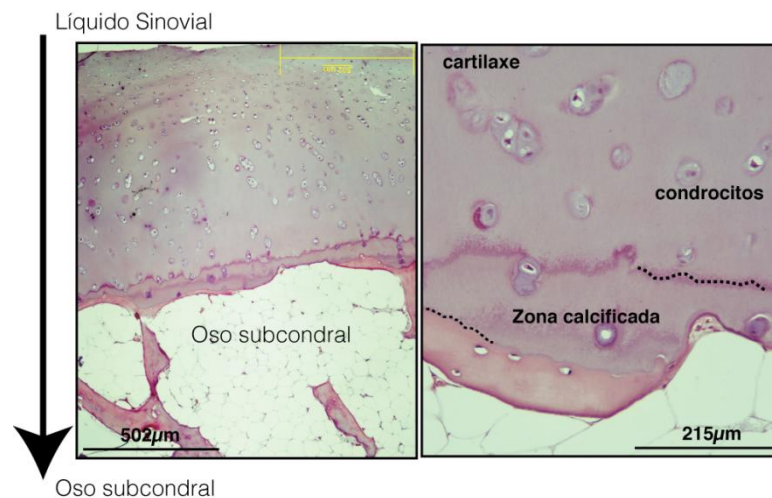
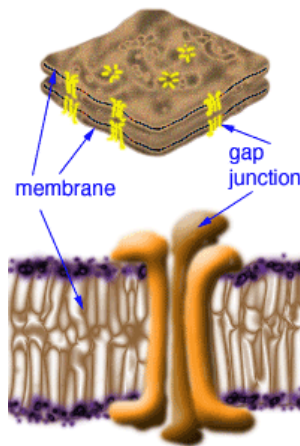


Figura 1. A esquerda amósanse tódalas capas da cartilaxe articular. A dereita vese en detalle a zona calcificada. Microscopía óptica. Hematoxilina-Eosina.

A pesar de que está publicado que os condrocitos non están comunicados fisicamente entre eles varios grupos empregando tecido animal e condrocitos en cultivo detectaron que os condrocitos expresan unha

proteína implicada en comunicación célula-célula, a conexina 43 (Cx43). Víuse inmunohistoquímicamente como en cartilaxes articulares de xeonllo de rato e rata expresabase conexina 43 ^[4], e mesmo hai estudos do mantemento da funcionalidade de esta proteína en condrocitos en cultivo illados da cartilaxe madura de vaca ^[5].

As conexinas conforman unha familia de proteínas transmembrana que permiten a comunicación célula-célula de forma directa, ó formar canles de comunicación intercelular que garantizan o acoplamento eléctrico, este tipo de comunicación denomínase *gap junctions* (GJ) e por elas pódense intercambiar metabolitos (glucosa), segundos mensaxeiros (IP₃) ou ións (Ca⁺²), e recentemente víuse que siRNA ^[6,7] (Figura 2).



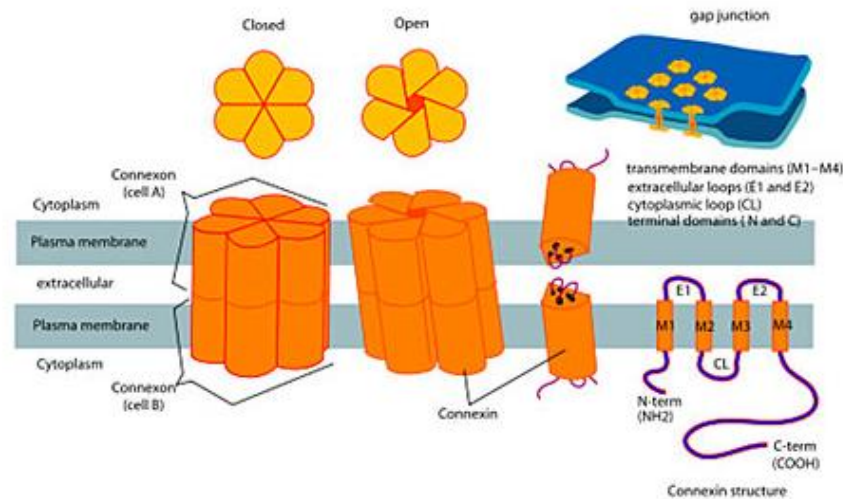
BIOdotEDu © 2003, Professor John Blamire

Figura 2. Debuxo representativo dunha GJ.

Existen 21 tipos diferentes de conexinas ^[8], e segundo os tipos que estén implicados na formación da canle así serán as súas propiedades de conductancia e permeabilidade ^[9]. Cada conexina está conformada por 9 dominios: 4 dominios transmembrana, 3 citosólicos e 2 extracelulares; entre os dominios citosólicos atópanse os extremos N-terminal e C-terminal ^[10]. Ámbolos interactúan con outras proteínas citosólicas, e no

caso do dominio C-terminal, a interacción coas proteínas regula diferentes rutas de sinalización celulares. Dos 21 tipos de conexasinas, a Cx43 é a máis amplamente distribuída entre os vertebrados [11,12].

As canles de *gap junctions* están formados por dous conexóns ou hemicanles, que son 6 conexasinas ensambladas localizadas na membrana plásmática dunha célula e que o poñerse en contacto co conexón doutra célula forman unha canle que permite o contacto directo entre o citoplasma de ámbalas dúas células (Figura 3).



UNSW Cell Biology, 2008 ANAT3231 Lecture 08-Cell Junctions
<http://cellbiology.med.unsw.edu.au/units/science/lecture0808.htm>

Figura 3. Formación dunha *gap junctions*.Detalle dos dominios dunha conexasina.

Unha célula pode formar conexóns, sin que se forme unha canle con outra célula, establecendo comunicación co medio extracelular que a rodea. A este tipo de canle denomínaselle hemicanle. Os conexóns poden estar formados por un único tipo de conexasina (homodímero) ou dous tipos diferentes ou máis (heterodímeros). As canles poden estar formados por dous conexóns iguais (homotipo) ou por dous conexóns diferentes

(heterodímero) [13]. Dependendo da composición da GJ, as propiedades da canle van a ser diferentes afectando ó tipo de moléculas que se poden transferir.

As conexinas teñen un tempo de vida media corto, non máis dunhas poucas horas. A degradación ocorre a nivel da membrana plasmática mediante internalización da placa de conexión liberando as membranas dos conexóns [14,15]. As conexinas pódense degradar por dúas vías diferentes: proteosomal ou lisosomal [13].

A nivel da cartilaxe articular, mediante microscopía óptica e electrónica de varrido (Figura 4), o noso grupo detectou brazos ou proxeccións citoplasmáticas que atravesan a matriz extracelular e comunican fisicamente dous condrócitos localizados en lagoas distantes. Ademais mediante reacción en cadea da polimerasa a tempo real (qPCR) e ensaios de inmunohistoquímica demostramos que os condrócitos articulares de humanos adultos expresan altos niveis de Cx43.

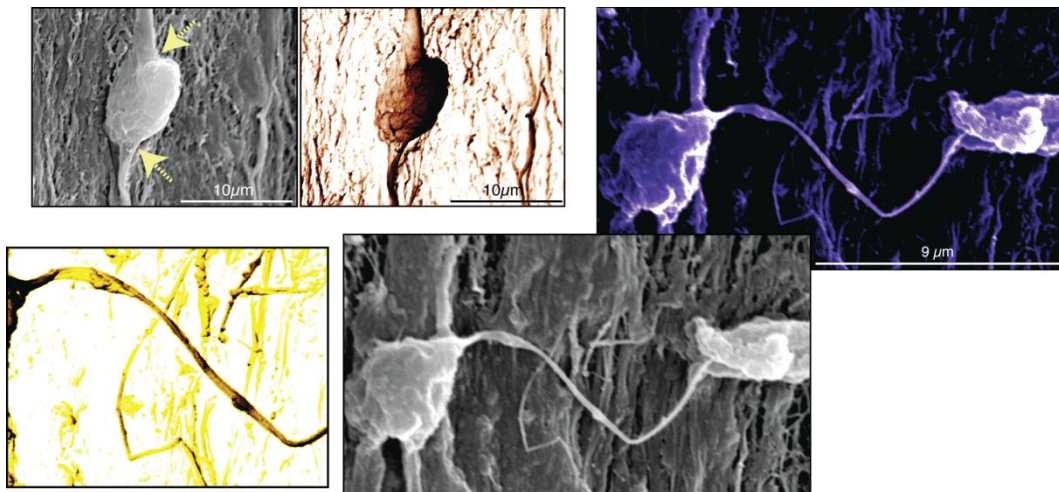


Figura 4. Proxección citoplasmática en condrócitos da cartilaxe articular humana. Microscopía óptica de varrido.

A carencia de comunicación directa entre as células dun tecido é algo deletéreo xa que impide que as súas células respodan de forma coordinada ou simultánea ante estímulos externos e internos, polo que a presenza das canles de conexinas seguramente sexan esenciais para manter a homeostase da cartilaxe articular adulta. De feito, a comunicación directa entre células mediante GJ está considerada actualmente como un mecanismo indispensable para o mantemento da homeostase celular no caso de tódolos tecidos estudados. Este tipo de comunicación está virtualmente presente en tódolos aspectos do ciclo de vida da célula, que vai dende a diferenciación celular ata a súa morte ^[16]. Hai estudos que suxeriron que as *gap junctions* median a coordinación de actividades celulares: morfoxénese, proliferación e control do crecemento ^[17]. Outros estudos indican que certas conexinas – conexina 26, 32 e 43- teñen efecto como supresoras de tumores ^[18]. Mutacións nas conexinas alteran a súa expresión alterando a funcionalidade da canle, o que é característico dalgunhas enfermidades e neoplasmas ^[19,20]. Incluso hai estudos sobre a implicación dos diferentes dominios da Cx43 na regulación do crecemento celular en corazón. Algúns destes estudos suxiren que o dominio C-terminal da Cx43 pódese localizar a nivel nuclear e decrecer a proliferación celular ^[21]. Outros estudos soportan esta hipótese, xa que a delección da Cx43 afecta a expresión xénica a nivel global. Por outra parte, moitas das funcións da Cx43 en canto a regulación da porliferación celular ou control da expresión xénica crese que ocorre independentemente a función da canle na membrana e están directamente relacionados ca interacción de proteínas ó dominio C-terminal da proteína. Como ocorre a nivel do óso ^[10], as *gap junctions* en cartilaxe poderían contribuír a comunicación ou amplificación da resposta condrocítica a sinais extracelulares.

A artrose é unha enfermidade crónica e dexenerativa, caracterizada pola perda progresiva da cartilaxe articular ^[22] (Figura 5). Estímase mundialmente que o 9,6% dos homes e un 18% das mulleres maiores de 60 anos están afectados ^[23]. En España máis do 50% da poboación maior

de 60 anos padece a enfermidade e é a principal causa de incapacidade [3]. Actualmente asociáronse varios factores ó desenrolo da artrose e a destrucción da cartilaxe articular, algúns destes factores son: peso, idade e sexo; pero descoñécese que é o que a inicia, e asóciase a cambios no fenotipo dos condrocitos [24]. Ademais a artrose asóciouse con patoloxías de xeito concomitante, as máis prevalentes son a hipertensión arterial e a *diabetes mellitus* [22].

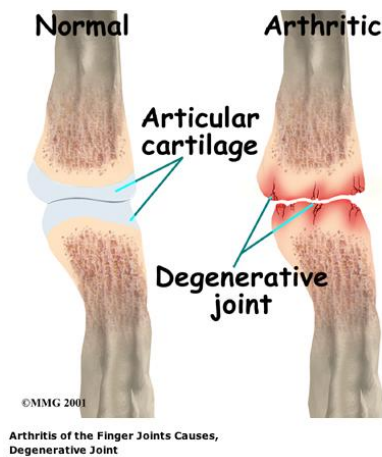


Figura 5. A esquerda represéntase unha articulación san e a dereita unha artrósica.

Con todo este coñecemento sobre a conexina 43 resulta interesante o seu estudo en cartilaxes articulares con artrose e sans, e intentar enxergar a súa posible implicación no desenrolo da enfermidade artrósica.

Planteándonos os seguintes obxectivos:

1. Estudar a expresión e a localización da Cx43 nos condrocitos artrosicos e sans en tecido.
2. Identificar as proteínas que se unen ó dominio C-terminal da Cx43.
A conexina 43 media a activación de diferentes vías de

senalización celular, e as proteínas que interactúan co seu dominio C-terminal están implicadas nesta regulación.

3. Estudar si a glucosa ou a presenza de IL-1 β ou TGF β 3 modifican a expresión da Cx43 ou os niveis da proteína en condrocitos en cultivo.

3-MATERIAL E MÉTODOS

3.1-Cultivo celular de condrocitos

3.1.1-Obtención das mostras de cartilaxe

As mostras de cartilaxe proceden das operacións de substitución da articulación (xeonllo ou cadeira) por unha prótese. Estas operacións realízanse ante dúas situacións: (a) O paciente sofre artrosis e necesita a substitución da articulación como tratamento da enfermidade ou (b) o paciente é unha persoa que sufriu unha fractura na articulación e necesita a súa substitución. Neste caso os pacientes poden ser sans ou artrósicos. As operacións realízanse no CHUAC (Complexo Hospitalario Universitario de A Coruña), e os pacientes donan o tecido de forma voluntaria firmando un consentimento informado. As mostras de cartilaxe de xeonllo tamén se poden obter das donacións de pacientes que sufriron a amputación dunha das extremidades inferiores. Tódalas doacións son tramitadas a través do Biobanco do CHUAC.

3.1.2- Obtención de condrocitos

Cando as mostras de tecido chegan ó laboratorio son dixeridas mecánicamente e quimicamente para obter os condrocitos. A dixestión mecánica consiste en cortar a cartilaxe cun bisturí ata obter un triturado do tecido. Tras isto, comeza a dixestión química que consiste no tratamento do triturado tisular con tripsina 0.5g/ml (Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA) en DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, con 4,5g L-Glucosa y L-Glutamina, Invitrogen Life Technologies Inc, Paisley, UK) en axitación a 37°C durante 10 minutos. Por decantación elimínase a tripsina-DMEM. Engadíuse colaxenasa IV 2mg/ml en DMEM suplementado con 5% SBF (Soro Fetal Bovino, Gibco Invitrogen), deixouse en axitación a 37 °C 18 horas. Posteriormente filtrouse quedando retidos os anacos da cartilaxe que non se dixeriron completamente. Centrifugouse 5 minutos a 1500rpm a temperatura ambiente. O sobrenadente decantouse, e o pellet resuspendeuse en 20 ml de DMEM 5% SBF con 100ud/ml de penicilina e

100µg/ml de estreptomicina. Colléronse 10µl para o reconto de células nunha cámara Neubauer (Marienfeld, Germany). Volveuse a centrifugar nas mesmas condicións, o pellet resuspendiuse en DMEM 10%SBF con 100ud/ml de penicilina e 100µg/ml de estreptomicina nun millón de células/ml. Nos frascos de cultivo de 75cm² (Costar, Cambridge, MA, USA) cultívanse 75.000 células e nos frascos (Costar) de 25cm² (BD FalcontmTM, Bredford, MA, USA), 25.000 células. Deixanse en DMEM 15%SEB (Soro de Embrión Bovino, Gibco Invitrogen) tratado con Primocin 50mg/ml (InvivoGen) ata a súa confluencia. Este período de crecemento non debe superar 5-6 semanas, xa que transcurrido este tempo os condrocitos comezan a diferenciarse a fibroblastos, perdendo as súas características celulares fenotípicas e xenotípicas.

3.2-Cultivo de condrocitos en presenza de diferentes concentracións de glicosa

As células credidas en frascos de 25cm² foron levantadas e pegadas en placas de 6 pocillos con tripsina. Solo se cultivaron 3 pocillos, nos que as células creceron en DMEM 15%SEB ata acadar a confluencia. Logo as células mantivéronse 48 horas en dúas condicións diferentes: (1) DMEM 15%SEF –é o control de experimento- e (2) DMEM sen glicosa 1X (Gibco, Invitrogen) suplementado con glicosa (Sigma) 1mM. O propio medio DMEM contén 25mM de glucosa. Pasadas as 48 horas as células tripsinizáronse. O pellet celular gardouse a -80°C.

3.2.1- Estudo da expresión do ARN

3.2.1.1-Extracción de ARN

A extracción do ARN dos condrocitos en cultivo fíxose con TRIZOL® Reagent (Invitrogen) segundo as instrucións do fabricante. A pureza da extracción determinouse achando o ratio 260/280nm e 260/230nm. Cada extracción tratouse con 1 µL de desoxirribonucleasa I 1U/µl e 2 µL de

tampón de reacción 10X [200 mM Tris-HCl (pH 8.4), 20 mM MgCl₂, 500 mM KCl] (Invitrogen) completando ata 20 µL con auga. A reacción incubouse 15 min a 37°C. A reacción frenouse con 1 µL de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 25 mM (pH 8.0) durante 15 min a 65°C. Cuantificouse co Nanodrop ND-1000 (Nanodrop, Wilmington, USA) medindo cunha lonxitude de onda de 260nm. As extraccións gardáronse a -80°C.

3.2.1.2-Reacción en cadea da polimerasa retrotranscriptasa (PCR-RT)

Tratouse 1µg do ARN con *Superscript®Vilo™ cDNA Synthesis kit* (Invitrogen) no termociclador *AB Science* (Applied Biosystems, Framingham, MA, USA) para a síntesis do ADN complementario (ADNc). Primeiramente o ARN con auga sometíuse 10 minutos a 65°C para a desnaturalización de estruturas secundarias do ARN. Posteriormente engadíronse 2 µl da Mix (5x *Vilo Reaction: Random Primers, MgCl₂+, dNTPs, buffer*). O programa para retrotranscribir consta dos seguintes pasos: 10 minutos a 25°C, 60 minutos a 42°C, 5 minutos a 85°C e 4°C para frenar a reacción. O ADNc diluíuse 10 veces con auga.

3.2.1.3- Reacción en cadea da polimerasa tempo real (qPCR)

Para a cuantificación do ADNc realizouse una qPCR co *LightCycler 480 SBRGreen I Master kit Real Time* (Roche), no termociclador *LightCycler480* (Roche) seguindo o seguinte programa: 1 ciclo de 10 minutos a 95°C, para a activación da *Fast Start Taq ADN polimerasa* e desnaturalización da dobre cadea de ADN; 55 ciclos de amplificación divididos cada un en tres fases: 10 segundos a 95°C para desnaturalización, 10 segundos a 60°C para a hibridación e 12 segundos a 72°C para a extensión; e finalmente o ciclo de desnaturalización para alcanzar a temperatura de fusión (*melting*): de 95°C a 65°C; e un último ciclo de enfriamento de 20 segundos a 4°C.

Os xens a amplificar son os que codifican para a conexina 43 e 45, o transportador de glucosa 1 (GLUT1) e a enzima gliceraldehido 3 fosfato deshidrogenasa (GADPH). Como xen de referencia (*houseskeeping*) empregouse a hipoxantina fosforribosiltransferasa, HPRT1. Os cebadores úsanse cunha concentración de 10mM. Para tódolos casos o produto amplificado ten un tamaño dunhas 200pb. As secuencias dos cebadores (*primers*) amósanse na táboa I e na táboa II, onde tamén se inclúen os cebadores utilizados para amplificar o RNA das conexinas.

XEN	SECUENCIA	
	5' → 3' (<i>forward</i>)	3' → 5' (<i>reverse</i>)
GADPH	AAGCCTGCCGGTACTAAC	ACCCATGACTCAGCTTCTCC
GLUT1	GCATCCAAGCTGTGTCCAAT	GAACAGAATGGGTTGCAAAGA
HPRT1	TGACCTTGATTTATTTTGCATACC	CGAGCAAGACGTTTCAGTCCT

Táboa I: Secuencia dos cebadores GADPH, GLUT1 e HPRT1.

XEN	SECUENCIA	
	5' → 3' (<i>forward</i>)	3' → 5' (<i>reverse</i>)
Conexina32 ARNm	TGAGACCATAGGGGACCTGT	TCATCACCCCACACTCTC
Conexina 40 ARNm	AAGTCCAGGGAGGAGGAAAA	TCGTATCACACCGGAAATCA
Conexina43 ARNm	CAATCACTTGGCGTACTTC	AACGAAAGGCAGACTGCTCA
Conexina 43 ARNp	TTGCAATCTGTGATCCTTGAA	AACGAAAGGCAGACTGCTCA
Conexina 45 ARNm	ATCTGGAAAATTGCAATCAAAA	CTGTAAGGACGATCCGGAAG
Conexina 45 ARNp	TGGTAACCGAAGTTCTGGA	TCCAGGATCCAGGTAAAAACC
Conexina46 ARNm	ACCGCACGTGTGAAAGGAAT	GAAGATGAACAGCACGGTCA
Conexina46 ARNp	ATGCCTGTCCTGTGGAGAAG	GAAGATGAACAGCACGGTCA

Táboa II. Secuencia dos cebadores empregados para diferentes conexinas.

3.3- Co-inmunoprecipitación

As células foron crecidas en frascos de 162cm² ata a súa confluencia en DMEM 5% SEB (Gibcco, Invitrogen). Posteriormente as células foron lavadas dúas veces co medio HBSS (Hanks´Balanced Salt Solution 1x sin CaCl₂ y MgCl₂, Gibco Invitrogen), tripsinizadas e recollidas en DMEM 5%SEB para un tubo (BD Falcon) onde previamente engadíramos una baixa concentración de formaldehído 37% (peso/vol) (Sigma), 400µl/ml (concentración final 1%). O formaldehído actuou 15 minutos, tempo no cal fixa os enlaces entre as proteínas (*crosslinked*). Posteriormente os restos de formaldehído neutralizáronse con glicina (Sigma) 1M, 141µl/ml (concentración final 125mM), durante 5 minutos. Centrifugouse 5 minutos a 2000 rpm, o pellet lavouse con PBS (Tampón Fosfato Salino, MP) que contiña fluoruro de fenilmetilsulfonil, PMSF 1M (Sigma) e as células lisadas con tampón de InmunoPrecipitación (tampón IP) (50mM Tris-HCl pH 7.5, 5mM EDTA pH 8, NP-40 0,5% vol/vol, Tritón x100 1,0% vol/vol, 150mM NaCl) que contiña PMSF e Cocktail de inhibidores (Protease Inhibitor Cocktail, Sigma) para impedir a acción das proteasas. O lisado celular gardouse a -80°C.

Para a co-inmunoprecipitación ^[25] (CoIP) empregáronse esferas de agarosa (*beads*) (SantaCruz Biotechnology, INC). 50µl das esferas de agarosa previamente lavadas dúas veces con tampón IP-PMSF engadíronse a 1 ml do lisado celular para eliminar posibles inespecificidades antes de engadir o anticorpo. Neste punto gárdanse 50µl de extracto celular total. A mostra dividiuse en 500µl como control negativo e 500µl para a CoIP, ambos 500µl leváronse a 1ml con tampón IP. O control negativo procesouse igualmente pero sen anticorpo. As mostras foron incubadas durante 45 minutos a 4°C en rotación. Despois de eliminar as *beads* mediante centrifugación (2000rpm, 30 segundos), 1µg de anticorpo foi engadido e despois dunha hora a 4°C en rotación engadíronse 50µl de *beads* lavadas con tampón IP. Deixouse durante toda a noite a 4°C en rotación. As *beads* foron recuperadas despois de 5-

7 lavados con tampón IP para eliminar os restos das proteínas non unidas o anticorpo. Para recuperar os complexos proteicos engadiuse 30µl de tampón de carga (5x, 10% SDS, 200mM Tris-Base pH 6,8, 50% glicerol, 0,1% azul bromofenol, β-mercaptoetanol) quentando a mostra a 37°C durante 30 minutos e posteriormente 10 minutos a 95°C. O tampón de carga coas proteínas gárdase a -80°C.

3.4- Western Blot

Para a realización do Western Blot fíxose unha electroforesis *SDS-PAGE* para a separación por peso molecular das proteínas, en xeles de Acrilamida/Bisacrilamida ó 10% en cristais de 1.5mm de grosor co Tampón de Electroforesis (2,5 mM Tris-Base, 19,2 mM Glicina, 0.01% SDS) co sistema MiniProtean III Cell (Bio-Rad, Richmond, CA, USA). O marcador utilizado foi PageRuler™ Prestained Protein Ladder de Fermentas. Cargáronse 10µl do extracto total celular con tampón de carga (1x), do control negativo e da CoIP. O xel correuse durante hora e media a 80V. Usouse a membrana de transferencia de PVDF de 7x8cm² (Millipore CO, Bedford, MA, USA) previamente activada en metanol 5 minutos e 5 minutos en auga, dúas veces. Equilibrouse en 10% de metanol (VWR Prolabo BDH), 1x de tampón de transferencia (Tris-Base, Glicina, SDS) e auga. O xel tamén se equilibra ca membrana e as esponxas 15 minutos a 4°C. A transferencia fíxose en *Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell* (Bio-Rad) durante 1 hora a 20V. Verificouse a transferencia tinguido con Ponceau (Sigma), elimináronse os restos con tampón de lavado (2mM Tris-Base, 150mM NaCl, 0,05% Tween, pH 7.5). Bloqueouse unha hora con leite ó 5% para evitar posibles unións inespecíficas. Incubouse co anticorpo primario antiCx43, 1:500, (SantaCruz Biotechnology) 18 horas en axitación orbital a 4°C. O anticorpo secundario policlonal de coello anti-cabra-HPR (Dako) está conxugado con peroxidasa, emprégase a unha concentración 1:2000 durante 1 hora a temperatura ambiente en axitación orbital. Para revelar a

membrana empregouse o *kit* ECL de quimioluminiscencia (Western Blotting Detection Reagent, GeHealthcare), permite a detección de antíxenos empregando anticorpos conxugados con peroxidasa o engadir luminol como sustrato; e a cámara Las3000 (Fujifilm, Tokio, Xapón).

3.5- Tinguadura do xel con coomassie Brilliant Blue G-250 e extracción de péptidos

Unha vez comprobado co Western Blot a presenza da conexina 43. fíxose outro xel coas mesmas condicións cargando nel 40µl do control negativo e da CoIP. Deixouse correr 30 minutos a 60V. Tinguíuse con Coomassie Brilliant Blue G-250 0,1% en metanol ó 50% durante 15 minutos, logo fíxose en 45% de metanol e 10% de ácido acético glacial (Panreac PRS) dúas veces 15 minutos e deixouse en auga destilada ata a súa total destinguadura. O xel escaneouse con *ImageScanner* (GeHealthcare). Cada carril foi cortado en 3-4 bandas, e estas en varios anacos. As bandas tratáronse con metanol ó 50% durante 15 minutos a 37°C, tres veces, laváronse con auga HPLC (Lab-Scan Analytical Sciences, Poland), engadiuse acetonitrilo HPLC (ACN) (Fluka Analytical, Sigma) para deshidratar, repetindo ata a total liberación do colorante. Redúcense con 10mM de DL-ditiotreitól (DTT) en bicarbonato amónico 25mM (AmBi) (Sigma) e alquíbase con 54mM iodoacetamida (IAA) (Sigma). Una vez están as pontes disulfuro rotas polo DTT e a oxidación bloqueada co IAA, deixouse en tripsina (6,67µg/ml, Roche) tres horas e logo en Ambi 25mM 15 horas a 37°C. Vortearonse unha hora, sonicáronse 30 minutos e recolleuse o extracto a un eppendor novo, logo fíxose 3 extracción peptídicas con 50% ACN e 0,1% trifouroacético, TFA, (Fluka Analytical, Sigma). Os péptidos extraídos xuntáronse co primeiro extracto e evaporáronse na centrífuga de baleiro *Savant SPD121P SpeedVac Concentrator* (Thermo Fisher Scientific Inc), gardáronse a -20°C.

3.6-Purificación dos péptidos mediante columnas *Stage Tips C₁₈*

Os péptidos evaporados reconstituíronse en 100µl de TFA 0.5%, vorteáronse, sonicáronse e douselles un pulso, antes de pasar polas columnas. Antes do paso da mostra as columnas deben acondicionarse. Primeiramente engadíronse a cada columna 50µl de metanol para activalas, centrifugouse a 2000 rpm durante 2 minutos. Do mesmo xeito, centrifugando a 2000 rpm 2 minutos, pasáronse 100µl do tampón B (80% AcN e 0.5%TFA) unha vez e dúas veces o tampón A (0.5% TFA). Xa acondicionadas pasáronse as mostras, igualmente por centrifugación. As mostras foron lavadas con 100µl do tampón A tres veces e eluídas con 100µl de tampón B dúas veces. O eluído da mostra non se pasou polas columnas mediante centrifugación senón por presión cunha xiriga. Os péptidos eluídos evapóranse na centrífuga de baleiro *Savant SPD121P SpeedVac Concentrator* (Thermo Fisher Scientific Inc), gardáronse a -20°C.

3.7-Cromatografía líquida acoplada á espectrometría de masas (NanoLC-MS/MS)

As mostras secas e gardadas a -20°C reconstituíronse en 7µl de fase móbil A (0,1% TFA e 2% ACN) vorteáronse, sonicáronse e douselles un pulso. Pasáronse a viales con puntas de pipeta *Gel Loader*. Os viales colocáronse na placa de mostras do Tempo™ Nano-LC (Applied Biosystems) e inxectáronse 5µl a un fluxo de 15µl nunha precolumna C₁₈ (Michrom, 0,5x0,2 mm) na cal se produxo a concentración e o desalado péptidos durante 15 minutos. Os péptidos desalados cargáronse nunha nanocolumna (Intergrafit C₁₈, Proteopep™ II, 75µm id, 15cm, 5µm, 300Å, New Objective, USA) onde tivo lugar a separación dos mesmos a un fluxo constante de 350nl/min. O gradiente empregado para a separación dos péptidos comezou cun 95% de solución A (0,1% TFA e 5% ACN) e un 5% de solución B (0,1%TFA e 80% ACN) ata un 50% de solución B durante 27 minutos como se mostra na táboa III. Os péptidos eluíron da columna

mesturándose ca matriz α -ciano-4-hidroxi-trans-cinámico (3mg/ml (Sigma), 70% ACN, 0,1% TFA) e plaqueáronse sobre unha placa Maldi cada 15 segundos mediante un sistema de fraccionamento chamado *Sun Collet MALDI Spotter/Micro-Fraction Collector* (*SunChrom Wissenschaftliche Geräte GmbH, Germany*).

Tempo (minutos)	% Solución A	% Solución B
0	95	5
3	95	5
30	50	50
32	20	80
34	20	80
38	95	5
50	95	5

Táboa III: Gradiente empregado na cromatografía líquida

3.8-Espectrometría de masas (MALDI TOF-TOF)

O cromatograma do TempoTM Nano-LC (Applied Biosystems) que contén os péptidos separados na placa Maldi, analizáronse no espectrómetro de masas MALDI TOF-TOF 4800 Analyzer (Applied Biosystems, Fraeningham, MA, USA) en función da relación masa/carga (m/z) obtendo os correspondentes espectros de “pegada peptídica”. Os mellores péptidos adquiridos durante a análise de masas foron fragmentados, obtendo deste xeito os espectros de fragmentación de masas/masas (MS/MS) (MALDI TOF-TOF) que son as que se empregaron para a identificación mediante programas informáticos.

3.9-Identificación das proteínas

Os espectros de fragmentación analizáronse co programa informático *ProteinPilot* 3.0 (Applied Biosystems). Este programa identifica as

proteínas utilizando o algoritmo de búsqueda Paragon para comparar a secuencia de aminoácidos dos péptidos obtida experimentalmente ca secuencia teórica de tódolos péptidos na base de datos *Uniprot-SwissProt*. Os parámetros empregados na búsqueda foron: tripsina como enzima de dixestión e IAA como axente alquilante dos residuos de cisteína. Ademais, na lista final de proteínas soamente foron incluídas aquelas que tiveron polo menos dous péptidos distintos identificados cun 95% de confianza e un *ProtScore* maior ou igual a 1,3.

3.10- Estudos histolóxicos

A realización das distintas técnicas histolóxicas, de seguido redactadas, foron realizadas polos Servizos Centrais de Histomorfloxía do INIBIC.

A imaxes foron observadas co microscopio Olympus BX61, as fotografías foron quitadas ca cámara dixital DP71 (Olympus), e co *software* DP Controller e DP Manager. A cuantificación da positividade nas técnicas inmunohistoquímicas realizouse co programa AnalySIS^D 5.0 (Olympus Biosystems Hamburg, Germany).

3.10.1- Tecido

3.10.1.1-Procesamento da cartilaxe

Inmediatamente trala ciruxía a cartilaxe tallouse, orentouse, fixouse e conxelouse no medio criosolidificable *TissueTek®O.C.TTM* (Sakura Finetek, Holanda) en criomoldes de plástico *TissueTek* mediante a súa inmersión en isopentano (Merk) previamente levado a seu punto de conxelación (-50°C) enfriado en nitróxeno líquido (-180°C). As mostras foron talladas no criostato e colocadas en portaobxetos onde se fixaron por deshidratación celular en acetona a 4°C 10 minutos, deixáronse secar uns minutos a temperatura ambiente. Sobre estas mostras realizáronse dúas técnicas histolóxicas: Safranina O-Fast Green, Hematoxilina-Eosina, e inmunohistoquímica utilizando diferentes anticorpos con contratinción de

Hematoxilina de Gills (Merk). Os anticorpos utilizados son: anti-coláxeno tipo II, anti-Cx43, anti-Cx45, anti-Cx32, anti-Cx46 e anti-PCNA.

3.10.1.2-Hemotoxilina-Eosina

Os portaobxectos cas mostras xa fixadas e secas sumerxéronse en Hematoxilina de Harris (Merck) durante 5 minutos. Fíxose o viraxe con auga do grifo ata que o colorante se volvese azul ou azulón. Sumérxese, de novo, cinco minutos en eosina. Deshidratouse con varios pases en alcol etílico de 96° (Valenalcol S.L.), logo outros pases en etanol absoluto (Panreac Química SAU) ata a total deshidratación das mostras. Tras isto as mostras aclaráronse en xilol (Panreac Química SU). Por último montáronse en DePex (BDH GUN®), medio de montaxe permanente.

3.10.1.3-Safranina O Fast Green

Os portaobxectos cas mostras xa fixadas e secas, foron tinguidos con Safranina O (Safranina O en alcol etílico de 50°C) durante 30 minutos, laváronse con auga destilada nun único pase. Tinguíronse con verde luz (verde luz, auga destilada, ácido acético glacial e auga acética) en catro pases. Deshidratouse en alcol etílico de 100°, aclaráronse con xilol (Panreac Química SU) e montáronse con DePex (BDH GUN®), medio de montaxe permanente.

3.10.1.4-Inmunohistoquímica

Os portaobxectos cas mostras xa fixadas e secas laváronse con PBS (MP) durante 10 minutos. Rodeáronse con lápiz de aceite (Dako), volvéronse lavar con PBS (MP). Inhibiuse a peroxidas endóxena durante 10 minutos con *Peroxidase Blocking Solution* (Dako). Lavouse con PBS (MP). Incubouse unha hora co anticorpo primario: anti-coláxeno II 1:200 (ratón anti-human coláxeno II, Chemicon), anti-Cx43 1:50 (ratón anti-Cx43, BD Biosciences), anti-Cx32 1:50 (ratón monoclonal Cx32, Abcam), anti-Cx45 1:1000 (ratón anti-human cx45, Millipore (Upstate, Chemicon, Lincon), anti-Cx46 1:100 (ratón anti-human monoclonal Cx46, SantaCruz

Biothecnology) e PCNA 1:100 (ratón anti-PCNA, Calbiochem). As dilucións do anticorpo prepáronse con tampón 0,05mol/L Tris-HCl pH 7,6. O anticorpo primario lavouse tres veces, durante 10 minutos cada vez, con PBS (MP). Incubouse co anticorpo *secundario Polymered Envision plus policlona kit Envisión™ Detection Systems Peroxidase/DAB, Rabbit/Mousse (Labelled polymer-HPRT)*. O anticorpo secundario lavouse tres veces, 10 minutos, en PBS (MP). Incubouse co cromóforo DAB [(cromóxeno máis sustrato) sendo a solución do tampón sustrato a pH 7,5 (contén peróxido de hidróxeno) máis diaminobencidina (3,3-*diaminobenzidine chromogen solution*) na proporción (1:50)]. A DAB decantouse e a reacción frenouse con auga destilada mantendo baixo o microscopio óptico ou espéranse 2-5 minutos. Contratinguíuse con Hematoxilina de Gill-III (Merk). Fixéronse pases en concentracións de alcol etílico crecentes (70°, 96°, 100°) para a deshidración das mostras. Aclaráronse en xilol (Panreac Química SU) e montáronse con DePex (BDH GUN®), medio de montaxe permanente.

3.10.2-Condrocitos en cultivo

3.10.2.1-Procesamento dos condrocitos

As células crecidas en frascos de 25cm² son tripsinidas e pegadas en *Chambers Sliders* (Millipore) de oito pocillos, deixáronse en DMEM 5%SEB 5 horas. En cada pocillo mántense unha condición diferente. Tras, polo menos, 18 horas dependendo do experimento, as células foron fixadas por deshidratación celular con 200µl de acetona durante 10 minutos a 4°C, retírase e secaron a temperatura ambiente. Gardáronse a -20°C envoltas en papel de aluminio ata a realización da técnica. Sobre as *Chambers Slider* realizouse unha tinción inmunohistoquímica con contratinción de Hematoxilina de Gills para a detección de Cx43.

3.10.2.2-Inmunohistoquímica

Os mostras gardadas a -20°C deixáronse desconxelar uns 30 minutos. As *Chambers Sliders* foron desmontadas antes do comezo da técnica.

Laváronse con PBS (MP) durante 10 minutos. Rodeáronse con lápiz de aceite (Dako), volvéronse lavar con PBS (MP). Inhibiuse a peroxidas endóxena durante 10 minutos con *Peroxidase Blocking Solution* (Dako). Lavóuse con PBS (MP). Incubouse unha hora co anticorpo primario: anti-Cx43 1:50 (ratón anti-Cx43, BD Biosciences),. A dilución do anticorpo preparouse con tampón 0,05mol/L Tris-HCl pH 7,6. O anticorpo primario lavouse tres veces, durante 10 minutos cada vez, con PBS (MP). Incubouse co anticorpo *secundario Polymered Envision plus policlonal kit Envisión™ Detection Systems Peroxidase/DAB, Rabbit/Mouse (Labelled polymer-HPRT)*. O anticorpo secundario lavouse tres veces, 10 minutos, en PBS (MP). Incubouse co cromóforo DAB [(cromóxeno máis sustrato) sendo a solución do tampón sustrato a pH 7,5 (contén peróxido de hidróxeno) máis diaminobencidina (*3,3-diaminobenzidine chromogen solution*) na proporción (1:50)]. A DAB decantouse e a reacción frenouse con auga destilada. Contratinguíuse con Hematoxilina de Gill-III (Merk). Fixéronse pases en concentracións de alcol etílico crecentes (70°, 96°, 100°) para a deshidración das mostras. Aclaráronse en xilol (Panreac Química SU) e montáronse con DePex (BDH GUN®)

4-RESULTADOS

4.1-Expresión de conexinas en condrocitos en cultivo

Segundo o tipo de conexinas que se expresan en tecidos similares á cartilaxe, decidimos investigar o patrón de expresión de diferentes conexinas (Táboa II) en cartilaxes de doadores sans. A expresión de conexinas en condrocitos primarios en cultivo de cartilaxe articular humana de cadeira e xeonllo medida mediante qPCR (Figura 6) indica que a Cx43 exprésase a altos niveis. A Cx45 tamén se expresa, aínda que a niveis moito menores. No caso da Cx26 os seus valores de expresión son desprezables. Dado que a Cx45 mostra valores para ARN mesaxeiro (ARNm) e ARN primario (ARNp) nuns niveis baixos pero detectables realizouse unha inmunohistoquímica para a Cx45 e ver así si existía proteína nos condrocitos (Figura 6). Utilizando un anticorpo específico para a Cx45, non se detectou positividade. Polo tanto concluímos que nos condrocitos primarios en cultivo de cartilaxe articular humana de cadeira e xeonllo solo se expresa a Cx43.

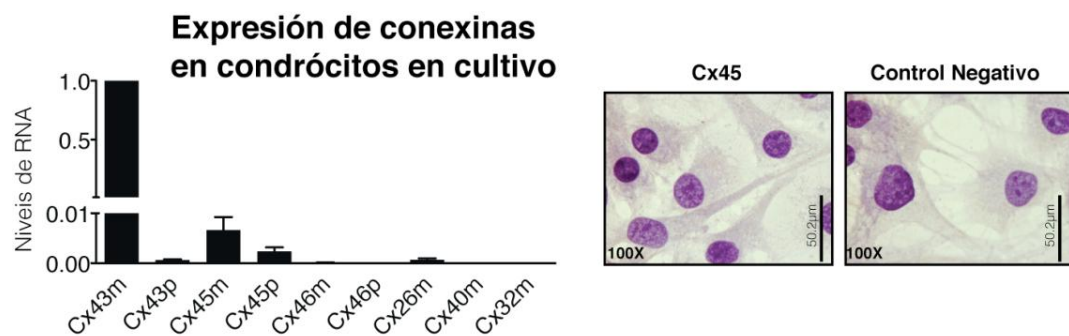


Figura 6. Expresión de diferentes conexinas en condrocitos primarios en cultivo de cartilaxe articular humano de cadeira e xeollo. A imaxe correspondente os resultados obtidos na inmunohistoquímica utilizando anti-Cx45. O control negativo móstrase a dereita.

4.2-Localización da Cx43 en condrocitos en cultivo

Tras saber que os condrocitos en cultivo expresan Cx43 o seguinte paso é ver a localización desta proteína. Para isto fixéronse técnicas inmunohistoquímicas para detectar a Cx43 en condrocitos en cultivo (Figura 7). A Cx43 localízase na membrana plásmatica, o que é de esperar xa que é unha proteína transmembrana, tanto cando a célula está rodeada de medio de cultivo como cando limita con outra célula, polo que podería estar formando GJ entre ámbalas, neste caso vense claramente puntos marróns de positividade da técnica (frecha azul e gris). A Cx43 está presente no citoplasma, de xeito esvaído, o que podería indicar que se está a ensamblar ou viaxando en vesículas hacía a membrana. As conexas durante a súa síntese pasan polo retículo endoplasmático e o aparello de Golgi, a través destes orgánulos as conexas vense ensamblando ata formar os conexóns que son liberados na membrana en vesículas transportadas por filamentos de actina e microtúbulos ^[13]. Ademais de todas estas localizacións celulares (membrana plasmática, citoplasma) a Cx43 atópase nas proxeccións citoplasmáticas que se establecen entre as células. A presenza da Cx43 nas proxeccións suxire que a comunicación, a GJ, estase a formar en calquer punto da membrana plásmatica da célula incluída as proxeccións (frechas vermellas).

Para cerciorarnos de que os condrocitos manteñan o seu fenotipo en cultivo fíxose una inmunohistoquímica para detectar coláxeno tipo II (Figura 8).

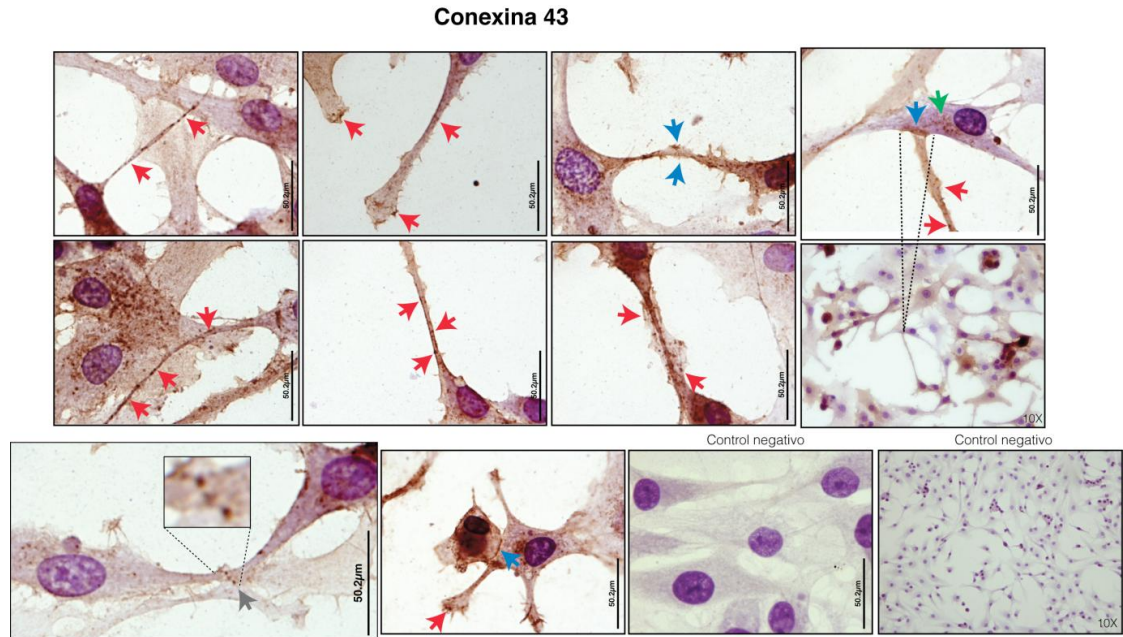


Figura 7. Inmunohistoquímica anti-Cx43 en condrocitos en cultivo.

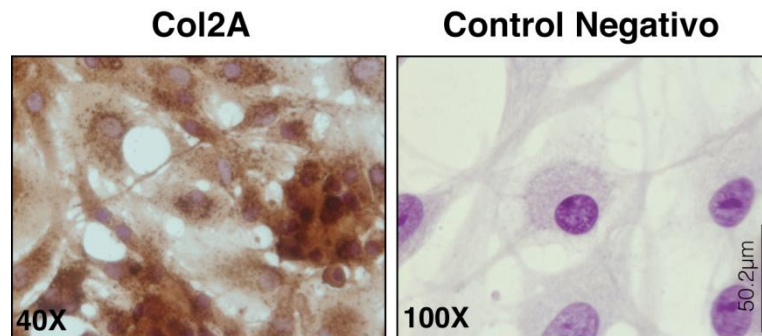


Figura 8. Inmunohistoquímica para estudar a expresión de coláxeno tipo II o que demostra que os condrocitos manteñan o seu fenotipo en cultivo.

4.3-Localización da Cx43 en tecido

Evaluada a expresión e localización da Cx43 en condrocitos primarios en cultivo de cartilaxe articular humano de xeonllo e cadeira, cómpre agora ver si en tecido acontece o mesmo. Para isto realizouse a mesma técnica inmunohistoquímica (Figura 9). No tecido vese como a Cx43 localízase no borde das lagoas, o que comunicaría a célula ca matriz extracelular. Na matriz detéctanse puntos positivos para a Cx43, sen verse implicada

ningunha lagoa. Isto apoia a hipótese de que a comunicación entre os condrocitos suceda o longo das proxeccións citoplasmáticas que forman entre eles. Os puntos positivos para a Cx43 no medio da matriz corresponderíanse a puntos de comunicación, GJ, entre as células, que se formarían na proxección.

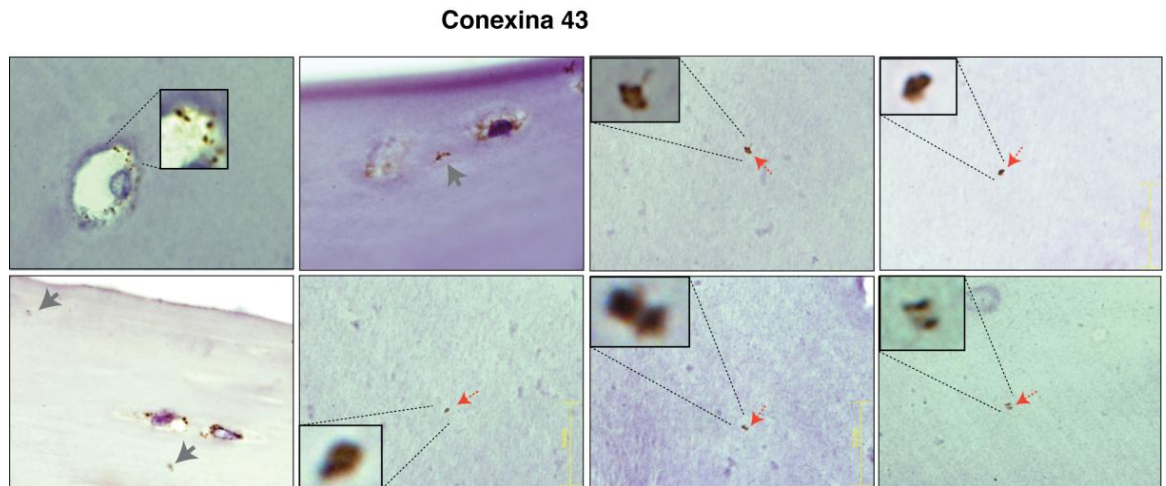


Figura 9. Inmunohistoquímica anti-Cx43 en tecido.

4.4-Localización das conexas 32, 46 e 45

Mediante ensaios de expresión xénica utilizando tecido vimos que os condrocitos en tecido expresan máis dun tipo de conexina, polo tanto as técnicas inmunohistoquímicas en tecido ampliáronse as conexas: 32, 45, 46 (Figura 10).

En tecidos de cartilaxe articular san vese a presenza de Cx32 e Cx46 nas lagoas (Figura 10A), mentres que en condrocitos en cultivo as Cx32 e Cx46 non se expresaban (Figura 6). A mesma técnica empleouse en tecidos OA en diferentes grados da enfermidade (Figura 10B). Ó comparar os tecidos sans cos tecidos OA apréciase un aumento da proteína en algún dos pacientes estudados, mentres que noutros non se detectou positividade. Non se atopou un patrón específico que caracterice as mostras de pacientes con OA.

No caso da Cx45 tamén detéctase a proteína en tecido mentres que en condrocitos en cultivo non (Figura 6). Ó igual que para a Cx32 e Cx46, a proteína está alterada tecidos OA (Figura 10C), pero a diferenza de elas na Cx45 pódese establecer un patrón da distribución nas diferentes zonas que compoñen a cartilaxe (Figura 10D). En tecido a diferenza na cantidade da Cx45 entre cartilaxes sans e OA é estadísticamente diferente, sendo a diferenza menos apreciable nas capas máis profundas. No caso dos tecidos OA a diferenza entre a zona superficial e a intermedia respecto a profunda é moito maior. A presenza da Cx45 na zona superficial-intermedia e moito máis patente que nas zonas mais profundas.

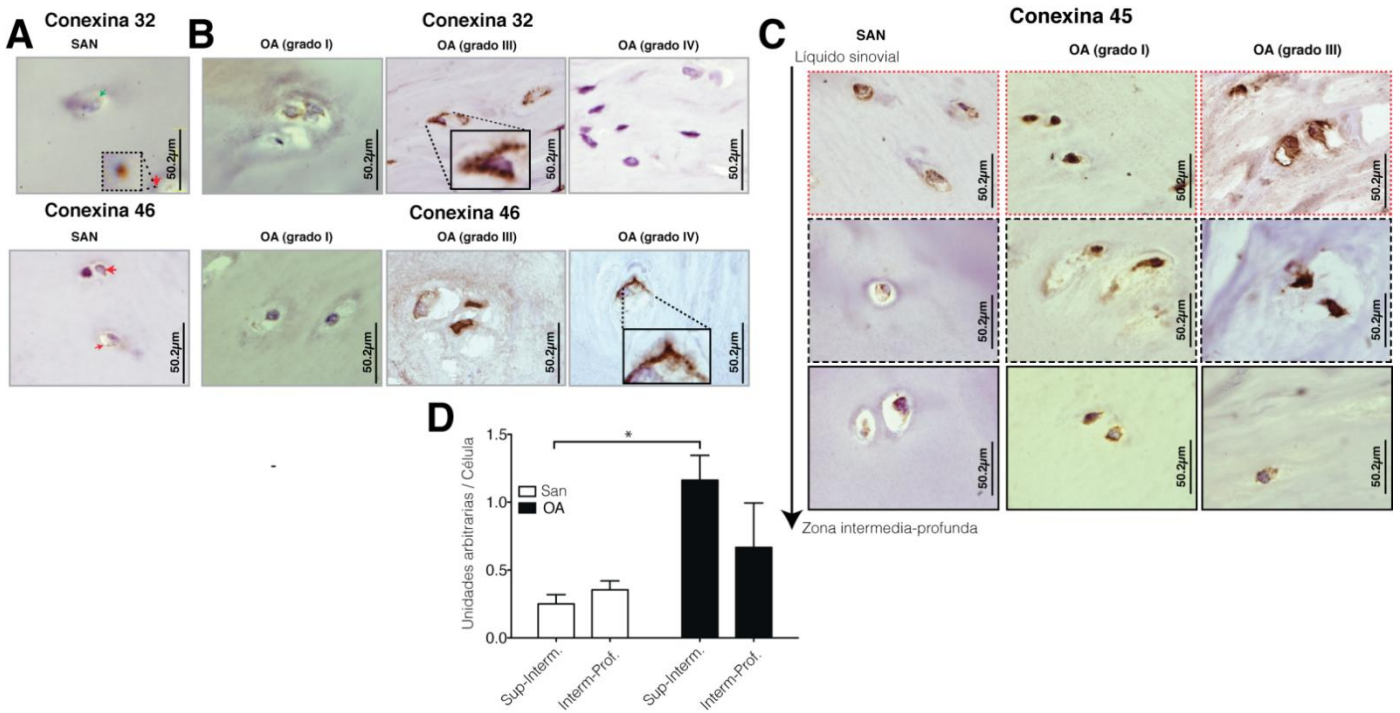


Figura 10. Inmunohistoquímicas para as conexas 32 e 46 en tecidos sans (A) e OA (B). (C) Inmunohistoquímicas para a Cx45 na cartilaxe en tecidos sans e OA. (D) Cuantificación de sinais positivas para a Cx45 detectada nas diferentes capas da cartilaxe. Media±desviación típica n=3 sanos y n=10 artrósicos. Test de Kruskal-Wallis con test de Comparación Múltiple de Dunn.

4.5-Localización da Cx43 en tecidos sans e artrósicos

Igual que cas mostras seleccionadas para o estudo da presenza da Cx32, Cx46 e Cx45, antes de estudar a localización da Cx43 en cartilaxe de pacientes con OA, realizouse unha tinción de Safranina O Fast Green, en todos os tecidos utilizados. Na figura 11 representanse tres tecidos de diferente grao de OA (Figura 11C). Os tecidos foron agrupados en diferentes grados segundo a puntuación de Mankin.

Despois de estudar a expresión xénica da Cx43 en tecidos sans e OA (Figura 11A e B), analizouse a presenza da Cx43 nas diferentes capas da cartilaxe e nos diferentes graos da enfermidade (Figura 11D). As imaxes foron cuantificadas e segundo os datos que se ven no gráfico (Figura 11D) en OA a presenza da Cx43 é moito maior que en cartilaxes sans. En tecidos sans a diferenza entre a capa superficial e a intermedia é case desprezable pero no caso dos tecidos OA a capa superficial-intermedia, donde se detecta maior dano incluso en tecidos de grao I e II, ten moita maior cantidade de Cx43 que nas zonas profundas. Ademais na inmunohistoquímica tamén se ve que nos tecidos de pacientes con OA, algúns condrocitos conteñen sinais positivas da Cx43 no do núcleo celular (Figura 11D).

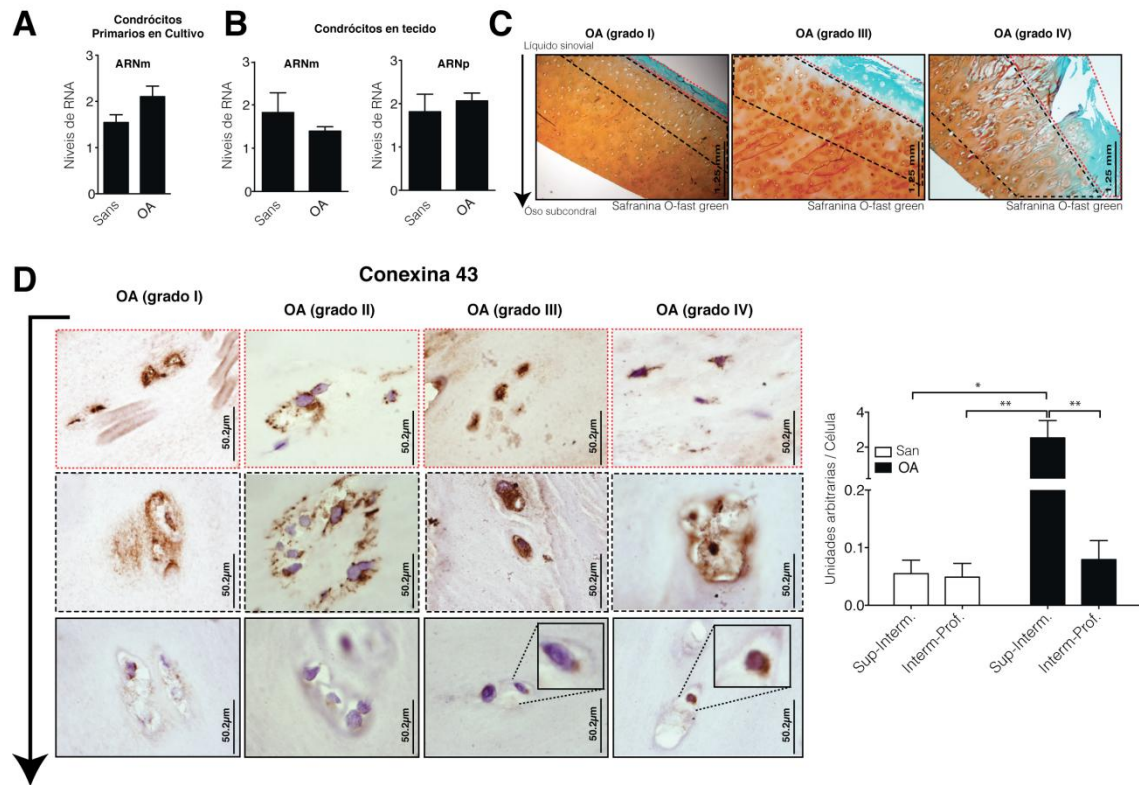


Figura 11. (A) Expresión xénica de Cx43 en condrocitos primarios en cultivo. (B) Expresión xénica de Cx43 en condrocitos en tecido. (C) Tinción Safranina A Fast Green para tres tecidos con diferente grao de OA. (D) Distribución da Cx43 nas diferentes capas da cartilaxe en catro tecidos de grao crecente da enfermidade coa correspondente gráfica da cuantificación da Cx43. Media±desviación típica n=4. Test Kruskal-Wallis y test de Comparación Múltiple de Dunn.

4.6-Proteínas unidas ó dominio C-terminal da Cx43

A Cx43 interactúa con varias proteínas a través do seu dominio C-terminal. Cambios na Cx43 afectan a activación de múltiples rutas de sinalización celular a través da interacción de proteínas con dominio C-terminal da Cx43. Para poder caracterizar que proteínas interaccionan co dominio C-terminal da Cx43 en condrocitos articulares, levamos a cabo unha técnica de inmunoprecipitación das proteínas que interaccionan ca Cx43 e posteriormente identificámolas mediante espectrometría de masas. De entre esta lista de proteínas, destacan as proteínas de

citoesqueleto (Táboa IV). Sábese que a Cx43 incluída en vesículas interacciona directamente cas proteínas do citoesqueleto que son os encargados de transportar as vesículas que conteñen os conexóns ata o punto da membrana plásmatica onde se liberan ^[13]. Os resultados mostrados na táboa IV suxiren que os microtúbulos de tubulina e os filamentos de actina poderían ser os elementos do citoesqueleto encargados do movemento dos conexóns no citoplasma e do transporte a membrana plasmática. Os resultados obtidos servíronnos como control da co-impnuprecipitación e como demostración que en condrocitos articulares, o igual que ocorre en outros tipos celulares, os conexóns tamén poderían viaxar a través de estos compoñentes do citoesqueleto. Nas táboas V-XIV móstranse as diferentes proteínas identificadas según a súa función ou localización celular.

Nome da proteína	ID	Punt.	NºPep.	% Cov	Nome da proteína	ID	Punt.	NºPep.	% Cov
Microtúbulos					Filamentos de actina y proteínas relacionadas				
Tubulin alpha-1A chain	Q71U36	22	12	41,2	Actin, cytoplasmatic-1	P60709	32	17	57,3
Tubulin alpha-1B chain	P68363	12	7	22,6	Actin, cytoplasmatic-2	P63261	32	16	57,3
Tubulin alpha-1C chain	Q9BQE3	23	13	41,4	Alpha - actinin-1	P12814	11	6	22,4
Tubulin beta 2A chain					Alpha - actinin-3	Q08043	2	1	2,2
Tubulin beta 2B chain	Q9BVA1	20	14	28,1	Alpha - actinin-4	O43707	13	7	16,7
Tubulin beta 2C chain	P68371	7,7	5	26,1	Actin, alpha skeletal muscle	P68133	4	2	8,8
Tubulin beta chain	P07437	22	15	40,8	Actin-releated protein 3B	Q9P1U1	2	1	9,6
Filamentos intermedios					Caldesmon	Q05682	3	2	10,1
Plectin	Q15149	2	5,9	1	Gelsolin	P06396	2	1	4,9
Vimentin	P08670	82	47	81,6	Profilin-1	P07737	2	1	10
Otros					Tropomyosin alpha 4-chain	P67936	7,5	4	20,2
Cytoskeleton-associated protein 4	Q07065	8	4	18,8	Tropomyosin beta chain	P07951	2	1	18
Filamin	P21333	66	29	25,7	Vinculin	P18206	6	3	16,4
Moesin	P26038	10	5	13,9					
Myosin-Ib	O43795	2	1	4,2					
Myosin-9	P35579	14	7	9,8					
Radixin	P35241	4	2	11					

Táboa IV. Proteínas de citoesqueleto

Nome da proteína	ID	Puntuación	NºPept.	% Cov
Transcripción e replicación de ADN				
Cullin-associated NEDD8-dissociated protein 1	Q86VP6	2	1	2,1
Elongation factor 1-gamma	P26641	4,04	3	16,3
Elongation factor 2	P13639	18,81	10	20,8
DNA replication licensing factor MCM8	Q9UJA3	1,52	1	7,7
Importin subunit beta-1	Q14974	2	1	3,7
Polymerase I and transcript release factor	Q6NZI2	6	3	7,7
Putative elongation factor 1-alpha like 3	Q5VTE0	5,44	3	13,6
Signal transducer and activator of transcription 1-alpha/beta	P42224	4,12	2	13,6
Splicing factor, proline-and glutamine-rich	P23246	4	2	8,1
Transcriptor factor HIVEP3	Q5T1R4	1.32	1	5.3

Táboa V. Proteínas implicadas na transcripción e na replicación do ADN

Nome da proteína	ID	Puntuación	NºPept.	% Cov
Histones				
Histone H1.1	Q02539	2	1	7
Histone H1t	P22492	2	1	12,1
Histone H1.2	P16403	2,02	1	18,8
Histone H2A tipe 1-C	Q93077	10	5	62,3
Histone H2A type 2-A	Q6FI13	10	5	70,8
Histone H2A.J	Q9BTM1	10,05	5	67,4
Histone H2A.x	P16104	10	5	53,1
Histone H2B type 1-M	Q99879	11,46	6	51,6
Histone H2B type 2-F	Q5QNW6	10,26	4	69,1
Histone H2B type 1-L	Q99880	8	5	42,9
Histone H3.1t	Q16695	2,69	3	31,6
Histone H3.2	Q71DI3	2,39	2	25,7
Histone H3,3	P84243	2,01	2	32,4
Histone H4	P62805	16	10	57,3

Táboa VI. Proteínas implicadas no empacamento do ADN

Nome da proteína	ID	Puntuación	NºPept.	% Cov
Proteínas Ribosomales 40S				
40S Ribosomal protein S3a	P61247	2,28	1	15,8
40S Ribosomal protein S4, X isoform	P62701	6	3	17,1
40S Ribosomal protein S4, Y isoform 2	Q8TD47	2	1	9,1
40S Ribosomal protein S5	P46782	2	1	13,7
40S Ribosomal protein S6	P62753	2	1	9,2
40S Ribosomal protein S8	P62241	6	3	28,9
40S Ribosomal protein S7	P62081	4,05	3	27,3
40S Ribosomal protein S9	P46781	8	5	24,7
40S Ribosomal protein S11	P62280	2	1	11,4
40S Ribosomal protein S16	P62249	8	4	32,9
40S Ribosomal protein S18	P62269	4	2	15,8
40S Ribosomal protein S19	P39019	2	1	6,2
40S Ribosomal protein S24	P62847	2	1	18,1
40S Ribosomal protein S26	P62854	2	1	30,4
40S Ribosomal protein SA	P08865	2,06	1	10,5

Táboa VII. Proteínas ribosomales 40S

Nome da proteína	ID	Punt.	NºPep.	%	Nome da proteína	ID	Punt.	NºPep.	%
Proteínas Ribosomales 60S					Proteínas Ribosomales 60S				
60S Ribosomal protein L3	P39023	2	1	10	60S Ribosomal protein L35	P42766	2	1	32
60S Ribosomal protein L4	P36578	4,29	3	14	60S Ribosomal protein L35a	P18077	2	1	7,3
60S Ribosomal protein L6	Q02878	9,54	5	27	60S Ribosomal protein L36	Q9Y3U8	4	2	11
60S Ribosomal protein L7	P18124	4,36	3	21	60S acidic ribosomal protein P2	P05387	2	1	17
60S Ribosomal protein L7a	P62424	4	2	14	60S Ribosomal protein L12	P30050	2	1	26
60S Ribosomal protein L10a	P62906	2	2	7,4	60S Ribosomal protein L13	P26373	2,2	1	24
60S Ribosomal protein L10-like	Q96L21	4	2	13	60S Ribosomal protein L14	P50914	2	1	13
60S Ribosomal protein L11	P62913	2	1	15	60S Ribosomal protein L15	P61313	3,66	2	21
60S Ribosomal protein L12	P30050	2	1	26	60S Ribosomal protein L17	P18621	2	1	10
60S Ribosomal protein L13	P26373	2,2	1	24	60S Ribosomal protein L21	P46778	2	1	9,4
60S Ribosomal protein L14	P50914	2	1	13	60S Ribosomal protein L23a	P62750	2	1	17
60S Ribosomal protein L15	P61313	3,66	2	21	60S Ribosomal protein L24	P83731	3,52	2	26
60S Ribosomal protein L17	P18621	2	1	10	60S Ribosomal protein L26	P61254	2	1	14
60S Ribosomal protein L21	P46778	2	1	9,4	60S Ribosomal protein L27a	P46776	2	1	16
60S Ribosomal protein L23a	P62750	2	1	17	60S Ribosomal protein L29	P47914	1,54	1	5
60S Ribosomal protein L24	P83731	3,52	2	26	60S Ribosomal protein L35	P42766	2	1	32
60S Ribosomal protein L26	P61254	2	1	14	60S Ribosomal protein L35a	P18077	2	1	7,3
60S Ribosomal protein L27a	P46776	2	1	16	60S Ribosomal protein L36	Q9Y3U8	4	2	11
60S Ribosomal protein L29	P47914	1,54	1	5	60S acidic ribosomal protein P2	P05387	2	1	17

Táboa VIII. Proteínas ribosomales 60S

Nome da proteína	ID	Puntuación	NºPept.	% ov
Proteínas de choque térmico				
Heat shock cognate 71KDa protein	P11142	9,9	5	21,7
Heat shock protein beta-1	P04792	6,01	3	24,4
Heat shock protein 90-beta	P08238	10,32	5	15,5
Heat shock protein HSP 90-alpha	P07900	2,95	2	3,6
Heat shock-related 70KDa protein 2	P54652	2,35	1	8,6

Táboa IX. Proteínas de choque térmico

Nome da proteína	ID	Puntuación	NºPept.	% ov
Ribonucleoproteínas heteroxéneas				
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1	P09651	2	1	7
Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1	P22626	3,47	2	21,5
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3	P51991	2	1	10,1
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein G	P38159	2	1	11,5
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	P61978	2,02	1	17,9
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U	Q00839	4,01	2	11,8

Táboa X. Ribonucleoproteínas heteroxénea

Nome da proteína	ID	Puntuación	NºPept.	% ov
Anexinas				
Annexin A1	P04083	8	4	13,9
Annexin A2	P07355	46,07	25	54,3
Annexin A5	P08758	3,34	2	9,7

Táboa XI. Anexinas

Nome da proteína	ID	Puntuación	NºPept.	% ov
Enzimas do metabolismo da glicosa				
78kDa glucose-regulated protein	P11021	17,67	8	23,2
D-3-phosphoglycerate dehydrogenase	O43175	2,02	1	10,5
Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase subunit 1	P04843	4	2	5,1
Fructose-biphosphate aldolase A	P04075	2,03	1	8,8
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	P04406	6,87	3	28,1
Glycogen phosphorylase, brain form	P11216	2	1	10,7
Glutathione S-transferase P	P09211	6	3	22,4
L-lactate dehydrogenase A chain	P00338	2	1	8,1
Peroxiredoxin 1	Q06830	8	4	33,7
Phosphoglycerate kinase 1	P00558	4	2	12,7
Pyruvate kinase isozymes M1/M2	P14618	11,78	7	25,6

Táboa XII. Enzimas implicadas no metabolismo da glicosa

Nome da proteína	ID	Puntuación	NºPept.	% ov
Proteínas mitocondriales				
ATP-synthase subunit f mitochondrial	P56134	2	1	13,8
Stress-70 protein. Mitochondrial	P38646	2	1	5,7
Superoxide dismutase (Mn), mitochondrial	P04179	2	1	6,3

Táboa XIII. Proteínas mitocondriales

Nome da proteína	ID	Puntuación	NºPept.	% ov
Coláxenos				
Collagen alpha-1 (I) chain	P02452	12,01	6	16,9
Collagen alpha-2(I) chain	P08123	6	3	16,3
Collagen alpha-2(IV) chain	P12109	2,02	1	8,2

Táboa XIV. Coláxenos

Nome da proteína	ID	Puntuación	NºPept.	% ov
Proteínas relacionadas co Retículo Endoplasmático				
Leucine-rich repeat-containing protein 59	Q96AG4	2	1	3,3
Translocon-associated protein subunit delta	P51571	2	1	11
Endoplasmin	P14625	5,41	3	7,1
Serpin H1	P50454	6	3	15,1
Vesicle-trafficking protein SEC22b	O75396	2	1	6,5

Táboa XV. Proteínas relacionadas co retículo endoplasmático

Nome da proteína	ID	Puntuación	NºPept.	% ov
Outras proteínas nucleares				
Alpha-crystallin B chain	P02511	4	4	16,6
Cysteine and glycine-rich protein 1	P21291	2	1	7,8
Gelectin-3	P17931	2	1	12,4
GTP-binding nuclear protein Ran	P62826	4	2	16,7
Histidine triad nucleotide-binding protein 1	P49773	2	1	11,1
Major vault protein	Q14764	2	1	1,7
Nucleolin	P19338	4,86	3	14,9
Nucleophosmin	P06748	2	1	7,1
Nucleoside diphosphate kinase B	P22392	2,87	2	27
Prelamin-A/C	P02545	24,93	13	48
Proteasome subunit beta type-2	P49721	2	1	5,5
Small nuclear ribonucleoprotein Sm D3	P62318	2	1	7,9
Staphylococcal nuclease domain-containing protein 1	Q7KZF4	6,34	4	9,6
Vingilin	Q00341	2	1	3,8
X-ray repair cross-complementing protein 5	P13010	2	1	2,5

Táboa XVI. Outras proteínas nucleares

Nome da proteína	ID	Puntuación	NºPept.	% ov	Nome da proteína	ID	Puntuación	NºPept.	% ov
Outras									
14-3-3 protein seta/delta	P63104	2	1	7,8	Protein S100-A6	P06703	2	1	16,7
Alpha-enolase	P06733	6,01	3	12,7	Protein S100-A10	P60903	2	1	14,4
Beta-enolase	P13929	2	1	9	Protein S100-A11	P31949	2	1	19,1
Coatomer subunit gamma	Q9Y678	2	1	3,2	Protein TSPEAR	Q8WU66	1,47	1	1,6
Dihydropyridinase-related protein 2	Q16555	3,34	2	13,3	Ras-related protein Rap-1A	P62834	2	1	17,4
EH domain-containing protein 2	Q9NZN4	2	1	7,7	Ribonuclease inhibitor	P13489	2	1	8,2
Isoleucyl-tRNA synthetase, cytoplasmic	P41252	2,42	1	4,2	RWD domain-containing protein 4A	Q6NW29	2	1	6,9
Leucine-rich repeat-containing protein 59	Q96AG4	2	1	3,3	Semaphorin-4F	O95754	2	1	5,3
Myosin light polypeptide 6	P60660	2	1	10,6	Talin-1	Q9Y490	8	4	7,4
Myosin regulatory light chain 12A	P19105	4	2	17,5	Taste receptor type 2 member 14	Q9NYV8	1,33	1	2,8
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A	P62937	4,52	2	30,9	Thy-1 membrane glycoprotein	P04216	4	2	9,9
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B	P23284	6	3	20,4	Transforming protein RhoA	P61586	2	1	7,8
Polyubiquitin-C	P0CG48	4	2	49,6	Translocon-associated protein subunit delta	P51571	2	1	11
Protein disulfide-isomerase	P07237	6	3	12,6	Ubiquitin-60S ribosomal protein L40	P62987	5,31	3	33,6
Protein disulfide-isomerase A3	P30101	4,38	2	10,7	Valyl-tRNA synthetase	P26640	4	2	5,7
Protein enabled homolog	Q8N8S7	2	1	2,2					

Táboa XVII. Outras proteínas identificadas

4.7-Cultivo de condrocitos en diferentes concentracións de glicosa

Para o estudo do efecto da glicosa en condrocitos primarios en cultivo de cartilaxe articular, analizáronse 2 pacientes sans (N), 2 artrósicos de cadeira (OAc) e 2 artrósicos de xeonllo (OAx). Na primeira análise a expresión da Cx43 de ARNm, a Cx43 de ARNp, a Cx45, GLUT1 e GADPH, os datos referíronse o valor obtido para DMEM sen glicosa suplementado con 1mM, deste xeito vese como varía a expresión ó aumentar a concentración de glicosa na condición DMEM 15%SEF. Os resultados suxiren que o incremento de glicosa podería afectar a expresión da Cx43 e Cx45 principalmente en condrocitos, especialmente no caso das células que proveñen dos doadores sans analizados. Cambios na expresión de GADPH e GLUT1 foron empregados como control do experimento. Ambos xens deberían aumentar a súa expresión en presenza de altas concentración de glicosa. Os resultados mostran que no caso do transportador de glicosa GLUT1, a súa expresión aumenta na presenza de 25mM de glucosa (Figura 12).

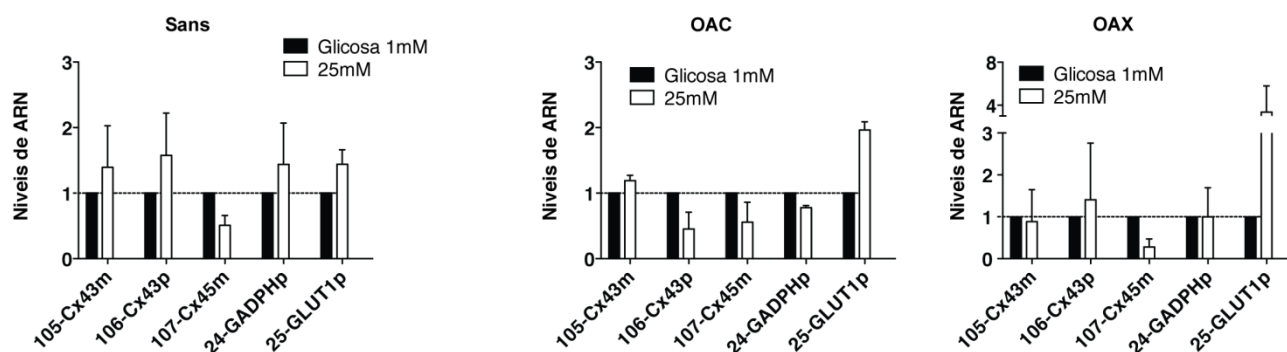


Figura 12. Análise da expresión xénica en condrocitos que proveñen de pacientes OAx e OAc e de doadores sans (N) respecto dos niveis obtidos cando as células foron incubadas en DMEM sen glicosa suplementado con 1mM de glicosa. Meida±desviación típica , n=2.

4.8-Localización da Cx43 en condrocitos en cultivo tratados con IL-1 β , TGF β 3, octanol e AGA

Os resultados de expresión xénica e niveis proteicos obtidos nas figuras 6, 10 e 11, suxiren que os niveis de conexas regúlanse a nivel postranscripcional máis que a nivel de expresión xénica. Por esta razón para ver si variaba a Cx43 segundo a presenza de diferentes drogas e estimulantes realizáronse inmunohistoquímicas para a detección da proteína. Cultiváronse condrocitos en *Chambers Sliders* en DMEM 15%SEF o que se engadiu na concentración correspondente IL-1 β , TGF β 3, octanol (1mM) e ácido-18 β -glicirretínico (AGA, 50 μ M). Deste xeito estudamos o efecto da interleuquina 1 (IL-1 β), o ser un dos principais factores catabólicos implicados na degradación da matriz extracelular que se observa en pacientes con OA. Tamén se estudou o efecto sobre os niveis preteicos da Cx43 en presenza de inhibidores das canles (octanol e AGA) que forman as conexas (*gap junctions*) ou TGF β -3. Ante o efecto da IL-1 β , TGF β -3 e das drogas inhibidoras de canles o nivel de proteína Cx43 aumenta (Figura 13).

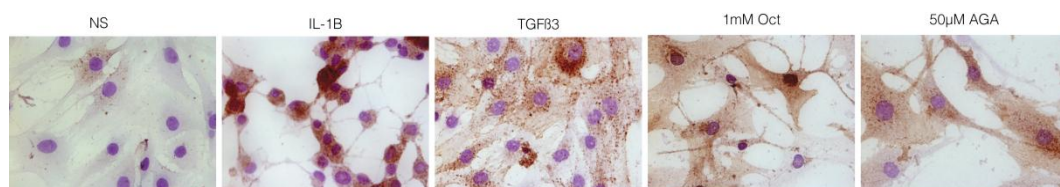


Figura 13. Técnicas Inmunohistoquímicas para a detección de Cx43 en condrocitos en cultivo.

5-DISCUSIÓN

Grazas ós resultados deste estudo sabemos que a Cx43 non solo se expresa en cartilaxes de animais ^[5] senón que tamén o fai en condrócitos en cultivo de cartilaxes humanos e en tecido. A Cx43 que se expresa nos condrócitos en cultivo (Figura 7) localízase na membrana plásmatica en puntos que poderían indicar a formación de hemicanles ou canles, segundo o condrócito este en contacto co medio ou outro condrócito, polo que nas condrócitos en cultivo, os canles de conexas podería establecer comunicación directa entre dous condrócitos ou entre os condrócitos e a matriz. O feito de encontrar positividade no citoplasma indicaría o proceso de ensamblaxe das conexas en conexión, o cal sucede no retículo endoplasmático e no aparello de Golgi, logo estes conexas viaxan en vesículas guiadas por elementos do citoesqueleto ata a membrana plasmática ^[13]. Nos brazos citoplasmáticos que se establecen entre condrócitos detectase positividade, o que suxire que estas proxeccións estarían implicadas na comunicación celular en condrócitos en cultivo.

Dado que na literatura está amplamente aceptado a falta de comunicación celular directa nos cartilaxes adultos de humano, estes resultados son moi alentadores para seguir investigando máis sobre a Cx43 en tecido. No caso do tecido a Cx43 localízase no citoplasma do borde das lagoas e na matriz (Figura 9). Na matriz véñense puntos ben definidos de positividade, isto indicaría que a comunicación entre as células poderíase establecer ó longo das proxeccións citoplasmáticas.

Ademais da Cx43, en tecido viuse que tamén se expresaba a Cx32, 45 e 46 (Figura 10). En cartilaxes sans vese claramente como a Cx32 e a Cx46 localízanse nos bordes das lagoas (Figura 10A). En tecidos OA a presenza destas conexas aumenta nalgúns pacientes e noutros non é detectable polo que non podemos determinar un patrón das proteínas nos tecidos OA (Figura 10B). O caso da Cx45 (Figura 10C) é diferente, esta conexina si segue un patrón marcado de localización e cantidade en

tecidos artrósicos. Localízase nas lagoas da zona superficial e intermedia en maior medida que nas lagoas da capa profunda do cartilaxe (Figura 10D). Isto tamén é totalmente contrario o que sucedía nos condrocitos en cultivo onde a técnica inmunohistoquímica para detectar Cx45 saíu negativa, sen embargo mediante ensaios de expresión xénica detectáronse pequenas cantidades de RNA mensaxeiro (Figura 6). Os resultados obtidos utilizando tecido demostran que os condrocitos en tecido OA conteñen maiores niveles de Cx45 nas capas intermedia e superficial do tecido. No tecido de doadores sans, localízase de forma homoxénea en todo o tecido e ó redor das lagoas.

A Cx43 tamén mostra un patrón de distribución (Figura 11D) ó longo da cartilaxe, como sucede ca Cx45. Os resultados mostraron que a expresión de Cx43 en tecidos sans e OA non amosa diferenzas significativas. Sen embargo, a nivel proteico, cuantificando a positividade para a Cx43 en tecidos sans e OA detectouse diferenza na cantidade de proteína. No caso dos tecidos OA a Cx43 atópase en maior cantidade que en sans. Ademais concéntrase nas capas superficial e intermedia, que son as zonas onde primerio comeza o dano da cartilaxe en OA (Figura 11C). Polo tanto a maior presenza de Cx43 poderíase relacionar cun maior dano na cartilaxe. De feito nas zonas mais profundas da cartilaxe, en concreto nas rexións que se detectou menor dano tisular, a Cx43 non mostrou maiores niveis en comparación cos sans, pero si perdeu a localización nos bordes das lagoas e foi unicamente detectada ó redor do núcleo dos condrocitos, suxerindo que en estas zonas os condrocitos perderon a comunicación a través das canles de conexas, xa que se perdeu a localización no borde das células.

A Cx43 non solo é importante polo seu papel na comunicación celular, actualmente sábese que está implicado na regulación do ciclo celular e como cambios na proteína poden afectar a múltiples rutas de sinalización celular ^[16]. Esta función esta mediada maioritariamente polas proteínas que interactúan co seu dominio C-terminal ^[21]. Mediante co-

inmunoprecipitación e identificación mediante espectrometría de masas, puidemos caracterizar varias destas proteínas. Entre as proteínas que interactúan co dominio C-terminal atopamos proteínas do citoesqueleto como filamentos de actina e tubulinas que forman os microtúbulos. Isto xustificaría que as vesículas que conteñen os conexóns tras o ensamblaxe das conexinas no retículo endoplasmático e o aparello de Golgi, poden viaxar ó longo das proxeccións citoplasmáticas grazas á interacción dos filamentos de actina e ós microtúbulos co dominio C-terminal da Cx43. Outras proteínas caracterizadas foron proteínas implicadas no metabolismo do ADN, así como no seu empaquetamento e máis proteínas cuxa localización é nuclear. Como acontece noutros casos, no caso dos condrocitos, a Cx43 poderían modificar a expresión xénica na célula. Sábese que o dominio C-terminal da Cx43 pode viaxar ata o núcleo onde se une se cree que incluso podería unirse directamente a rexións promotoras a través do recoñecemento de secuencias consenso ^[26], esta unión podería cambiar a expresión xénica do condrocito sen necesidade dunha ruta de transducción da sinal a través do intercambio de moléculas de sinalización a través da canle. Os resultados obtidos por inmunoprecipitación concordan cas técnicas inmunohistoquímicas feitas para a detección de Cx43, onde se detectan sinais positivas no núcleo celular. Sen embargo, só se detectou positividade no núcleo no caso de condrocitos en tecido de pacientes con OA, localizados nas zonas superficiais e intermedia do tecido. Outras proteínas que interactúan co dominio C-terminal da Cx43 son proteínas relacionadas co retículo endoplasmático e aparello de Golgi o que é lóxico dado que é nestes dous orgánulos onde as conexinas se ensablan en conexóns, e estes inclúense en vesículas para viaxar, grazas a elementos do citoesqueleto, ata a membrana plasmática onde forman unha hemicanle. Tamén caracterizamos proteínas implicadas na tradución proteica, como proteínas ribosomais 40S e 60S ou ARNt. Importante foi a caracterización dos coláxenos, sobre todo do tipo II. O coláxeno tipo II é o principal componente da matriz da cartilaxe e tende a degradarse en

tecidos artrósicos. En tecidos sans hai unha gran expresión de coláxeno II, de feito a cartilaxe articular é o tecido onde máis se exprese esta proteína, pero en tecidos OA diminúe moito, e aumenta a de coláxeno tipo I, mentres que en sans o coláxeno tipo I é minoritario. A interacción da Cx43 co coláxeno tipo II podería ter unha función de anclaxe a matriz ou interacción que podería estar alterada en pacientes con OA. Ademais do coláxeno, identificamos outras proteínas que interaccionan co Cx43 e que en tecidos OA están alteradas según a literatura ^[27] ^{[28][29][30]} como por exemplo proteínas de citoesqueleto: actina citoplasmática 1, gelsolina, moesina, vimentina, vinculina; factor de elongación 2; proteínas implicadas no metabolismo da glicosa: 78Kda proteína reguladora de la glucosa, L-lactato deshidrogenasa cadena A, fructosa aldolasa bifosfato A o gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa; proteínas mitocondriais: superóxido dismutasa; coláxenos, proteínas nucleares, proteínas relacionadas co retículo endoplasmático como a endoplasmina, e outras como α -enolasa (Taboa XVIII). Todas estas proteínas suxiren que a función da Cx43 en condrocitos articulares podería estar alterada en pacientes con OA.

Actina citoplasmática 1
Gelsolina
Moesina
Vimentina
Vinculina
Factor de elongación 2
78KDa proteína reguladora de la glucosa
L-lactato deshidrogenasa cadena A
Fructosa aldolasa bifosfato A
Gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa
Endoplasmina
Superóxido dismutasa
Coláxenos
Proteínas nucleares
A-enolasa

Táboa XVIII: Proteínas alteradas en pacientes OA

Para finalizar este traballo de mestrado decidimos estudar o efecto de diferentes condicións que poderían desencadenar OA utilizando condrocitos en cultivo. Tanto a variación dos niveis de glicosa (Figura 12), como a presenza de IL1- β ou TGF β 3 modifican os niveis de Cx43 (Figura 13). De feito a IL1- β ou a inhibición das canles utilizando inhibidores tipo AGA ou octanol, aumentan os niveis proteicos da Cx43. Estes resultados preliminares suxiren que incrementos nos niveis proteicos da Cx43 poderían desencadenar cambios fenotípicos ou xenotípicos que poderían explicar a dexeneración da matriz que se observa en pacientes con OA. Actualmente continuamos no estudo do mecanismo molecular que podería estar alterado en condrocitos articulares cando se detecta sobreexpresión da Cx43 ou localización a nivel nuclear.

6-CONCLUSIÓNS

Cos resultados obtidos neste traballo podemos concluír:

1. Os condrocitos articulares humanos expresan altos niveis de Cx43 que se localiza no citoplasma e na membrana plasmática, incluíndo na membrana proxeccións citoplasmáticas.
2. Os condrocitos en cartilaxe de adultos expresan Cx43 ademais de Cx32, Cx45 e Cx46.
3. A cartilaxe de pacientes con OA conteñen altos niveis de Cx43 e Cx45 nas capas máis superficiais e intermedia.
4. Os condrocitos de pacientes con OA localizados nas capas superficiais e intermedia, mostran positividade nuclear especialmente para a Cx43.
5. Cambios na concentración da glicosa afecta a expresión xénica da Cx43 e Cx45.
6. En condrocitos articulares en cultivo, O dominio C-terminal da Cx43 interacciona con múltiples proteínas con funcións moi variadas, destacando as relacionadas con ADN e o citoesqueleto.
7. A Cx43 interacciona con proteínas que están alteradas en condrocitos de pacientes con OA.
8. A presenza de IL-1 β , TGF β 3 ou a inhibición da actividade dos canles de conexas, incrementan os niveis proteicos da Cx43.

7-AGRADECIMENTOS

Agradecer a Francisco Blanco e María Mayán por acollerme no seu grupo e permitirme participar neste proxecto. A Eva Gato e Paula Carpintero Fernández por darme a coñecer este mestrado. É a Paula, miña compañeira de poyata, pola súa axuda ó longo deste ano e dos anteriores. A miña tutora María Mayán por ensinarme e guiarme dende fai un ano. A María José Sánchez polo seu traballo cos condrocitos. A Jesús Mateos e Patricia Fernández, así como a tódolos demais proteómicos por ensinarme. A Purificación Salgueiro e Noa Gollanes pola súa axuda histolóxica. E enxeral a tódolos investigadores do INIBIC por contestar sempre a miñas, “constantes”, preguntas.

8-Bibliografía

1-Rose M, Wojciech P. Histología, Texto y Atlas color con Biología celular y molecular. 5ª edición. Madrid: Editorial Medica Panamerica; 2007

2- Álvarez BA. Artrosis todo lo que necesita saber. Libros en Red. 2005

3- Chi SS, Rattner JB, Matyas JR. Communication between paired chondrocytes in the superficial zone of articular cartilage. *J Anat.* 2004; 205: 363-370

4- Schwab W, Hofer A, Kasper M. Immunohistochemical distribution of connexin 43 in the cartilage of rats and mice. *Histochem J.* 1998; 30: 413-419

5- Henry J, Donahue F, Guilak F, Vander Molen MA, McLead KJ, Rubin CT, et al. Chondrocytes isolated from mature articular cartilage retain the capacity to form functional gap junctions. *Journal of bone and mineral research.* 1995; 10(9): 1359-1364

6- Goodenough DA, Paul DL. Beyond the gap: Function of unpaired connexon channels. *Nat. Rev Mol Cell Biol.* 2003; 4:285-294

7- Valiunas V, Polosina YY, Miller H, Miller, Potapova IA, Valiuniene L, Doronin S, et al. Connexin-specific cell-to-cell transfer of short interfering RNA by gap junctions. *J Physiol.* 2005; 568:459-468

8- Sohl G, Willecke K. Gap junctions and the connexin protein family. *Cardiovasc Res.* 2004; 62: 228-232

9- Cottrell GT, Burt JM. Heterotypic gap junction channel formation between heteromeric and homomeric Cx40 and Cx43 connexons. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2001; 281: C1559-1567

10-Yancey SB, John SA, Lal R, Austin BJ, Revel JP. The 43-kD polypeptide of heart gap junctions. Immunolocalization, topology and functional domains. *J cell Biol.* 1989; 108: 2241-2254

11- Jones SJ, Gray C, Sakamaki H. The incidence and size of gap junctions between the bone cell in rat calvaria. *Anat. Embryol.* 1993; 187:343-352

12- Schwab W, Hofer A, Kasper M. Immunohistochemical distribution of connexin-43 in the cartilage of rats and mice. *Histochem. J.* 1998; 30:413-419

13-Dbouk HA, Mrone RM, El-Sabban ME, Talhouk RS. Connexins: a myriad of functions extending assembly of a gap junctions channels. *Cell communication and signaling.* 2009; 7:4

14-Segretain D, Falk MM. Regulation of connexin biosynthesis assembly, gap junctions formation and removal. *Biochim Biophys Acta.* 2004; 1662: 3-21

15- Leithe E, Brech A, Rivedal E. Endocytic processing of connexin 43 gap junction: A morphological study. *Biochem J.* 2006; 393:59-67

16-Vinken M, Vanhaecke T, Papelen P, Snykers S, Henkens T, Rogiers V. Connexins and their channels in cell growth and cell death. *Cellular signalling.* 2006; 18: 592-600

17-Paul DL. New functions for gap junctions. *Curr. Opin. Cell Biol.* 1995; 7: 665-672

18-Yon-Wie Z, Kaneda M, Morita I. The gap junctions-independent tumor suppressing affect of connexin 43. *The Journal of Biological Chemistry*. 2003; 278 (45): 44852-44856

19-Mesnil M, Crespin S, Avanzo JL, Zaidan-Dagli ML. Defective gap junctional intercellular communication in the carcinogenic process. *Biochim Biophys Acta*. 2005; 1719:125-145

20-Laird DW. Life cycle of connexins in health and disease. *Biochem J*. 2006; 394: 527-543

21-Dang X, Doble BW, Kardami E. The carboxy-tail of connexin 43 localizes to the nucleus and inhibits cell growth. 2003; 242: 35-38

22-Sociedad española de Reumatología. *Atrosis: Fisiología, Diagnóstico y Tratamiento*. Madrid: Editorial Medica Panamerican; 2010.

23-Nelson JD, Denisenko O, Bomsztyk K. Protocol for the fast chromatin immunoprecipitation (ChIP) method. *Nature Protocols*. 2006; 1 (1): 179-185

24-Tchetina EV. *Developmental mechanism in articular cartilage degradation in osteoarthritis*. Hindaws Publishing Corporation Arthritis. 2011. ID: 683970

25-Nelson JD, Denisenko O, Bomsztyk K. Protocol for the fast chromatin immunoprecipitation (ChIP) method. *Nature Publishing Group*. 2006; 1(1): 179-185

26-Stains J.P, Lacanda F, Screen J, Dwight AT, Citivelli R. Gap Junctions communication modulates gene trasncription by altering the recruitment of SP1 and Sp3 to connexin-response elements in Osteoblast. *Jbc.* 2003; 278(27): 24377-24387

27-Ruiz-Romero C, Calamia V, Mateos J, Carreira V, Martínez-Gomariz M, Fernández M et al. Mitochondrial Dysregulation of Osteoarthritic Human Articular Chondrocytes Analyzed by Proteomiccs. *Mol Cell Proteomics.* 2009; 8(1): 172-189

28-Ruiz-Romero C, Carreira V, Rego I, Remeseiro S, López-Armada MJ, Blanco FJ. Proteomic analysis of human osteoarthritic chondrocytes reveals protein changes in stress and glycolysis. *Proteomics.* 2007; 7:1-13.

29-Romero-Ruiz C, Calamia V, Mateos J, Carreira V, Martínez-Gomariz Monsterrat et al. Mitochondrial Dysregulation of Osteoarthritic Human Articular Chondrocytes Analyzed by Proteomics. *MCP.* 2009;172-189

30-Ruiz-Romero C, Blanco FJ. The role of proteomics in osteoarthritis pathogenesis research. *Current Drug Target.* 2009; 10(6):11-12