

Universidad Miguel Hernández de Elche

Grado en Biotecnología

Facultad de ciencias experimentales

Área de Anatomía y Embriología Humana



**Modulación de la comunicación intercelular mediada
por “Gap junctions” en la línea celular HEK 293**

Trabajo Fin de Grado

Curso 2016/2017

Autor

Carmen Lebrero Cia

Tutor

Diego Echevarria Aza

Resumen

El intercambio de información entre el conjunto de células de un organismo pluricelular es imprescindible para estos lleven a cabo adecuadamente sus funciones. De entre todos los tipos existentes de formas de comunicación intercelular, las uniones tipo hendidura, Gap o “*Gap junctions*” adquieren relevancia en cuanto a su arquitectura, su fisiología y su función en diferentes órganos. Las uniones Gap son canales que permiten el intercambio de moléculas como ATP, cAMP, IP3, glutamato así como microRNAs. Las uniones Gap están formadas por conexones, hemicanales dispuestos en un conjunto de placas en la membrana plasmática creando orificios y permitiendo, una vez unidos con sus células adyacentes, la comunicación intercelular y la transmisión de la información entre ellas. Estos hemicanales están formados por hexámeros compuestos de conexinas. Las conexinas (Cx) son una familia de proteínas transmembrana que se expresan en células de todo el organismo. El TFG que presento quiere profundizar en la función de un tipo de las Gap junction formadas por Cx43, una Cx que se encuentra en casi todo el organismo de vertebrados, pero con especial relevancia en el Sistema Nervioso Central embrionario, sin saber exactamente qué papel puede ejercer durante el desarrollo de las diferentes subdivisiones que compone nuestro cerebro.

Para ello he centrado mi trabajo en el abordaje sobre cultivos de líneas celulares estándar en el laboratorio (HEK293) y analizar la posible modulación de la expresión de la Cx43 mediante la adición de dos moléculas de carácter proteico, el Gap26 (un péptido mimético) y el FGF8, un morfógeno que se expresa en el cerebro embrionario. El objetivo a largo plazo, es incrementar el conocimiento de la regulación de esta conexina en el desarrollo temprano del Sistema Nervioso Central.

Palabras clave: HEK293, Gap26, FGF8, Gap Junction, Sistema Nervioso central.

Abstract

Information exchange between cells of pluricellular organisms is essential for carrying out their biological functions properly. Among all types of cell communication, Gap junctions acquire relevance due to its architecture, physiology and function in different organs. Gap junctions are channels that allow exchange of several molecules like ATP, cAMP, IP3, glutamate as well as microRNAs. Gap junctions are formed by connexons, hemichannels disposed on plates in the lipidic membrane making true holes and permitng the intercellular communication and thus, transmission between adjacent cells which has been connected. These hemichannels are made by hexamers of connexins. Connexins (Cx) are a family of transmembrane proteins that are expressed in cells of the whole organism. In this project, I wanted to examine in detail the activity of Cx4, a member of the family of connexins that is located in almost the entire vertebrate organism. Particular significance was taken in the embryonic Central Nervous System where it is suggested to play a n important role during the regionalization process of the different neuromeric subdivision.

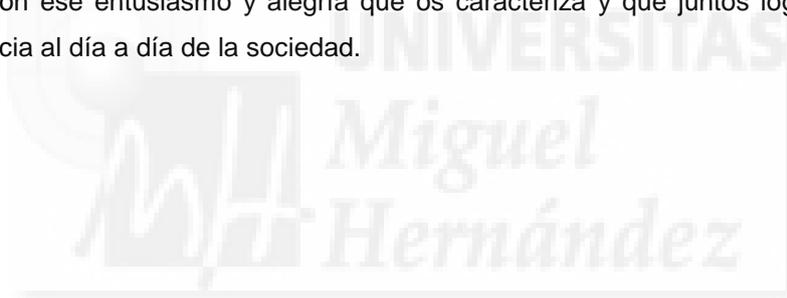
I have focused my “TFG” on a standard cell line culture (HEK293) and I have performed the analysis of the Cx43 expression modulation through the addition of two molecules, Gap26 (a peptidomimetic) and FGF8, a morphogen expressed on the embryonic brain. The purpose of these experiments is to improve the knowledge of the regulatory mechanisms of this connexin during the early development of the Central Nervous System.

Key words: HEK293, Gap26, FGF8, Gap Junction, Central Nervous System

Agradecimientos

Me gustaría agradecer en primer lugar el apoyo recibido de mi familia por darme la posibilidad de estudiar una carrera y de animarme a seguir adelante cuando he tenido algún bache en el camino. A mis amigos, tanto los que han estado desde antes de lanzarme a la vida universitaria como a los que he ido conociendo a lo largo de ésta.

A continuación quisiera agradecer la oportunidad de trabajar en el Instituto de Neurociencias de Alicante con Diego Echevarria, Eduardo de Puelles y su equipo, puesto que sin ellos este trabajo no hubiese sido posible. Gracias por acercar la investigación a los alumnos cuando todavía están dando sus primeros pasos en el campo de la ciencia, y por ese entusiasmo e ilusión transmitiendo conocimientos, no solo científicos sino también éticos. Imposible no agradecer todas las veces que Paqui me ha echado una mano y los buenos ratos que hemos pasado en los descansos en los tiempos de incubación. Por último, ha sido un placer trabajar codo con codo con compañeros en el laboratorio que te acercan a otras disciplinas, como la terapia ocupacional; gracias a Vero, Iris, Pili, Sara, Carla, Raquel, María, Adri y Fran, por echarme un cable cada vez que lo necesitaba, os deseo que continuéis con ese entusiasmo y alegría que os caracteriza y que juntos logremos acercar un poco más la ciencia al día a día de la sociedad.



Índice

| | |
|--|----|
| 1. Introducción | 1 |
| 1.1. Uniones Gap o <i>Gap junctions</i> | 2 |
| 1.2. Las conexinas | 3 |
| 1.2.1. Regulación de las conexinas | 4 |
| 1.2.2. Cx43 | 5 |
| 1.3. Conexinas y Factor de crecimiento fibroblástico 8 en Sistema Nervioso Central | 7 |
| 1.4. Péptidos miméticos a Cx43: El Gap26 | 9 |
| 2. Antecedentes y Objetivos | 10 |
| 3. Materiales y métodos | 11 |
| 3.1. Mantenimiento de cultivos celulares | 11 |
| 3.1.1. Material | 11 |
| 3.1.2. Método | 11 |
| 3.2. Siembra de cultivos celulares en cubreobjetos | 13 |
| 3.2.1. Material | 13 |
| 3.2.2. Método | 13 |
| 3.3. Experimentos de modulación de Cx43 | 15 |
| 3.3.1. Material | 15 |
| 3.3.2. Métodos | 15 |
| 3.4. Inmunocitología con fluorescencia | 16 |
| 3.4.1. Material | 16 |
| 3.4.2. Método | 16 |
| 3.5. Imágenes y análisis de datos | 18 |
| 4. Resultados | 19 |
| 4.1. Crecimiento y confluencia de la línea HEK293 | 19 |
| 4.2. Efecto del peptidomimético Gap26 sobre Cx43 de células HEK293 | 19 |
| 4.2.1. Inmunofluorescencia | 19 |
| 4.2.2. Validación de la toxicidad de Gap26 | 23 |
| 4.3. Efecto del morfógeno FGF8 sobre la expresión de Cx43 de las células HEK293 | 23 |
| 4.4. Experimento piloto con Clon19: Número y comportamiento celular | 27 |
| 5. Discusión | 30 |
| 5.1. Efecto del peptidomimético Gap26 sobre Cx43 de células HEK293 | 30 |
| 5.2. Efecto del morfógeno FGF8 sobre la expresión de Cx43 de las células HEK293 | 31 |
| 6. Conclusión y proyección futura | 32 |
| 7. Bibliografía | 33 |

1. Introducción

La comunicación celular es una capacidad que poseen todas las células de un organismo, imprescindible para el correcto funcionamiento y organización de los seres vivos. Mediante la comunicación celular se produce un intercambio de información entre sí mismas y el medio que las rodea. Este mecanismo existe tanto para seres unicelulares para asimilación de nutrientes, reacción de movimiento debida a estímulos externos; como pluricelulares, donde es más compleja debido a la especialización de los diversos tejidos en funciones específicas [1]. Debido a la importancia y complejidad de la comunicación celular, es necesario que ésta se encuentre fuertemente regulada para que las señales se den en el momento adecuado y que las células receptoras puedan interpretar el estímulo de manera correcta con el fin de realizar la función deseada.

Las moléculas de señalización extracelulares juegan un papel fundamental en la comunicación celular, pudiendo trabajar a distancias largas, como sería el caso de las hormonas, o cortas, que actúan sobre células cercanas. Generalmente todas las células pueden comunicarse con otras emitiendo señales y respondiendo a estímulos emitidos por otras células. Normalmente las señales son recibidas en la membrana celular, mediante proteínas llamadas receptores en las que las moléculas de señal se unen e interaccionan produciendo una amplificación de la señal que puede desencadenar en cascadas de señalización que actúen sobre una o más dianas intracelulares. Las células han desarrollado una gran variedad de mecanismos de señalización para regular importantes funciones biológicas, por ejemplo, receptores que permiten el paso de iones a través de canales en respuesta de fotones o la modulación del proceso de división celular con receptores que afectan a la estructura de la cromatina [1,2].

Los distintos tipos de señales de comunicación celular pueden clasificarse dependiendo de la proximidad entre la célula que envía la señal y la que la recibe, identificándose de esta manera cuatro tipos [2,3]:

1. Señalización endocrina. Cuando las células se comunican a larga distancia utilizando una especie química de señalización llamadas hormonas, entonces se habla del sistema endocrino. Las hormonas son secretadas por las glándulas endocrinas a una baja concentración al sistema sanguíneo, pudiendo viajar por todo el organismo hasta llegar a su receptor, por el que tiene una gran afinidad. Existen hormonas de distintas naturalezas bioquímicas (lipídica y peptídica) por lo que sus funciones son extensas, principalmente regulación, y se pueden clasificar de acuerdo a si la unión con su receptor es extracelular o intracelular.
2. Señalización paracrina y autocrina. En la señalización paracrina las células secretan señalizadoras al espacio extracelular para que ejerzan su acción sobre células cercanas, por el contrario, en la señalización autocrina las moléculas de señal actúan sobre su mismo tipo celular o sobre sí misma. Este tipo de señalización tiene un mecanismo de acción local por lo que es necesario una buena regulación de las moléculas mediante inhibidores, moléculas

antagonistas, mecanismos de inmovilización o degradación. Procesos como el de inflamación o proliferación utilizan este tipo de mecanismo.

3. Señalización neural o por sinapsis. Las células nerviosas o neuronas tienen una estructura única especializada en el envío de información a largas distancias y a gran velocidad. Los axones y las dendritas hacen posible la comunicación entre dos neuronas, sinapsis, que se da mediante la propagación de un potencial eléctrico a través de los axones en la neurona presináptica y una liberación de moléculas de señalización especiales, llamadas neurotransmisores, que pueden inhibir o excitar, según el tipo de neurotransmisor, a la neurona postsináptica.
4. Comunicación yuxtacrina. Este tipo de comunicación celular es dependiente de contacto, no se produce secreción al medio extracelular de moléculas de señalización, sino que los señalizadores se encuentran unidos a la superficie de la célula mensajera y ejercen su acción cuando otra célula entra en contacto con ellos. También pertenece a este tipo, la comunicación intercelular mediante uniones gap o *gap junction*, donde las señales se transmiten directamente del citoplasma de una célula al de otra vecina mediante pequeños canales. La señalización yuxtacrina es de gran importancia en muchas funciones biológicas, por ejemplo, el desarrollo embrionario donde las células necesitan de éste mecanismo para diferenciarse correctamente [4].

Los tipos de comunicación anteriormente descritos coordinan y organizan las funciones principales de las células en los organismos pluricelulares. La proliferación, diferenciación, la muerte celular programada, el control de la homeostasis del organismo y la reparación de tejidos pueden llevarse a cabo gracias al conjunto de mecanismos de señalización celular.

1.1. Uniones Gap o *Gap junctions*

Las uniones gap (GJs) son canales o poros en la membrana lipídica que permiten el paso bidireccional de iones y pequeñas moléculas, como el ATP, el cAMP, el IP₃, el glutamato u otras moléculas de tamaño menos a 1 kD como microRNA (miRNAs), de una célula a otra adyacente [5,6]. Las GJs participan en procesos de propagación y amplificación de cascadas de señalización que tienen como resultado el crecimiento y desarrollo celular, entre otras funciones [6].

La determinación de la estructura de las GJs empezó antes de que éstas fuesen identificadas. Se sabe gracias a la microscopía electrónica (EM) que las uniones gap se agrupan en placas que unen membranas plasmáticas de dos células vecinas, dejando un espacio extracelular ~2-3 nm. Se determinó mediante difracción de rayos x que los canales estaban formados por dos hemicanales o conexones de forma hexagonal [8]. La primera descripción de GJs en Sistema Nervioso Central se la debemos a los estudios del Prof. Constantino Sotelo y Sanford Palay en 1970 [7].

Los conexones están formados por seis conexinas (Cxs) que se disponen en forma de hexágono dejando un poro central. Las conexinas son una amplia familia de proteínas por lo que los conexones pueden estar compuestos por un mismo tipo de conexina, homoméricos, o por conexinas

combinadas, heteroméricos. Además los conexones pueden unirse con otro de la célula adyacente idéntico a él, en este caso se hablará de canal homotópico, o a un conexón con una composición de conexinas diferente a la suya, entonces diremos que se trata de un canal heterotópico [5,9], la diferencia en la composición de conexinas de cada hemicanal le otorga unas características biofísicas determinadas. Cada tipo celular expresa unas conexinas específicas que van variando acorde a la etapa del desarrollo en la que se encuentren.

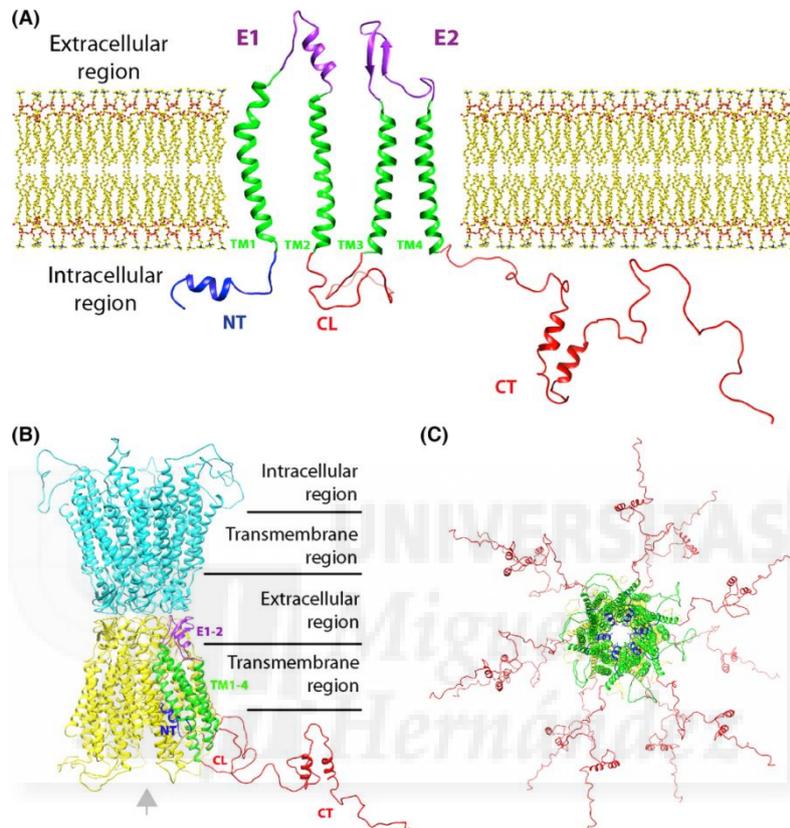


Figura 1. Esquema de estructura de las conexinas y formación de gap junctions [5].

En organismos no cordados encontramos unas proteínas con una función y estructura similar a las conexinas llamadas panexinas o inexas. Se creía que las panexinas se encontraban únicamente en invertebrados pero se sabe de la existencia en cordados de panexinas con funciones de comunicación de una célula con el espacio extracelular, apuntando a un fenómeno de duplicación génica [10].

1.2. Las conexinas

Las conexinas son una familia multigénica de proteínas, existen 21 genes que codifican un tipo de conexina diferente cada uno [5]. Todas las conexinas comparten entre ellas alrededor del 50% de la composición aminoacídica y su distribución en los tejidos del organismo es diferente. Algunas conexinas se expresan en multitud de tejidos, como es el caso de la Cx43, mientras que otras tienen un patrón de expresión más específico de un tipo celular, como es el caso de la Cx36. En cuanto a

nomenclatura, se utiliza el prefijo Cx seguido de un número que se refiere a su masa molecular expresada en kD, por ejemplo, Cx43 [11].

En cuanto a topología, todas las conexinas son prácticamente idénticas. Poseen 4 dominios transmembrana con estructura de alfa-hélice (M1-M4), un asa citoplasmática (CL), dos asas extracelulares (E1, E2) y los dominios amino (NT) y carboxilo-terminal (CT) que se encuentran en el citoplasma (ver figura 1). Los dominios CT y CL son los de mayor variabilidad de secuencia, mientras que el NT, los transmembrana y los extracelulares son altamente conservados [5,11,12]. La longitud del dominio CT es muy cambiante en los miembros de la familia de las conexinas desde 10 hasta 310 aminoácidos (ver figura 2). También el CL varía en longitud, pudiéndose clasificar las conexinas en tres tipos de acuerdo al número de aminoácidos de éste en pequeño (30-35 aa), medio (50-55 aa) y largo (80-105).

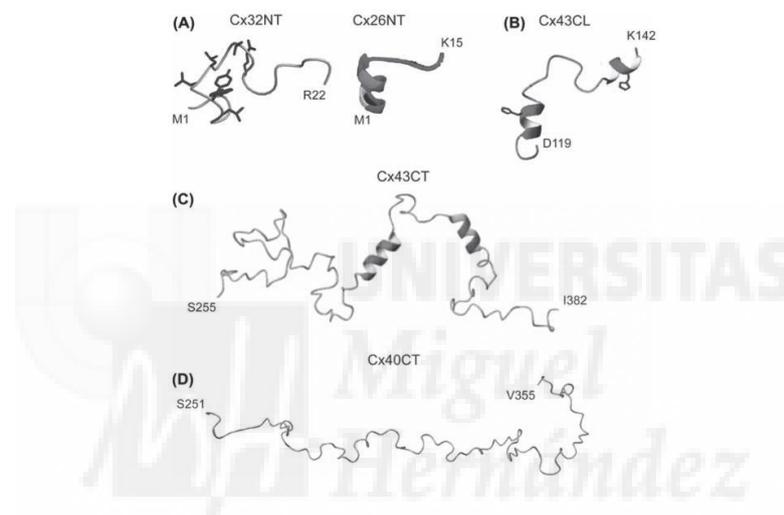


Figura 2. Estructuras resultas por RMN de dominios citoplasmáticos de conexinas [8].

1.2.1. Regulación de las conexinas

Las conexinas pueden sufrir diferentes modificaciones postraduccionales como la fosforilación, hidroxilación, palmitación, acetilación y nitrosilación. La fosforilación es la más importante dado que gran parte de ellas se dan sobre el C-terminal, y así se regula la función del canal, abriéndolo o cerrándolo, según el aminoácido que se haya fosforilado. La fosforilación regula el ciclo de biosíntesis, ensamblado, formación de las GJs, reciclaje y degradación.

Cada miembro de la familia de las conexinas tiene unas propiedades biofísicas diferentes, como es el caso de la conductancia que pueden variar como consecuencia de la acción de fosfatasas y quinasas. La conductancia también puede modularse de forma rápida a través de un cambio de voltaje [9].

Las conexinas son sintetizadas por los ribosomas en el retículo endoplasmático donde también se produce la oligomerización para formar los conexones, se transportan al Golgi donde realizan el mecanismo de maduración cis-trans, se almacenan en vesículas por parte del aparato de

Golgi, se transportan mediados por microtúbulos para finalmente insertarse en la membrana plasmática y agregarse en las denominadas placas de gap junctions. La degradación puede darse a través de la vía del proteosoma o lisosomas [13,16].

1.2.2. Cx43

La Cx43 es probablemente la más mayoritaria en el cuerpo humano, incluido cerebro, y con el patrón de expresión más amplio. Las modificaciones postraduccionales que sufre esta conexina tienen un efecto importante sobre la regulación del ciclo de vida de las mismas, afectando a su biosíntesis, transporte, reciclaje, apertura de canales y degradación. Se le conoce como una proteína de vida media corta, de 1-5 h, y responde a la fosforilación de una gran cantidad de quinasas [15,16].

Cx43 en mitosis

Durante la mitosis la Cx43 padece también distintas transformaciones acordes al cambio morfológico y bioquímico que padecen las células a nivel citoplasmático y nuclear. Se produce una fosforilación específica de la fase mitótica sobre residuos de serina y tirosina que inhibe la comunicación intercelular mediada por gap junctions. Además se ha comprobado que también varía la distribución de la proteína, acumulándose durante la mitosis intracelularmente, este hecho está relacionado con la fosforilación de los residuos aminoacídicos S255, S262 y S368.

El ciclo de vida de la Cx43 está muy bien regulado durante la mitosis dado que la disminución de la actividad intercelular que ofrecen las GJs se debe al cierre de los canales, el desarme de las GJ, la degradación de éstas y el restablecimiento de la comunicación tras la mitosis [18].

Expresión de Cx43 en el organismo

Se conoce la expresión de Cx43 en multitud de órganos; como corazón, oído interno, riñón, hígado, glándulas mamarias, pulmones, sistema nervioso, en el tejido esquelético e incluso en las gónadas, es por ello que se dice que es la conexina con el patrón de expresión más amplio y en cada uno realiza una función biológica distinta.

Corazón

En el corazón, la Cx43 se expresa en grandes cantidades junto con la Cx40 y Cx45, para formar GJ. Estas GJ tienen un papel fundamental en la morfogénesis del corazón dado que se ha observado que ratones con mutaciones en estos genes padecen malformaciones cardíacas. También se ha demostrado que la Cx43 interviene en el consumo de K^+ de las mitocondrias proporcionando protección celular contra el daño isquémico [19]. Se ha comprobado que la Cx43 incrementa su expresión tras una lesión mecánica del tejido y se ha determinado que tiene una función con la migración celular [20].

Pulmones

La Cx43 se expresa en los capilares y vénulas de los pulmones, donde es necesaria para propagar las señales de Ca^{2+} , que media la señal proinflamatoria. Se conoce que la Cx43 tiene un papel fundamental en el control de la migración de neutrófilos por el epitelio microvascular y, por tanto, en la propagación la respuesta inflamatoria [19, 21, 22].

Sistema nervioso central

Las uniones gap son imprescindibles en el sistema nervioso central para transmisión de señales eléctricas y bioquímicas, por lo que se encuentran en gran cantidad de tipos de células nerviosas y de la glía. En neuronas se observa la expresión de Cx36 exclusivamente, mientras que las Cx43 y Cx32 se han encontrado en astrocitos y oligodendrocitos, respectivamente [23,24].

Los astrocitos se organizan formando "sincitios" debido a su alta concentración de GJs, que les permite el transporte de moléculas de unas células a otras. Estas células tienen una función de soporte neural, además actúan en la migración de las neuronas en el córtex, el tráfico metabólico y la propagación de impulsos de Ca^{2+} en el sistema nervioso central. Se piensa que la Cx43 media la liberación de gliotransmisores y ATP [19], aunque hay variedad de opiniones en cuanto a este tema [25]. La fosforilación de la Cx43 por quinasas como la PKC, produce el desanclaje de las gap junctions de la membrana y el cese de la comunicación intercelular mediada por GJs.

Conexinopatía asociada a Cx43: ODDD

Dado que la Cx43 está ampliamente repartida en el organismo y por lo tanto en distintos tipos celulares, las mutaciones en el gen que la codifica, *GJA1*, tienen distintos fenotipos. En humanos, las alteraciones en el gen *GJA1* están asociadas a la displasia oculodentodigital (ODDD), una enfermedad rara autosómica dominante, aunque también se han identificado mutaciones recesivas en los casos más graves, caracterizada por el siguiente fenotipo: caras llamativas por nariz afilada y alas nasales delgadas, anomalías oftalmológicas como el glaucoma, problemas de dentición y manifestaciones digitales en la fusión de los dedos, sindactilia. También se ha informado de anomalías como el engrosamiento del cráneo y de la cortical de los huesos largos [26,11]. Se han descrito también casos de sordera y problemas dermatológicos [28].

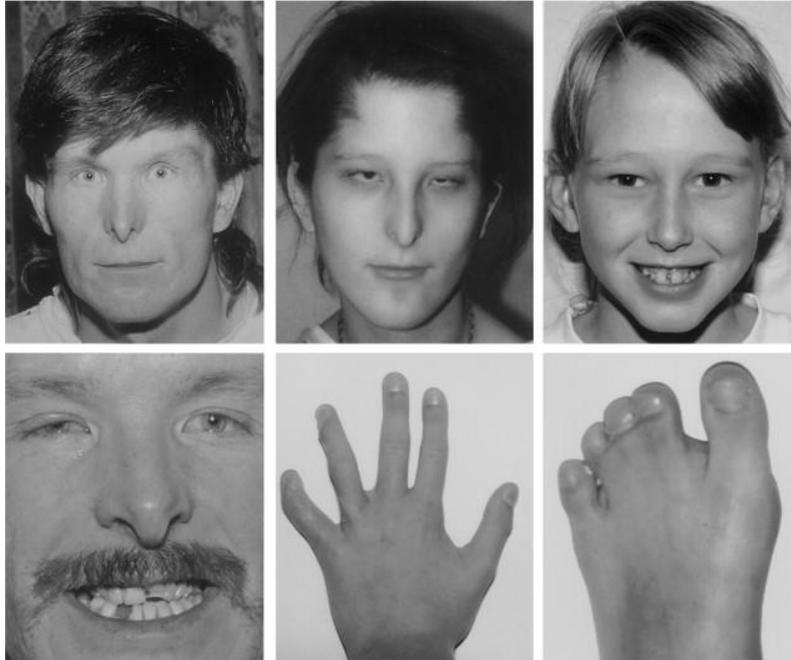


Figura 3. Fenotipo característico de ODDD [29].

A pesar de que la Cx43 es la que mayoritariamente se expresa en el corazón, y se sabe que participa en el desarrollo cardíaco, pocos fenotipos tienen alteraciones cardíacas; solo una de las sesenta mutaciones conocidas para el gen *GJA1*. Una de las patologías relacionadas con la mutación del gen que codifica la Cx43 es la heterotaxia viscerotriaxial que afecta a la correcta morfogénesis del corazón [11].

1.3. Conexinas y Factor de crecimiento fibroblástico 8 en Sistema Nervioso Central

Es conocido que durante la regionalización del sistema nervioso central unas moléculas llamadas morfógenos son secretadas desde los organizadores secundarios, unas regiones del tubo neural encargadas de dirigir y orquestar la morfogénesis del sistema nervioso central controlando la especificación, migración y diferenciación adecuadamente. El principal y más estudiado organizador secundario es el organizador ístmico (IsO), que se encuentra entre el mesencéfalo y el rombencéfalo y proporciona polaridad estructural a las regiones adyacentes [5, 31, 32].

Los morfógenos se distribuyen a partir de los organizadores secundarios, pasando en un primer momento al lumen del tubo neural y difundiendo desde ahí a células vecinas. Estas moléculas son las encargadas de promover la proliferación, diferenciación y supervivencia de las células del tubo neural y actúan en un tiempo, espacio y concentración concreto [5, 31, 32].

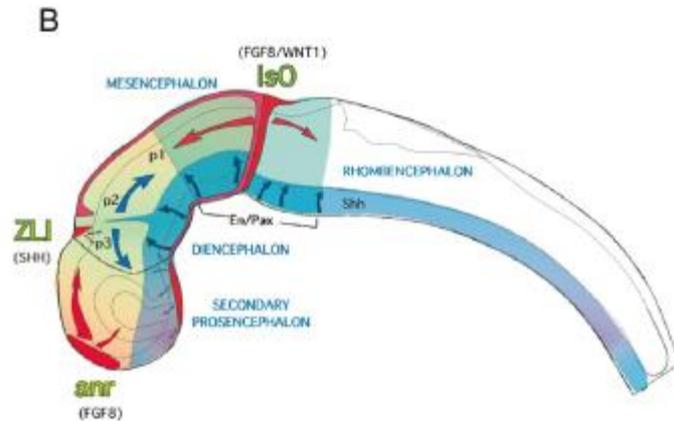


Figura 4. Esquema de la localización de los organizadores secundarios en el tubo neural y la expresión de FGF8 representada en color rojo [31].

La familia de los factores de crecimiento de los fibroblastos (FGFs) es un grupo de polipéptidos que controlan gran parte de las respuestas del organismo durante el desarrollo embrionario y en la edad adulta. Esta familia de morfógenos consta de 22 genes de los cuales 15 actúan de manera paracrina, 3 de manera endocrina y 4 son reguladores de la familia, que impiden que los receptores de FGFs se unan a la membrana celular [5].

En el SNC el miembro más importante de esta familia, puesto que se conoce que dirige al resto, es el FGF8, que es esencial para la correcta formación del tubo neural y para la supervivencia celular, dado que la inactivación del FGF8 provoca muerte celular y la desaparición completa del cerebelo y del mesencéfalo [33]. El FGF8 se expresa en forma de gradiente desde el IsO hacia ambos territorios del tubo neural, mesencéfalo y rombencéfalo. Estos morfógenos provocan la síntesis de otras moléculas (en las células inductoras) necesarias para que su actividad vaya reduciéndose espacialmente y que la morfogénesis sea correcta (moduladores negativos). Algunos moduladores de retroalimentación negativa de la señal de FGF8 pertenecen a las familias de las Mkp3, Sef y Sprouty, y actúan en la cascada de señalización de la vía de las MAPKinasas [34].

Se ha demostrado una relación entre la expresión de Cx43 y los FGFs [5,30]. Se piensa que FGF8 necesita de la Cx43 para llevar a cabo una buena actividad inductora, dado que ambos comparten un patrón de expresión en los organizadores secundarios. FGF8 no puede ser transportado a través de las uniones tipo gap, puesto que su tamaño es demasiado grande y su forma de acción es de manera paracrina, por lo que la relación de las conexinas con los morfógenos sigue sin ser demostrada. Algunos autores sugieren que las Cxs son importantes para el transporte de pequeños fragmentos de mRNAs (microRNAs) que ayuden al proceso de morfogénesis y por lo tanto a la inducción, especificación y diferenciación temprana del sistema nervioso central [5,6].

1.4. Péptidos miméticos a Cx43: El Gap26

Los péptidos miméticos o peptidomiméticos son pequeños péptidos que imitan la estructura o que contienen secuencias de proteínas y que tienen un efecto sobre la actividad de éstas, pudiendo aumentar la actividad o inhibirlas [35].

El Gap26 es un péptido mimético de la Cx43 que corresponde a los residuos 63-75 (VCYDKSFPISHVR) pertenecientes a un dominio extracelular. Este péptido es capaz de bloquear la comunicación intercelular mediada por uniones tipo Gap de manera reversible. Estos péptidos bloquean el paso de ATP [36,38] y Ca^{2+} [36,39] a través de los conexones, además de las corrientes eléctricas tanto de las gap junctions como de los hemicanales [40].

Cx43 hemichannels

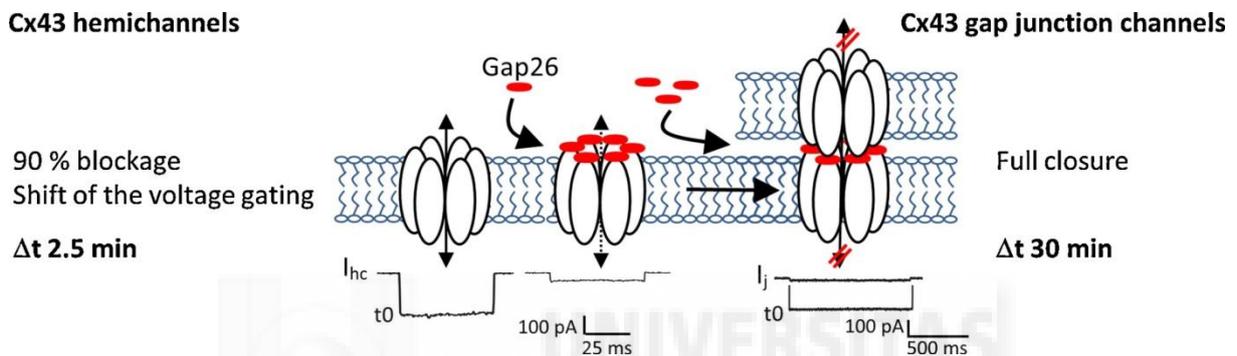


Figura 5. Esquema de acción del Gap26 sobre la Cx43 [36].

2. Antecedentes y Objetivos

Las uniones tipo Gap mediadas por Cx43 se encuentran integradas en nuestro organismo ejerciendo funciones vitales para la supervivencia del mismo. En cada órgano tiene una función diferente pero siempre interviniendo en la transmisión de la información de un lugar a otro. En el órgano más importante de nuestro cuerpo, el cerebro, su papel es como transmisor de la información de un lugar a otro. En el órgano más importante de nuestro cuerpo, el cerebro, su papel es como transmisor de la información mediante la formación de la sinapsis eléctrica. También en el desarrollo temprano del cerebro, cuando no existen sinapsis sino un simple neuroepitelio monoestratificado, estas Cx se expresan y deben ejercer una función. La hipótesis de partida de este laboratorio es que Cx43 coopera en la transmisión de la información posicional de las células neuroepiteliales para la especificación y diferenciación de las distintas subregiones del cerebro. Esta cooperación es para que los morfógenos, aquellas moléculas secretadas al medio extracelular puedan ejercer su función correctamente y a largas distancias.

El objetivo a largo plazo es analizar la modulación esta conexina en el SNC embrionario para conocer su función.

El objetivo a corto plazo y focalizado en este TFG es analizar esta modulación en cuanto a la expresión de Cx43 validando una línea celular comercial, HEK293 (Human embrionic kidney cell line), que tras muchas mutaciones comparte rasgos de una neurona y con la ventaja de ser una línea celular fácil de cultivar y de transformar in vitro. Para ello hemos dividido este objetivo en dos apartados:

- 1- Averiguar qué efecto tiene el bloqueo de estos canales en la propia expresión de Cx43.
- 2- Demostrar una relación y validación de la expresión de Cx43 y el factor de crecimiento fibroblástico 8 (FGF8) en estos cultivos.

3. Materiales y métodos

3.1. Mantenimiento de cultivos celulares

3.1.1. Material

- Cabina de seguridad biológica Clase II
- Pipetas desechables
- Propipeta
- Micropipetas
- Puntas de micropipeta
- Tubos Falcon de 50 mL
- Frasco de cultivo de plástico de 75 cm²
- Etanol 70%
- Medio de cultivo completo
 - 86% de medio salino Dulbecco (DMEM)
 - 10% Suero fetal bovino (SBF)
 - 2% Antibiótico P/S (Penicilina y estreptomicina)
 - 1% L-glutamina
 - 1% Aminoácidos no esenciales
- Dimetilsulfóxido (DMSO)
- Criotubos

4.1.1.1. Línea celular Hek293

La línea Hek293 son células derivadas de riñón de embrión humano. Son células fácilmente cultivables y transfectables, con un tamaño de unas 13 micras, por lo que son muy útiles en experimentación ya que pueden producir proteínas exógenas y sirven como modelos para investigar cascadas de señalización, entre otras funciones.

Las Hek293 tienen propiedades tanto endoteliales, epiteliales y de fibroblastos, relacionadas con su naturaleza de riñón embrionario, como neurales.

4.1.1.2. Línea celular clon19

Las células Clon19 son células Hek293 transfectadas permanentemente con la proteína de fusión FGF8b de ratón por microelectroporación con GFP como marcador de selección. Estas células secretan al medio proteína FGF8, por lo que puede ser utilizado experimentalmente.

Esta línea estaba disponible para trabajar con ella en el laboratorio del Dr. Diego Echevarría Aza del Instituto de Neurociencias de la Universidad Miguel Hernández de Elche.

3.1.2. Método

Para trabajar en la sala de cultivos de líneas celulares es obligatorio el uso de guantes y bata con el fin de reducir la contaminación. En primer lugar, se esteriliza la campana mediante radiación ultravioleta durante 5 minutos. Posteriormente, se enciende la campana para que produzca un flujo vertical y se limpia la superficie de trabajo con etanol al 70%. Se prepara la campana introduciendo

todos los materiales de trabajo necesarios tras espolvorearlos con etanol al 70% previniendo así la contaminación del cultivo celular.

Las líneas celulares utilizadas en este trabajo de fin de grado son las células embrionarias de riñón humano (Hek293) y las Clon19. El medio de cultivo completo estándar preparado para cada una de las líneas celulares se guardó en botellas separadas y etiquetadas. El medio de cultivo suele cambiarse a los 3 o 4 días para lo cual se absorbe el medio viejo mediante la bomba de vacío recogiendo así las posibles células que se hayan despegado de la botella, y se añaden 10 mL de medio nuevo en el frasco de cultivo.

Los medios de cultivo tienen unos indicadores de pH específicos que informan de la necesidad de un cambio de medio mediante el color, siendo el color rojo o rosado el ideal y el amarillo el aviso de que el medio ha perdido nutrientes.

Es importante observar las células con regularidad en el microscopio para saber si están creciendo adecuadamente. En el caso de observar que las células no crecen en monocapa sino unas sobre otras, significa que no hay suficiente espacio para unas células tan confluentes y será necesario realizar un subcultivo celular a otro frasco, diluyendo así la concentración de células.

Por último, las células se mantienen en una estufa en las condiciones ideales de temperatura y aireación, 37°C y 5% de CO₂, libres de contaminación.

Congelación de células para preservación de líneas

Las líneas celulares que se encuentran a una confluencia mayor al 80% pueden ser congeladas para ser utilizadas un tiempo después, para lo cual se despegan las células en crecimiento del frasco, asegurándose que la viabilidad celular es mayor del 85% para que el reinicio de este cultivo congelado sea exitoso, y se recogen en un tubo de centrifuga.

Se centrifuga el tubo con células a 1000 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente, recoger el sobrenadante y añadir un volumen pequeño de medio nuevo y se cuentan las células para luego ajustar la concentración de células a congelar entre 2 y 4·10⁶ células/mL. Se añade un 10% de DMSO. Se llenan los criotubos con la mezcla y se identifican con el nombre de la línea celular, el número de pase y la fecha de congelación. Pasar los tubos al congelador de -20°C y luego a -80°C. Al día siguiente colocar los criotubos en un depósito de almacenamiento con nitrógeno líquido.

Test de mycoplasma

Es importante controlar que las líneas celulares con las que se trabaja no estén contaminadas. Los mycoplasmas son un tipo de bacterias que no tienen pared celular por lo que son resistentes a antibióticos cuya acción se da sobre la síntesis de la pared celular. La contaminación por mycoplasma de los cultivos celulares ocasiona un cambio del comportamiento normal de las células dado que por su pequeño tamaño (0,3 a 0,5 µm de diámetro) se alojan en el citoplasma y

pueden variar la gráfica de crecimiento celular, haciendo que éstas lleguen a la fase estacionaria más rápidamente.

Existen varios métodos de detección de contaminación por mycoplasma, un ejemplo de estos métodos es la realización de una PCR utilizando primers específicos, pero este método es caro y puede dar lugar a falsos negativos si los primers utilizados no son los adecuados. Una alternativa al método de detección por PCR es la tinción con DAPI, más fácil, rápido y más barato. El DAPI se intercala en el DNA de la célula y al observarse bajo ultravioleta emite fluorescencia azul, por lo que si existiese contaminación bacteriana además del núcleo celular se verían puntitos azules alrededor del núcleo.

3.2. Siembra de cultivos celulares en cubreobjetos

3.2.1. Material

- Campana de seguridad biológica Clase II
- Pipetas desechables
- Propipetas
- Micropipetas
- Puntas de micropipeta
- Placas de cultivo celular de 12 o 24 pocillos
- Cubreobjetos 12 mm
- Tubos Eppendorf
- Tubos Falcon de 50 mL
- Pinzas
- Cámara de Neubauer
- Medio de cultivo completo
- Agua esterilizada o PBS filtrado
- Azul tripán para el conteo

3.2.2. Método

Fijación y tratamiento de los cubres en los pocillos de las placas de cultivo

Dado que las células crecen mejor sobre plástico que sobre superficies de vidrio, es necesario llevar a cabo un procedimiento en el que se tratan con poli-L-lisina, que facilita el anclaje de las células a la superficie del cubre.

Se añade una gota de unos 10 μ L en el centro de los pocillos en los que se realizará la siembra y se deja caer con suavidad el cubre sobre ella. Cuando se tengan todos los cubres preparados se añaden 100 μ L de poli-L-lisina sobre cada cubre de manera que quede formando una gota. Se cierra la placa y se deja en la estufa durante 30 minutos.

Extracción de células

Utilizando una pipeta desechable recogemos el medio de los frascos de cultivo de las células que se quiere sembrar, y se van haciendo pasadas lavando así la superficie de la botella y despegando las células. Este procedimiento para despegar células también puede realizarse utilizando tripsina, la cual rompe los enlaces que tienen las células con la superficie de la botella en unos 5 minutos, pero se observó que las células utilizadas en este trabajo se despegaban con

facilidad únicamente haciendo pasadas con su medio de cultivo. Cuando la mayor parte de las células hayan sido despegadas se recoge todo el medio y se deposita en un tubo Falcon de 50 mL.

Este tubo Falcon se centrifuga a temperatura ambiente y 1000 rpm durante 5 min con el fin de decantar las células, obteniéndose finalmente un sobrenadante de medio de cultivo y un pellet de células. Se succiona el sobrenadante del tubo con la bomba de vacío y se añade medio de cultivo nuevo para resuspenderlas.

Contaje celular

Se recoge una alícuota de 50 μ L del tubo con células y se mezcla con azul tripán μ L. Se deposita la mezcla en la cámara de Neubauer y se observa en el microscopio.

Las tienen cuadrantes cuadrantes de 4x4, para hacer el contaje de células únicamente contamos las células de uno de los cuadrantes teniendo en cuenta que las células que se encuentren en los bordes no serán contadas y las que se encuentren agrupadas se tomarán como una sola. Además se contarán únicamente las células viables, es decir, las que tengan un color transparente brillante, si la célula tiene toques azulados no se contarán. Existe una fórmula para calcular el número de células totales utilizando una cámara de Neubauer:

$$\begin{aligned} n^{\circ} \text{ células totales} \\ &= n^{\circ} \text{ células en un cuadrante} \cdot \text{concentración} \cdot \text{factor de contaje (10000)} \\ &\cdot \text{volumen disolución} \end{aligned}$$

Y a continuación, se calcula el volumen de células del tubo Falcon necesario para tener unas 10.000 células por cubre.

Contaje de viabilidad celular

Se realizaron contajes de viabilidad celular con el objetivo de determinar la supervivencia celular y controlar la proliferación celular en las placas tras los experimentos de modulación de Cx43. El método utilizado es el mismo que el de contaje celular pero despegando las células de los cubreobjetos de los pocillos de las placas de cultivo y distinguiendo contaje entre células viables y no viables. Dado que el azul tripán se infiltra en el citoplasma de las células muertas, éstas tendrán un color azulado, mientras que las viables serán de color transparente brillante. Después se calcula el porcentaje de viabilidad celular utilizando la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de viabilidad celular} = \frac{n^{\circ} \text{ células viables}}{n^{\circ} \text{ células totales}} \cdot 100$$

Preparación de los cubreobjetos y siembra células

Tras pasar los 30 minutos necesarios para el tratamiento de los cubreobjetos con poli-L-lisina se retira la poli-L-lisina con la bomba de vacío y se realizan tres lavados con 100 μ L de agua

esterilizada. Este paso es necesario puesto que si no se limpiasen correctamente los cubreobjetos la poli-L-lisina residual sería tóxica para las células.

Una vez los cubreobjetos estén limpios y secos se añade unos 75 μ L de medio con células sobre el cubre para que haya unas 10.000 células en cada cubre.

3.3. Experimentos de modulación de Cx43

El objetivo principal de este trabajo de fin de grado es observar la modulación de la expresión de la Cx43, al tratar células Hek293 con distintas moléculas, en este caso Gap26 y FGF8.

3.3.1. Material

- Placa 12 pocillos con células HEK293
- Gap26 (0,25 mg/mL)
(ApexBio Cas N°.197250-15-0)
- Medio de clon19 de 24h
- Micropipetas
- Puntas de pipeta
- Cabina de seguridad biológica Clase II

3.3.2. Métodos

Modulación de Cx43 mediante Gap26

El Gap26 (VCYDKSFPISHVR) es un péptido mimético de la Cx43 y un inhibidor reversible de los conexones [35].

Se utilizó una dilución de Gap26 a una concentración de 0,25 mg/mL para cubrir pocillos de células HEK293 que estuvieron expuestos al péptido durante 6 y 12 h. Tras acabar el periodo de exposición al péptido unas muestras se sometieron a inmunocitología y a otras se les realizó un conteo de viabilidad celular utilizando azul tripán. Este conteo de viabilidad celular se llevó a cabo con el objetivo de determinar si debido a la inhibición de las gap junctions y la falta de comunicación intercelular las células muriesen.

Modulación de Cx43 mediante FGF8

El FGF8 es una proteína que pertenece a la familia de factores de crecimiento de fibroblasto, que posee actividades que fomentan el crecimiento y diferenciación celular. Además, participan en importantes procesos biológicos como el desarrollo embrionario o la reparación de tejidos, entre otros. La hipótesis es que un tratamiento de las células HEK 293 con FGF8 aumentará los niveles de expresión de Cx43.

Se recogió el medio de cultivo de 24 h de células Clon19. Estas células secretan al medio FGF8, por lo que al adicionar este medio a células HEK293 durante 12, 24 y 48 h se podrá observar cómo varía la expresión de Cx43.

3.4. Inmunocitología con fluorescencia

3.4.1. Material

- Agitado en orbital
- Papel de aluminio
- Tampón fosfato salino (PBS) 1x
- Paraformaldehído al 4%
- Pipeta pasteur
- Micropipetas y puntas de micropipeta
- Mowiol-NPG (Mowiol® 4-88 de Calbiochem Ref: 475904 y NPG Sigma-Aldrich® Ref: P3130)
- Portaobjetos
- Microscopio confocal
- Suero de caballo
- DAKO (Agilent Technologies; Santa Clara, CA)
- Anticuerpo primario
 - Anti-Cx43 en conejo (Cell signaling technology; Danvers, Massachusetts) al 1:100 en DAKO
- Anticuerpo secundario
 - Alexa Green 488 anti-rabbit (Molecular probes; Eugene, Oregón) in donkey al 1:500 en PBS 1x
- 2-(4-amidinofenil)-1H-indol-carboxamida (DAPI) (Thermo-Fisher® Ref: 11540206)

3.4.2. Método

Para la realización de este trabajo se realizó una inmunofluorescencia indirecta sobre las células, en la que el anticuerpo primario se unía a una parte de la proteína Cx43 y el anticuerpo secundario conjugado a fluoróforo, se unía al primario amplificando la señal. Mediante esta técnica demostramos la presencia de la Cx43 en las líneas celulares utilizadas y somos capaces de cuantificar su expresión.

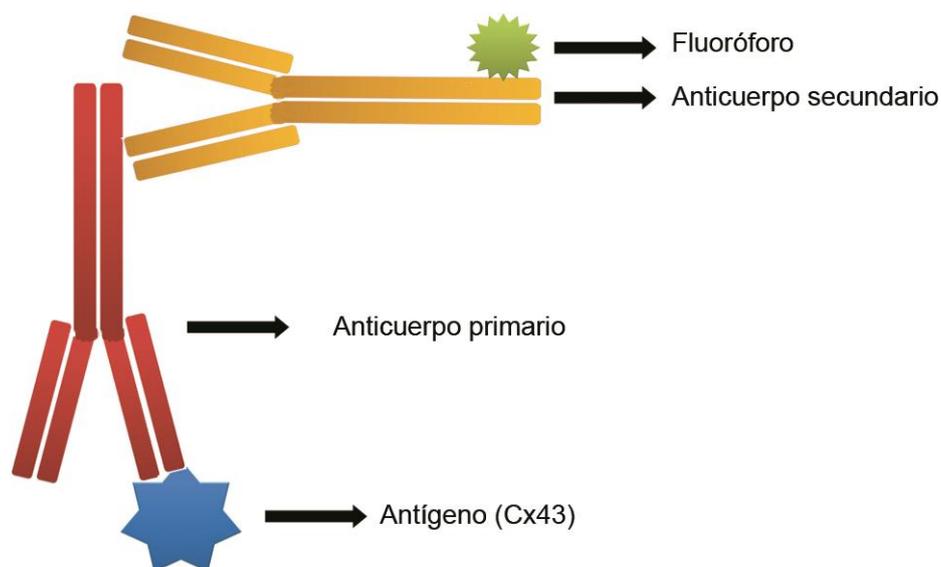


Figura 6. Esquema del proceso de inmunofluorescencia indirecta.

Marcaje del anticuerpo primario

Se retira el medio de los cubreobjetos mediante la bomba de vacío y se añade 1 mL de paraformaldehído al 4% en cada pocillo para fijar las células al cubre y se deja actuar durante 10 minutos en agitación.

Se retira el paraformaldehído y se realizan tres lavados de 10 minutos con PBS 1x en agitación con la finalidad de eliminar el PFA residual. Se succiona el PBS y se añaden 700 μ L en cada pocillo de la solución bloqueo de *Horse Serum* al 10% en PBS y se deja en agitación durante 1 hora. Esta solución bloqueo permite bloquear las proteínas celulares para aumentar la especificidad de la unión del anticuerpo primario a la Cx43. Se prepara el anticuerpo primario anti-Cx43, para añadir 500 μ L por pocillo. Tras haber pasado la hora del bloqueo, se absorbe el *Horse Serum* 10% y se añade el anticuerpo primario a excepción del pocillo de control de inmuno que nos permitirá calcular el ruido de fondo futuramente.

Las placas con anticuerpo primario se guardan a 4°C en agitación hasta el día siguiente.

Marcaje del anticuerpo secundario

Se realizan tres lavados de 10 minutos con PBS al 1% de *Horse Serum* en agitación. Durante el tiempo de espera se preparan los anticuerpos secundarios necesarios de fluorescencia contra anticuerpos de conejo a una dilución 1:500 en PBS.

Se añaden 500 μ L de anticuerpo secundario por pocillo, incluso los pocillos de control de inmuno, y se dejan las placas en agitación durante 2 horas cubiertas por papel de aluminio para evitar la pérdida de fluorescencia por fotooxidación. Pasadas las dos horas se realizan 3 lavados de 10 minutos con PBS a los pocillos.

Se prepara la disolución DAPI, que marcará los núcleos de las células de color azul, con una dilución de 1:1000 añadiendo 500 μ L por pocillo, envolviendo la placa con papel de aluminio durante 10 minutos en agitación. Finalmente se realizan 3 lavados con PBS de 10 minutos en agitación.

Montaje de portas

Los cubres deben ser montados sobre portaobjetos para ser visualizados en el microscopio. En cada portaobjetos caben como máximo 3 cubres con muestras, lo ideal es que en cada porta se encuentre el experimento junto a los controles y deberán rotularse adecuadamente con la indicación de cada muestra, el tipo de células, el nombre de la persona responsable y la fecha.

El proceso de montaje, al tratarse de muestras con fluorescencia, se lleva a cabo en un puesto de trabajo en el que no incida la luz directamente o este poco iluminado, para evitar la pérdida de fluorescencia. Se echan gotas pequeñas de Mowiol-NPG sobre el porta justo donde se vaya a depositar el cubre. El cubre se deposita lentamente, con precaución para que no se formen burbujas,

utilizando unas pinzas curvadas y con la superficie donde se encuentran las células mirando hacia el porta.

3.5. Imágenes y análisis de datos

Las imágenes utilizadas para la recopilación de datos fueron realizadas mediante microscopía confocal (LEICA SPEII).

Se utilizó el programa ImageJ para tratamiento de las imágenes, eliminando el ruido de fondo utilizando las fotos de control de inmuno de nuestras muestras.

Los datos se analizaron estadísticamente mediante el software SigmaPlot 12.0, comparando dos grupos entre sí para saber si son heterogéneos mediante t-test que compara la varianza entre los dos grupos (Equal variances o F-test). En el caso de fallo del test de varianza ($p < 0,050$) se procedió con el Mann-Whistney test cuya hipótesis de partida es que las muestras son independientes mediante la comparación de las medianas, propuesto en un inicio para analizar muestras del mismo tamaño y, extendido más tarde para muestras de tamaño arbitrario



4. Resultados

Para la realización de este trabajo de fin de grado se han utilizado dos líneas celulares diferentes, las HEK293 (células embrionarias de riñón) y las Clon19 disponibles para trabajar con ellas en el laboratorio del Dr. Diego Echevarría Aza del Instituto de Neurociencias de la Universidad Miguel Hernández de Elche.

4.1. Crecimiento y confluencia de la línea HEK293

Se realizaron varias pruebas sembrando un distinto número de células Hek293 en los pocillos, entre 2.000, 5.000 y 10.000 células/pocillo, con el fin de determinar la concentración ideal para que pasadas 24 horas de crecimiento se obtuviese un estado de confluencia. Finalmente, se concluyó que la concentración ideal era de 10.000 células/pocillo.

4.2. Efecto del peptidomimético Gap26 sobre Cx43 de células HEK293

Se quiso analizar el efecto de una disolución Gap26 0,25 mg/mL sobre las células HEK293 sobre la Cx43 y la viabilidad celular de esta línea celular. Se planificó un experimento para células HEK293 sembradas a 10.000 células/cubre y con un crecimiento de 24 horas, en placas de cultivo celular con tratamientos diferentes siguiendo la tabla siguiente:

| Nº pocillo | Tratamiento sobre células |
|-------------------|--|
| 1 | Gap26 durante 6 h + Inmunofluorescencia |
| 2 | Gap26 durante 6 h + Contaje de viabilidad celular |
| 3 | Control células HEK293 6h + Inmunofluorescencia |
| 4 | Control células HEK293 6 h + Contaje viabilidad celular |
| 5 | Gap26 durante 6 h + lavado y overnight + Inmunofluorescencia |
| 6 | Gap26 durante 6 h + lavado y overnight + Contaje de viabilidad celular |
| 7 | Gap26 durante 18 h + Inmunofluorescencia |
| 8 | Gap26 durante 18 h + Contaje viabilidad celular |
| 9 | Control células HEK293 + Control Inmunofluorescencia |

4.2.1. Inmunofluorescencia

En las muestras en las que se realizó la inmunocitología con fluorescencia y se realizaron fotografías de distintos campos aleatorios desde el centro del cubre a la periferia, utilizando para ello la microscopía confocal (Leica SPEII). Se realizó una contabilidad de los puntos de conexina 43 (Cx43) marcados con la inmunofluorescencia utilizando las fotografías obtenidas.

En presencia de Gap26 durante 6 horas de incubación se observó una disminución del número de botones de Cx43 positivos en las muestras de células HEK293 (ver figura 8). Por otro lado, las muestras que tuvieron Gap26 durante 6 horas y posteriormente fueron lavadas con medio de cultivo fresco para eliminar el Gap26 residual adherido a las células durante 18 horas (overnight),

mostraban una cantidad de Cx43 superior al control (ver figura 7 y 8). Sin embargo, la exposición prolongada y continua de Gap26 durante 18 horas, no produjo alteración en la expresión de placas Cx43 positivas (ver discusión) (ver figura 7 y 8).

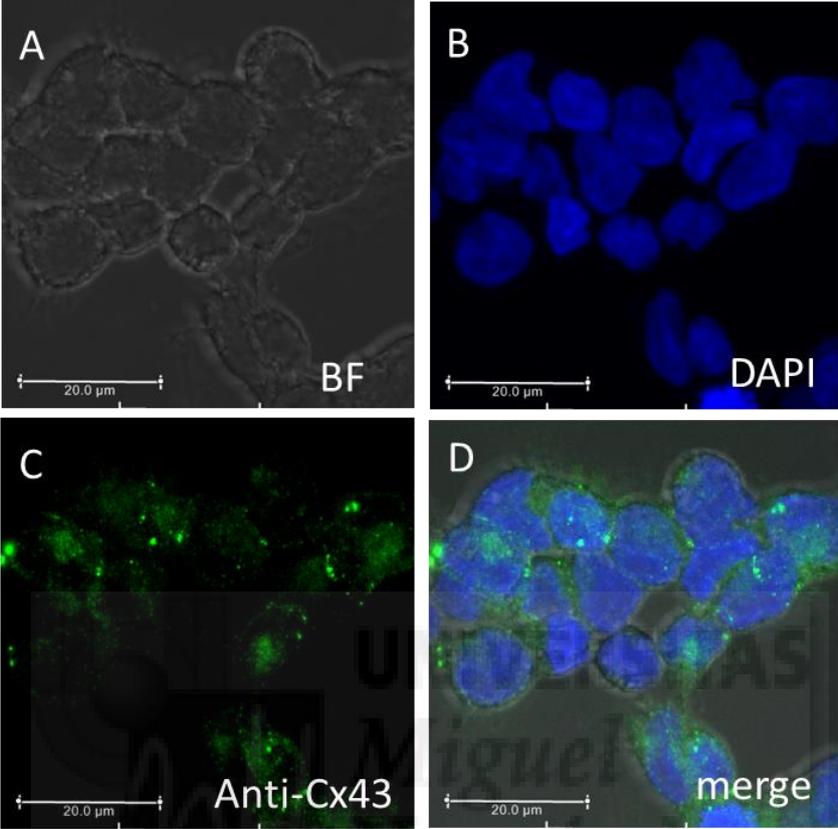


Figura 7: Fotomicrografía control de un plano de células HEK293 a las 6 horas.

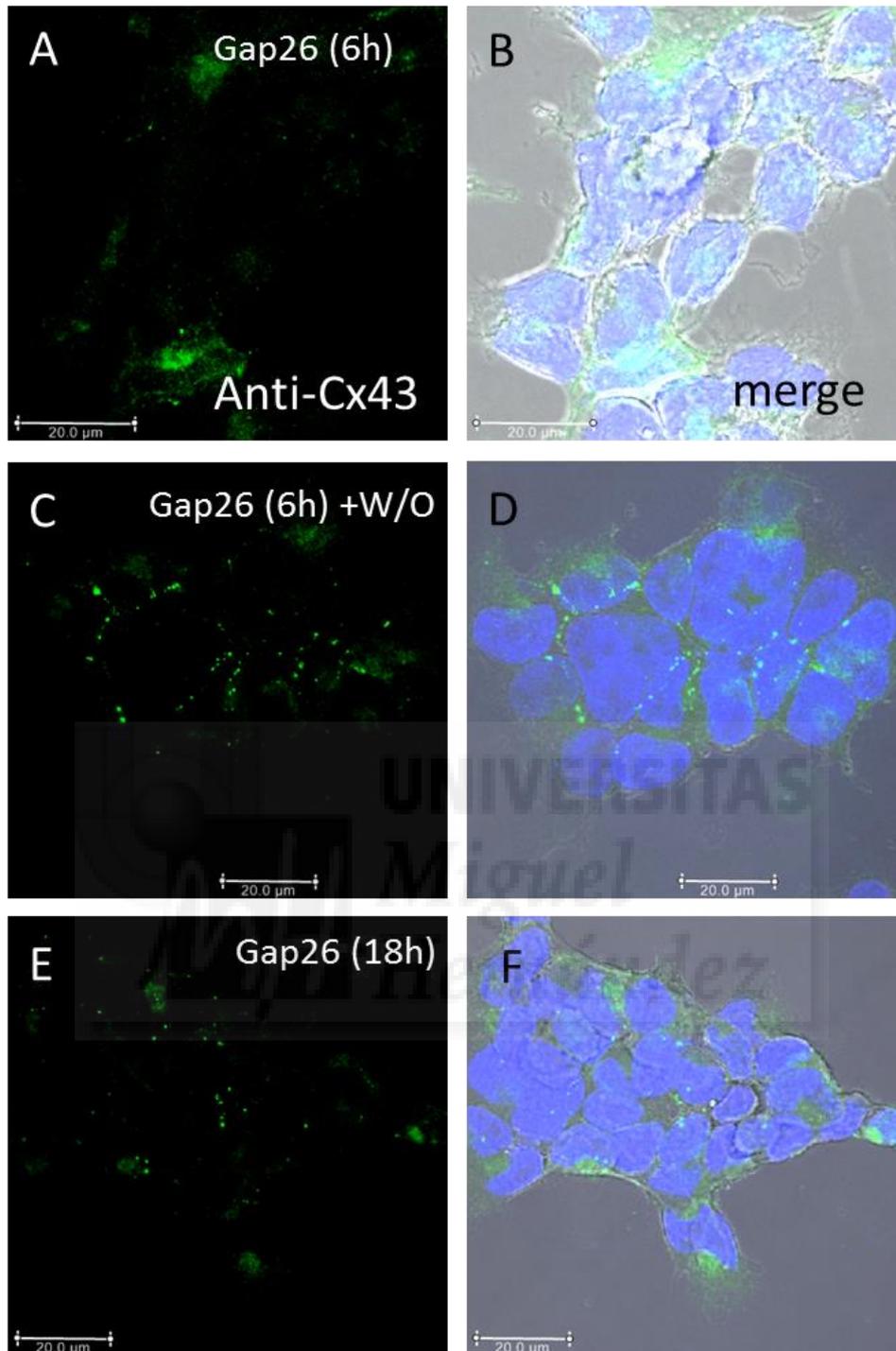
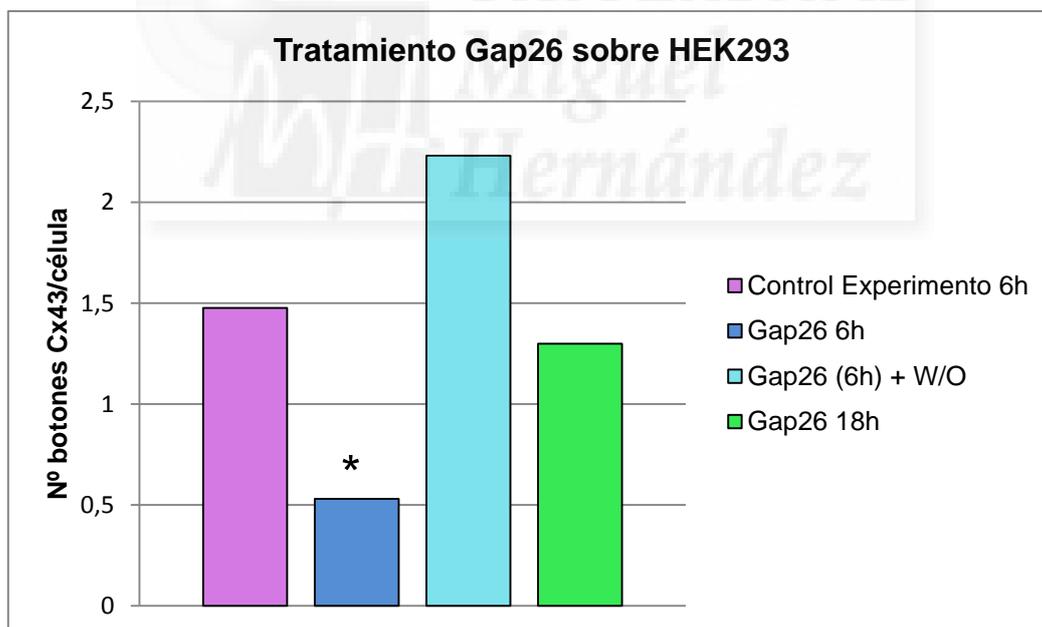


Figura 8: En A y B fotomicrografía confocal control de células HEK293 con Gap26 durante 6 horas. En C y D, fotomicrografía confocal de células HEK293 tratadas con Gap26 durante 6 horas más lavado hasta el día siguiente. En E y F, fotomicrografía confocal de células HEK293 tratadas con Gap26 durante 18 horas.

| | Control 6 h | | Gap26 6h | | Gap26 6h + W/O | | Gap26 18h | |
|---------------------|------------------------|--------------------|------------------------|--------------------|------------------------|--------------------|------------------------|--------------------|
| # medida | nº cx | nº células en foto |
| 1 | 20 | 11 | 8 | 16 | 31 | 21 | 48 | 30 |
| 2 | 30 | 11 | 16 | 17 | 82 | 29 | 57 | 37 |
| 3 | 14 | 13 | 6 | 21 | 42 | 21 | 46 | 35 |
| 4 | 45 | 37 | 5 | 12 | 48 | 20 | 85 | 80 |
| 5 | 49 | 35 | - | - | - | - | 12 | 9 |
| Media | 31,6 | 21,4 | 8,7 | 16,5 | 50,7 | 22,8 | 49,6 | 38,2 |
| Des. Estand. | 15,2 | 13,4 | 4,9 | 3,7 | 21,9 | 4,19 | 26,2 | 25,9 |
| | 1,5 Cx43/célula | | 0,5 Cx43/célula | | 2,2 Cx43/célula | | 1,3 Cx43/célula | |

Por lo tanto, nos encontramos que la aplicación de péptido bloqueante del flujo de moléculas a través del canal de Cx43 produjo también una disminución en la detección de placas Cx43 positivas. Una vez suprimidas estas condiciones de estrés mediante el lavado, las células HEK293 experimentan un incremento en la expresión de Cx43 (ver discusión).



Los datos obtenidos se analizaron estadísticamente mediante un test de varianza y, en caso de fallar este, mediante el Mann-Whitney test (comparación de medianas) (ver Materiales y métodos: Imágenes y análisis de datos). Se confirmó que los resultados del grupo de muestras de Gap26 6 horas era independiente de todos los demás grupos, mientras que los grupos de control, el Gap26 w/o y el Gap26 18 horas no tenían la diferencia significativa estadística para rechazar la posibilidad de que las diferencia se debiese únicamente a variabilidad de las muestras.

4.2.2. Validación de la toxicidad de Gap26

Paralelamente se llevó a cabo el conteo de células de las placas anteriormente citadas con el fin de tener un control sobre la supervivencia y proliferación celular. Se quería observar el efecto causado a nivel de toxicidad por el tratamiento con Gap26 sobre las células HEK293.

| Nº pocillo | Nombre pocillo | Nº células totales | Nº células muertas | % Viabilidad |
|------------|-------------------|--------------------|--------------------|--------------|
| 2 | Gap26 6h | 15000 | 500 | 96% |
| 4 | Control 6h HEK293 | 16250 | 500 | 93% |
| 6 | Gap26 6 h+ W/O | 22625 | 1250 | 97% |
| 8 | Gap26 18h | 25250 | 1750 | 93% |

Podemos observar que el Gap26 no afecta a la viabilidad celular dado que tanto la muestra de células control como las que estuvieron en presencia de Gap26 tienen un porcentaje de viabilidad similar.

4.3. Efecto del morfógeno FGF8 sobre la expresión de Cx43 de las células HEK293

En este experimento se quiso comprobar el efecto del FGF8 disuelto en el medio de cultivo tiene sobre la expresión de Cx43 en el tiempo.

Para ello se recogió, tras 24 horas de crecimiento celular, el medio de cultivo de la línea celular HEK293 transfectada con FGF8-GFP (Clon 19) y expresa y secreta al medio extracelular, de manera constitutiva, FGF8-GFP. Se sustituyó el medio de cultivo de las HEK293 donantes por el de las Clon19 y se mantuvieron en este medio FGF8 enriquecido durante 18, 24 y 48 horas. Tras pasar este periodo de incubación se realizó una inmunofluorescencia marcando la Cx43 y, posteriormente, se realizaron fotografías en el microscopio confocal a 40x. Estas fotografías se utilizaron para hacer el recuento de Cx43 (ver figura 9 y 10).

Se observó que en las muestras de HEK293 de 18 horas tratadas con FGF8 tenían un mayor número de células con placas Cx43 positivas que su control. Además, se encontró un pico de número de botones de conexina por célula a este tiempo. Para las células incubadas con FGF8 durante 24 horas el número de botones de conexina es mayor que la del control de 24 horas. Las muestras tratadas con FGF8 durante 48 horas tienen un número de botones similar a su control.

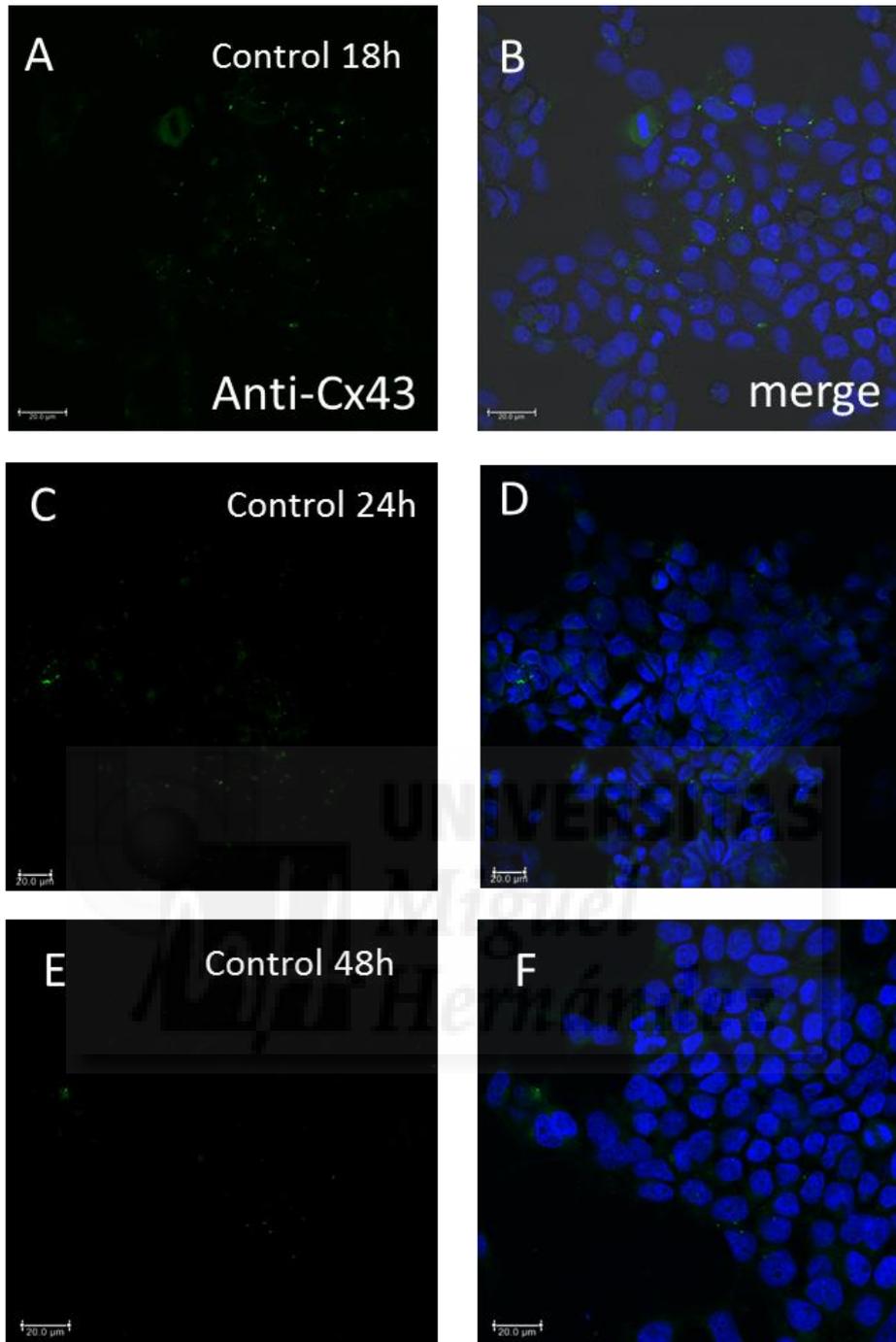


Figura 9: En A y B fotomicrografía confocal control de células HEK293 a las 18 horas. En C y D, fotomicrografía confocal control de células HEK293 a las 24 horas. En E y F, fotomicrografía confocal control de células HEK293 a las 48 horas.

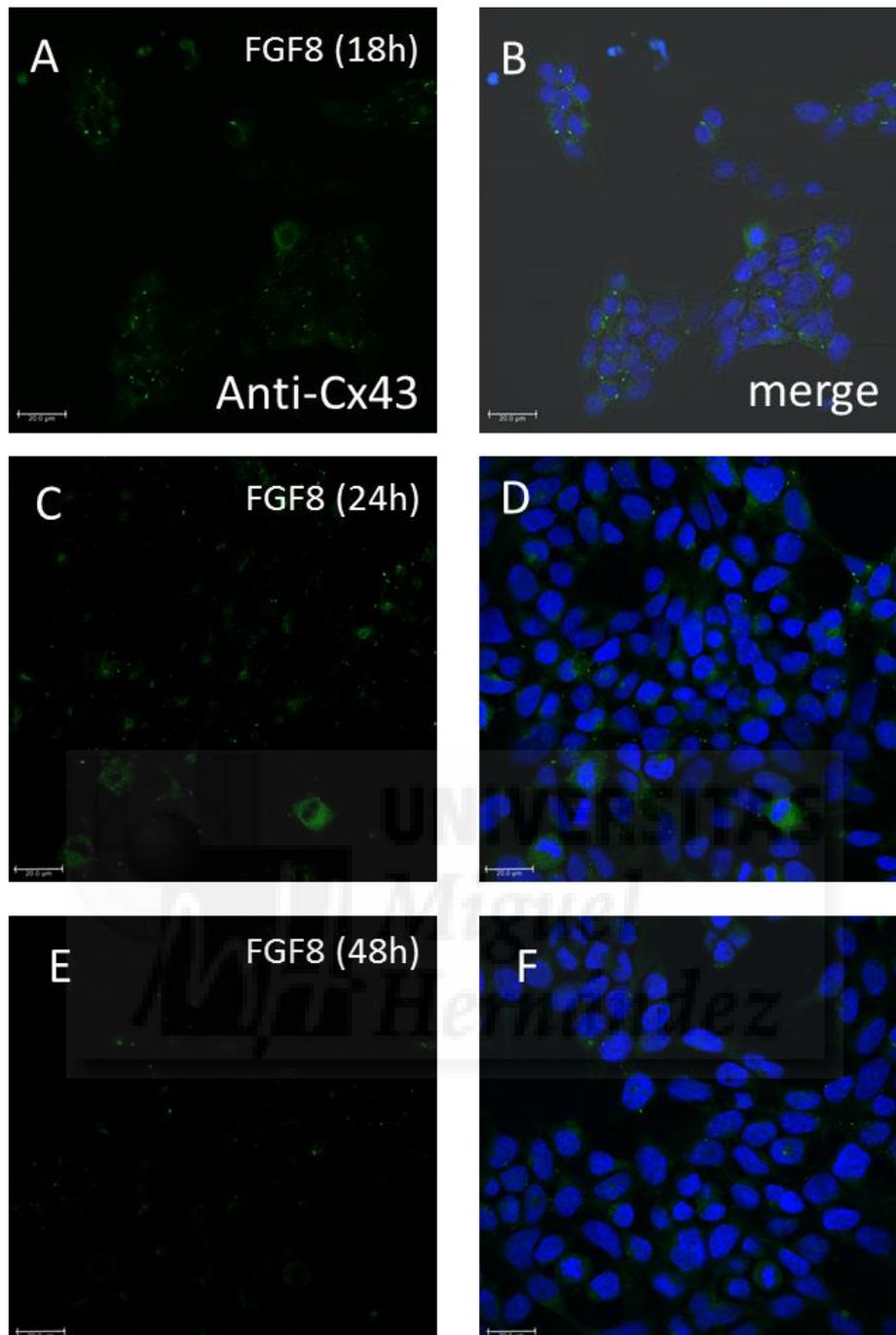
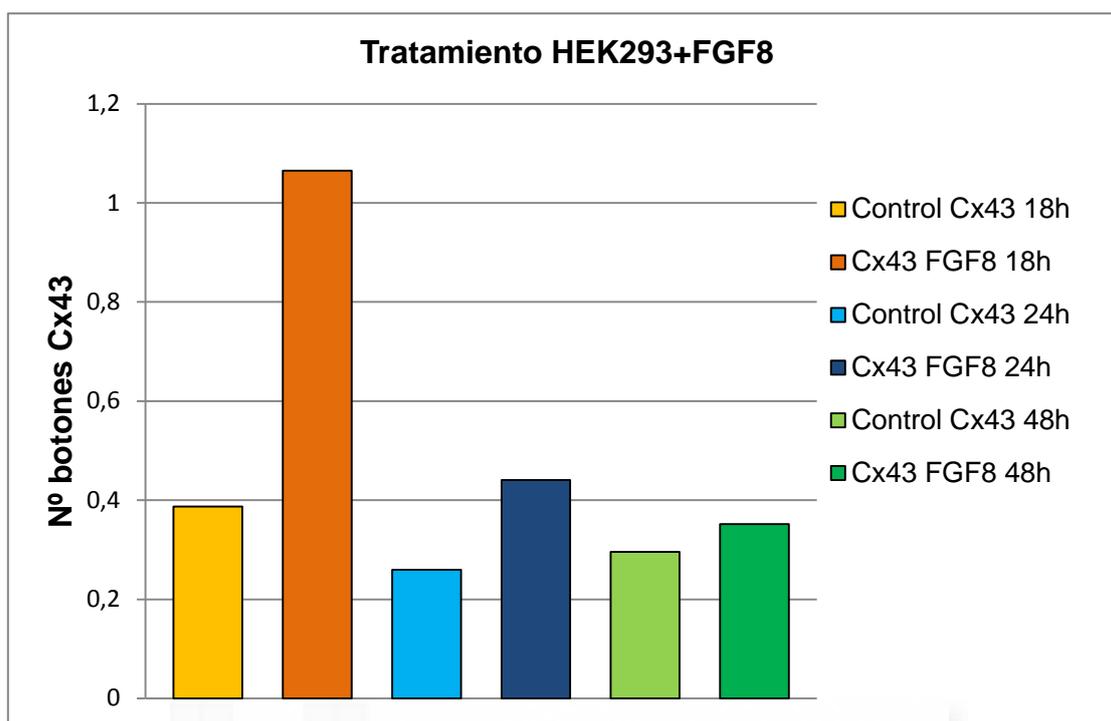


Figura 10: En A y B fotomicrografía confocal control de células HEK293 con FGF8 durante 18 horas. En C y D, fotomicrografía confocal de células HEK293 tratadas con FGF8 durante 24 horas. En E y F, fotomicrografía confocal de células HEK293 tratadas con FGF8 durante 48 horas.

| Cx43 FGF8 18h | | | Control Cx43 18h | |
|-------------------------|-------|--------------------|-------------------------|--------------------|
| # medida | nº cx | nº células en foto | nº cx | nº células en foto |
| 1 | 13 | 20 | 27 | 60 |
| 2 | 27 | 41 | 18 | 49 |
| 3 | 52 | 47 | 26 | 47 |
| 4 | 63 | 66 | 31 | 120 |
| 5 | 76 | 64 | 20 | 50 |
| 6 | 48 | 24 | 57 | 136 |
| Media | 46,5 | 43,7 | 29,8 | 77,0 |
| Des. Estand. | 23,1 | 19,4 | 14,1 | 40,1 |
| 1,06 Cx43/célula | | | 0,38 Cx43/célula | |

| Cx43 FGF8 24h | | | Control Cx43 24h | |
|-------------------------|-------|--------------------|-------------------------|--------------------|
| # medida | nº cx | nº células en foto | nº cx | nº células en foto |
| 1 | 32 | 60 | 34 | 101 |
| 2 | 40 | 85 | 54 | 200 |
| 3 | 49 | 129 | 26 | 130 |
| 4 | 40 | 200 | 36 | 150 |
| 5 | | | 16 | 74 |
| 6 | | | 43 | 150 |
| Media | 40,3 | 118,5 | 33,2 | 131,0 |
| Des. Estand. | 6,9 | 61,36 | 13,2 | 43,8 |
| 0,34 Cx43/célula | | | 0,25 Cx43/célula | |

| Cx43 FGF8 48h | | | Control Cx43 48 h | |
|------------------------|-------|--------------------|------------------------|--------------------|
| # medida | nº cx | nº células en foto | nº cx | nº células en foto |
| 1 | 20 | 87 | 58 | 63 |
| 2 | 23 | 96 | 20 | 100 |
| 3 | 30 | 94 | 14 | 90 |
| 4 | 43 | 93 | 20 | 62 |
| 5 | 32 | 93 | 9 | 60 |
| 6 | 22 | 91 | 12 | 89 |
| Media | 28,3 | 80,5 | 22,16 | 75 |
| Des. Estand. | 8,5 | 28,82 | 19,44 | 18,62 |
| 0,3 Cx43/célula | | | 0,3 Cx43/célula | |



Los datos obtenidos se analizaron estadísticamente mediante un test de comparación la varianza. Sin embargo, no fueron lo suficientemente heterogéneos (significativos) para aceptar la hipótesis de que las diferencias observadas no se deban únicamente a la aleatoriedad.

Por lo tanto, la adición de FGF8 en el medio de cultivo produce un aumento inicial en la producción de Cx43. Este aumento, a lo largo del tiempo, vuelve a disminuir hasta llegar a valores control (ver discusión).

4.4. Experimento piloto con Clon19: Número y comportamiento celular

Como hemos comentado en materiales y métodos, Clon19 son células HEK293 transfectadas permanentemente con el morfógeno FGF8 que, además de expresarlo constitutivamente, es secretado al medio extracelular. Lo que hemos podido analizar durante la última fase de mi TFG fue el crecimiento de esta línea a distintos tiempos (0, 24 y 72 horas) con el fin de poder analizar el efecto que tienen las Cx43 bajo expresión crónica de FGF8. Para ello se utilizó una placa de 12 pocillos y se realizaron 6 casos distintos en los que se tenía en cuenta el número de células por pocillo sembradas sobre cubreobjetos de vidrio y el sustrato utilizado para tratar los cubreobjetos con el fin de mejorar la adhesión celular, usando tanto poli-D-lisina (En figura 11 marcado con D) como poli-L-lisina (En imagen 10 marcado con L).

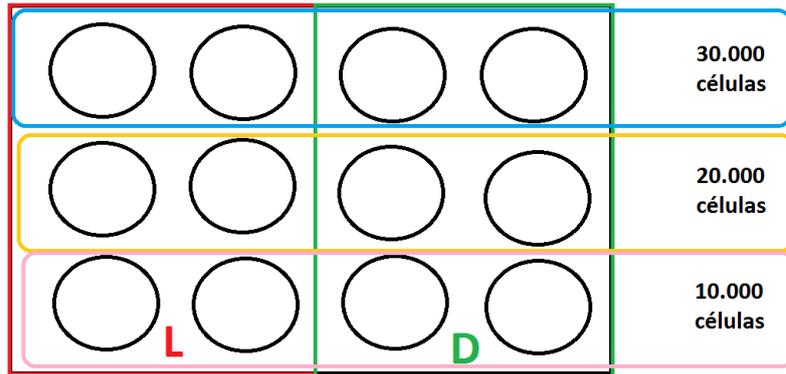


Figura 11: Esquema en el que se ilustra el experimento realizado para controlar el crecimiento de la línea Clon 19 bajo diferentes condiciones de concentración celular y sustrato de adhesión.

Se observó que, aparentemente, las células que crecieron con el sustrato de poli-L-lisina crecían mejor. Sin embargo, observamos que el crecimiento de esta línea celular se cambiaba drásticamente si el soporte era vidrio o sobre plástico. En el vidrio, el Clon19 no crece en monocapa sino que se forman grupo de células (como semi-esferas) que crecen unas sobre otras. Por otra parte, en plástico (en las botellas de cultivo), se observó que se adherían al plástico y emitían prolongaciones citoplasmáticas (ver figura 12). Se comprobó que las células habían crecido realizando un conteo a las 72 horas.

Dado que las células se comportaban de diferente manera que nuestra HEK293 crecida en vidrio y, viendo que la fecha de entrega del trabajo se terminaba, decidí posponer para una futura estancia de prácticas retomar y terminar este trabajo.

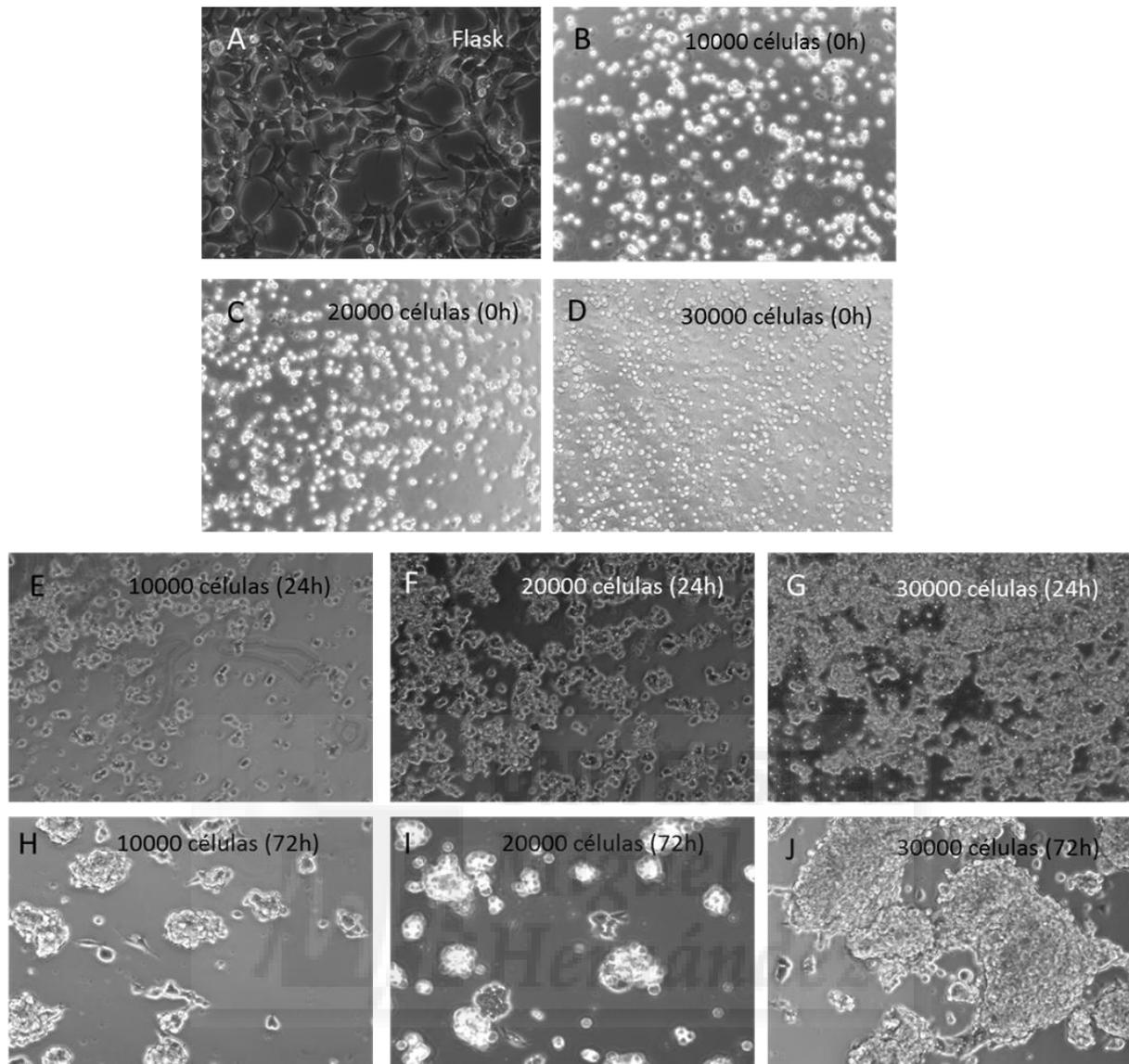


Figura 12: Fotomicrografías de células Clon19 creciendo sobre plástico (A). Fotomicrografías de células Clon19 sembradas sobre vidrio y con sustrato de poli-L-lisina a las 0 horas de 10000 (B), 20000 (C) y 30000 células (D). Fotomicrografías de células Clon19 creciendo sobre vidrio y con sustrato de poli-L-lisina a las 24 horas de 10000 (E), 20000 (F) y 30000 células (G). Fotomicrografías de células Clon19 creciendo sobre vidrio y con sustrato de poli-L-lisina a las 72 horas de 10000 (H), 20000 (I) y 30000 células (J).

5. Discusión

En este TFG se estudió el efecto a distintos tiempos de dos moléculas de carácter proteico, el peptidomimético Gap26 y el FGF8, sobre el comportamiento y expresión de la Cx43 utilizando como modelo cultivos de la línea celular HEK293.

5.1. Efecto del peptidomimético Gap26 sobre Cx43 de células HEK293

Está comprobado que las conexinas son proteínas de vida media corta, de 1-5 horas [15,16] y en concreto la Cx43 una vida media de 1,3 horas [41]. Cuando cuantificamos el número de placas Cx43 positivas obtenidos para los experimentos de células HEK293 tratadas con Gap26 durante 6 horas, se observó una disminución significativa con respecto al control. Por otra parte, cuando analizamos este tipo de experimentos tras la incubación de Gap26 durante 18 horas, el número de botones de Cx43 fue similar al control. Una disminución similar de expresión de Cx43 ha sido descrita en cultivos de astrocitos [42]. En nuestras muestras con 6 horas de incubación podría ser debida a una ralentización del proceso de “turnover” o reciclaje de la Cx43 cuando se encuentran en presencia de un péptido bloqueante del canal ya que las conexinas intervienen en su regulación de manera autosómica. Este bloqueante no parece ser 100% efectivo ya que a las 18 horas las muestras mostraban una cantidad similar al control. Una hipótesis que podríamos barajar es que se pueda producir un pequeño periodo de toxicación-detoxicación en el que nuestro peptidomimético se hace semitóxico a la célula. Sin embargo, la viabilidad durante este periodo corto de exposición al bloqueante no produjo muerte alguna en las células. Otra posibilidad podría ser que a lo largo del tiempo el Gap26 pierda su funcionalidad/efectividad o que se inicie un proceso degradativo del péptido en cuestión.

En el caso de las muestras de cultivos de HEK293 que tras estar 6 horas en presencia de Gap26 se lavaron con medio de cultivo fresco tras realizar la inmunohistoquímica con fluorescencia se contaron más botones de Cx43 que en la muestra control. Dado que en presencia de péptido las Gap junctions formadas por Cx43 están bloqueados, la célula podría recurrir a otras formas de comunicación intercelular para recobrar el estado basal de comunicación y funcionamiento, tal y como se observa a las 18 horas. Una estrategia posible de la célula sería la regulación a la alta de otras conexinas presentes en las células GEK203 como la Cx36. La expresión de Cx36 fue observada en la línea HEK293 por Iván González Hermoso, un estudiante de TFG del Grado en Farmacia de la UMH, por lo que en el caso de las células HEK293 tratadas durante 6 horas con Gap26 a las que se realizó un lavado, la Cx36 aumentaría su actividad-producción apoyando la inducción de la Cx43 que, aunque más lenta, pudiera llegar hasta llegar a niveles similares.

Por último, se confirmó mediante un contaje de viabilidad celular que, a pesar del bloqueo de Cx43 no existe muerte celular por una posible apoptosis debida al bloqueo de la comunicación intercelular. Dado que esta comunicación es esencial para el correcto funcionamiento celular, otras conexinas podrían estar regulando este proceso y compensando la falta de función parcial de la Cx43.

5.2. Efecto del morfógeno FGF8 sobre la expresión de Cx43 de las células HEK293

Un segundo tipo de experimentación que he podido realizar bajo la tutorización de Diego Echevarria ha sido trabajar con el morfógeno factor de crecimiento fibroblástico 8 o FGF8. Para ello crecí y mantuve una colonia especial de HEK293 transfectadas permanentemente con esta molécula, que además se secreta al medio extracelular. Utilizamos el medio de cultivo de estas células tras 24-36 horas de incubación en una cantidad límite de medio de cultivo y la sustituimos por el medio de una HEK293 normales a diferentes tiempos de incubación 18, 24 y 48 horas.

Analizando los resultados obtenidos en el experimento cuando tratábamos con FGF8 disuelto en medio de cultivo a las células HEK293 descubrimos que existe una relación de regulación entre el FGF8 y la Cx43. Tras la incubación de FGF8 durante 18 horas este morfógeno inducía una mayor expresión de botones de Cx43 positivos en las células. El efecto observado era más notable a tiempos de 18 horas que a 24 y 48. Una posible explicación de esta disminución paulatina puede ser debida al consumo y degradación de esta molécula. FGF8 como morfógeno debe unirse a receptores afines que se encuentran en la membrana plasmática. Tras esta unión, se activan una serie de cascadas intracelulares e inmediatamente la proteína se endocita y se degrada. El aporte de FGF8 que le damos a la célula es externo y finito, por tanto, la concentración a lo largo del tiempo disminuye y también podría hacerlo la expresión de Cx43. También, aunque no demostrado, se podría producir una degradación en la vida útil de este morfógeno o una posible degradación. El análisis estadístico, sin embargo, no encuentra significativas estas diferencias, por lo que quizás fuese un proceso aleatorio. No obstante, hemos estudiado la exposición de este morfógeno a 18 horas y quizás hubiera sido más oportuno realizarlo a 6 y 12 horas para observar una significación.

6. Conclusión y proyección futura

En este trabajo experimental hemos analizado el efecto modulante de la expresión de Cx43 de dos moléculas de carácter proteico, el Gap26 y el FGF8, sobre un modelo de cultivo de una línea celular de células humanas de riñón (Línea HEK293) con las que están trabajando el laboratorio del Dr. Diego Echevarría Aza del Instituto de Neurociencias de la Universidad Miguel Hernández de Elche.

1. El bloqueo de los canales de las Gap junctions por el tratamiento con Gap26 en células HEK293 ejerce un efecto de ralentización del proceso de reciclaje o renovación de la Cx43, produciendo una disminución significativa de la expresión de esta conexina durante las primeras 6 horas, efecto que se pierde con el tiempo (tiempo máximo de exposición 18 horas).
2. El bloqueo de Gap26 no produce muerte en las células HEK293
3. FGF8 induce un aumento de la expresión de Cx43 en células HEK293 tras la exposición durante 18 horas. Sin embargo, este efecto se pierde gradualmente conforme aumenta el tiempo de incubación.

Las perspectivas de futuro de este trabajo son las siguientes. En este TFG he utilizado un modelo de línea celular con el fin de utilizar un método experimental que cumpla el principio de las 3 Rs en la a experimentación animal (Reemplazo, Reducción, Refinamiento). Sin embargo, es necesario trasladar estos experimentos al animal vertebrado y, más particularmente, al efecto que produce en el cerebro. Para ello, la embriología experimental en embriones de ratón o pollo se hacen necesarias. Espero poder participar en el futuro en dicho proyecto.

7. Bibliografía

1. Neitzel J, Rasband M; 2014. Cell Communication. *Scitable by Nature Education*. Disponible en: <https://www.nature.com/scitable/topic/cell-communication-14122659>
2. Lodish H, Berk A, Zipursky SL, et al. Molecular Cell Biology. 4th edition. New York: W. H. Freeman; 2000. Section 20.1, *Overview of Extracellular Signaling*. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21517/>
3. University of Kent. Study Guide- Cellular Communication, Types of signals. Disponible en: <https://moodle.kent.ac.uk/external/mod/book/view.php?id=2396&chapterid=78>
4. Gilbert SF. *Developmental Biology*. 6th edition. Sunderland (MA): Sinauer Associates; 2000. Juxtacrine Signaling. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK10072/>
5. Bosone C., Andreu A., Echevarria D. 2016. GAP junctional communication in brain secondary organizers. *Development. Growth Differentiation*. 58(5), pp.446-455.
6. Suzhi, Z., Liang, T., Yuexia, P., Lucy, L., Xiaoting, H., Yuan, Z. & Qin, W. 2015. Gap Junctions Enhance the Antiproliferative Effect of MicroRNA-124-3p in Glioblastoma Cells. *J. Cell. Physiol.* 230, pp.2476–2488.
7. Sotelo, C. and Palay, S. 1970. The fine structure of the lateral vestibular nucleus in the rat. II. synaptic organization. *Brain Research*, 18(1), pp.93-115.
8. Grosely R. and Sorgen P. L. 2013. A History of Gap Junction Structure: Hexagonal Arrays to Atomic Resolution. *Cell Communication & Adhesion*. 20(1-2), pp.11-20.
9. Goodenough D. A. and Paul D. L. 2009. Gap Junctions. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 1 (1), pp.a002575-a002576.
10. Abascal F., Zardoya R. 2013. Evolutionary analyses of gap junction families. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)- Biomembranes*, 1828(1), pp. 4-14.
11. Barrio L. C. y González-Nieto D. 2012. Conectados por conexinas: Comunicación intercelular mediada por canales de conexinas y enfermedades asociadas a mutaciones en los genes de conexina. *The Spanish Ion Channel Initiative*. Disponible en: <http://sici.umh.es/MAYO%202012%20Luis%20Carlos%20Barrio.pdf>
12. Beyer E. and Berthoud V. 2017. Gap junction structure: unraveled, but not fully revealed. *F1000Research*, 6, p568.
13. Segretain D. and Falk M. 2004. Regulation of connexin biosynthesis, assembly, gap junction formation, and removal. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)- Biomembranes*, 1662(1-2), pp.3-21
14. Dere, E. 2013. *Gap junctions in the brain*. 1st ed. Amsterdam: Academic Press.
15. Solan J. and Lampe P. 2009. Connexin43 phosphorylation: structural changes and biological effects. *Biochemical Journal*, 419(2), pp.261-272
16. Laird, D., Puranam, K. and Revel, J. 1991. Turnover and phosphorylation dynamics of connexin43 gap junction protein in cultured cardiac myocytes. *Biochemical Journal*, 273(1), pp.67-72.

17. Xie, H., Laird, D., Chang, T. and Hu, V. 1997. A Mitosis-specific Phosphorylation of the Gap Junction Protein Connexin43 in Human Vascular Cells: Biochemical Characterization and Localization. *The Journal of Cell Biology*, 137(1), pp.203-210.
18. Boassa, D., Solan, J., Papas, A., Thornton, P., Lampe, P. and Sosinsky, G. 2010. Trafficking and Recycling of the Connexin43 Gap Junction Protein during Mitosis. *Traffic*, 11(11), pp.1471-1486.
19. Kar R., Batra N., Riquelme M. and Jiang J. 2012. Biological role of connexin intercellular channels and hemichannels. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 524(1). Pp.2-15.
20. Hussain, D. 2014. *Connexins: The Gap Junction Proteins*. 1st ed. New Delhi: Springer India.
21. Parthasarathi, K., Ichimura, H., Monma, E., Lindert, J., Quadri, S., Issekutz, A. and Bhattacharya, J. 2006. Connexin 43 mediates spread of Ca²⁺-dependent proinflammatory responses in lung capillaries. *Journal of Clinical Investigation*, 116(9), pp.2562-2562.
22. Sarriddine, M., Scheckenbach, K., Foglia, B., Maass, K., Garcia, I., Kwak, B. and Chanson, M. 2009. Connexin43 modulates neutrophil recruitment to the lung. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 13(11-12), pp.4560-4570.
23. Rouach, N., Avignone, E., Mème, W., Koulakoff, A., Venance, L., Blomstrand, F. and Giaume, C. 2002. Gap junctions and connexin expression in the normal and pathological central nervous system. *Biology of the Cell*, 94(7-8), pp.457-475.
24. Rash, J., Staines, W., Yasumura, T., Patel, D., Furman, C., Stelmack, G. and Nagy, J. 2000. Immunogold evidence that neuronal gap junctions in adult rat brain and spinal cord contain connexin-36 but not connexin-32 or connexin-43. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(13), pp.7573-7578.
25. Nielsen, B., Hansen, D., Ransom, B., Nielsen, M. and MacAulay, N. 2017. Connexin Hemichannels in Astrocytes: An Assessment of Controversies Regarding Their Functional Characteristics. *Neurochemical Research*.
26. Pfenniger, A., Wohlwend, A. and Kwak, B. 2010. Mutations in connexin genes and disease. *European Journal of Clinical Investigation*, 41(1), pp.103-116.
27. Shao, Q., Liu, Q., Lorentz, R., Gong, X., Bai, D., Shaw, G. and Laird, D. 2012. Structure and functional studies of N-terminal Cx43 mutants linked to oculodentodigital dysplasia. *Molecular Biology of the Cell*, 23(17), pp.3312-3321.
28. Kelsell, D., Di, W. and Houseman, M. 2001. Connexin Mutations in Skin Disease and Hearing Loss. *The American Journal of Human Genetics*, 68(3), pp.559-568.
29. Paznekas, W., Boyadjiev, S., Shapiro, R., Daniels, O., Wollnik, B., Keegan, C., Innis, J., Dinulos, M., Christian, C., Hannibal, M. and Jabs, E. 2003. Connexin 43 (GJA1) Mutations Cause the Pleiotropic Phenotype of Oculodentodigital Dysplasia. *The American Journal of Human Genetics*, 72(2), pp.408-418.
30. Reuss, B., Dermietzel, R. and Unsicker, K. 1998. Fibroblast growth factor 2 (FGF-2) differentially regulates connexin (cx) 43 expression and function in astroglial cells from distinct brain regions. *Glia*, 22(1), pp.19-30.

31. Martínez, S. 2011. *Mecanismos generales del control molecular de la formación de las regiones del cerebro durante el desarrollo.* [online] Revista.isciii.es. Disponible en: <http://revista.isciii.es/index.php/ecemc/article/view/719/772>.
32. Puelles López, L., Martínez Pérez, S. and Martínez de la Torre, M. 2008. *Neuroanatomía*. 1st ed. Madrid: Editorial Médica Panamericana.
33. Martínez, S., Puelles, E., Puelles, L. & Echevarria, D. 2012. Molecular regionalization of the developing neural tube. *The Mouse Nervous System* (ed. C. Watson, G. Paxinos & L. Puelles) Academic Press, UK.
34. Echevarria, D., Martínez, S., Marques, S., Lucas-Teixeira, V. and Belo, J. (2005). Mkp3 is a negative feedback modulator of Fgf8 signaling in the mammalian isthmic organizer. *Developmental Biology*, 277(1), pp.114-128.
35. Biosyn.com. 2017. *Peptide Mimetics*. [online] Disponible en: <http://www.biosyn.com/tew/peptide-mimetics.aspx>.
36. Desplantez, T., Verma, V., Leybaert, L., Evans, W. and Weingart, R. 2012. Gap26, a connexin mimetic peptide, inhibits currents carried by connexin43 hemichannels and gap junction channels. *Pharmacological Research*, 65(5), pp.546-552.
37. Glass, B., Hu, R., Phillips, A. and Becker, D. 2015. The action of mimetic peptides on connexins protects fibroblasts from the negative effects of ischemia reperfusion. *Biology Open*, 4(11), pp.1473-1480.
38. Braet, K. (2003). Photoliberating inositol-1,4,5-trisphosphate triggers ATP release that is blocked by the connexin mimetic peptide gap 26. *Cell Calcium*, 33(1), pp.37-48.
39. Verma, V., Hallett, M., Leybaert, L., Martin, P. and Howard Evans, W. (2009). Perturbing plasma membrane hemichannels attenuates calcium signalling in cardiac cells and HeLa cells expressing connexins. *European Journal of Cell Biology*, 88(2), pp.79-90.
40. Apexbt.com. 2017. *Gap 26|Gap junction blocker peptide, mapping to connexin 43 residue 63-75|CAS# 197250-15-0*. [online] Disponible en: <http://www.apexbt.com/gap-26.html>.
41. De Vuyst, E., Boengler, K., Antoons, G., Sipido, K., Schulz, R. and Leybaert, L. 2011. Pharmacological modulation of connexin-formed channels in cardiac pathophysiology. *British Journal of Pharmacology*, 163(3), pp.469-483.
42. Li, X., Zhao, H., Tan, X., Kostrzewa, R., Du, G., Chen, Y., Zhu, J., Miao, Z., Yu, H., Kong, J. and Xu, X. 2015. Inhibition of connexin43 improves functional recovery after ischemic brain injury in neonatal rats. *Glia*, 63(9), pp.1553-1567.