



**Universitat de les
Illes Balears**

Facultad de Ciencias

Memoria del Trabajo de Fin de Grado

**Caracterización metabólica del modelo celular
de “Endothelial to Mesenchymal Transition”
generado por depleción de la proteína PATJ**

Karen Daiana Schöninger Almaraz

Grado de Biología

Año académico 2019-20

Trabajo tutelado por Cristòfol Vives Bauzá
Departamento de Biología

Se autoriza a la Universidad a incluir este trabajo en el Repositorio Institucional para su consulta en acceso abierto y difusión en línea, con fines exclusivamente académicas y de investigación.	Autor		Tutor	
	Sí	No	Sí	No
	X		X	

Palabras clave del trabajo:
Ictus, PATJ, EndMT, Rotenona, Oligomicina

Agradecimientos

Quiero agradecer a mi tutor por haberme ayudado y guiado en la realización de este trabajo.

A Laura, Aina y Neus del equipo de investigación de Son Espases por la paciencia y haberme ayudado en tareas de laboratorio.

A José Jurado por resolver mis dudas en referencia a cuestiones de estadística.

A mi familia, pareja y amigas, y principalmente a Pamela, por estar siempre ahí y mostrarme vuestro apoyo incondicional.

índice

1. Resumen.....	2
2. Introducción.....	3
2.1. PATJ.....	3
2.2. EndMT (“Endothelial to Mesenchymal Transition”).....	4
2.3. Relación de PATJ y EndMT con el ictus.....	5
2.4. Objetivo.....	7
3. Materiales y métodos.....	8
3.1. Línea celular.....	8
3.2. Cultivo celular.....	8
3.3. Subcultivo de células en placas de 24 pocillos.....	9
3.4. Diseño del experimento.....	9
3.5. Ensayo de viabilidad celular mediante inhibidores del sistema de fosforilación oxidativa.....	10
3.6. Análisis estadístico.....	11
4. Resultados.....	11
5. Discusión.....	14
6. Conclusiones.....	16
7. Bibliografía.....	17

1. Resumen

El ictus es una de las enfermedades cerebrovasculares más frecuentes, que además, supone la segunda causa de muerte a nivel mundial. Según la Sociedad Española de Neurología, en España se detectan cada año 120000 casos nuevos de ictus, de los cuales el 50% quedan con secuelas o mueren. Esto supone entre el 3% y el 6% del coste sanitario total en España. Por ello es necesario investigar proteínas que estén relacionadas con el pronóstico funcional del ictus, como la proteína PATJ. Se han generado células hCMEC/D3 con depleción del gen PATJ, las cuales hacen el proceso "Endothelial to Mesenchymal Transition" (EndMT), el cual se relaciona con la angiogénesis que se activa justo después de sufrir un ictus. El objetivo de este trabajo fue estudiar la existencia de diferencias metabólicas entre células de genotipo normal y células con el gen PATJ deplecionado que hacen el proceso EndMT. Para ello se ha hecho un ensayo de viabilidad celular en células hCMEC/D3 de genotipo salvaje, con el gen PATJ sobre expresado y con el gen PATJ sobre expresado, con cuatro tratamientos diferentes: medio de cultivo EBM-2 completo, medio de cultivo completo y Rotenona, medio de cultivo completo y Oligomicina y medio de cultivo incompleto. Se observaron diferencias significativas entre células de genotipo normal y células que llevan a cabo el proceso EndMT en medio de cultivo completo y en medio de cultivo con Oligomicina. Se concluye en que existen diferencias metabólicas entre las células de genotipo normal y células que llevan a cabo el proceso EndMT en medio de cultivo completo. Además, los resultados sugieren la posibilidad de que, tanto las células de genotipo normal como células que hacen el proceso EndMT, desarrollan cambios metabólicos cuando se exponen a Rotenona y Oligomicina.

2. Introducción

Las enfermedades cerebrovasculares suponen la segunda causa de muerte y la tercera causa de discapacidad a nivel mundial (Johnson *et al.*, 2016). El ictus es el accidente cerebrovascular más común, y se puede producir por el bloqueo de un vaso sanguíneo en el cuello o en el cerebro. Esto ocurre como consecuencia de una trombosis, de una embolia o de una estenosis (Randolph, 2016).

Actualmente no existen fármacos para prevenir ni para evitar las consecuencias del ictus. Según la sociedad española de Neurología (SEN), en España se detectan cada año 120000 nuevos casos de ictus, de los cuales el 50% queda con secuelas o mueren. Además, supone un 70% de los ingresos hospitalarios por causas neurológicas y entre el 3 y el 6% del coste sanitario total en España.

El coste total promedio de un paciente que ha sufrido un ictus es de 27711€ al año, de los cuales el 67% corresponde a costes directos no sanitarios, 31% a costes directos sanitarios y el 2% a costes indirectos (SEN). Con ello, el coste anual de los nuevos casos de ictus supone 1989 millones de euros en España. Cabe decir que gran parte de estos gastos son asumidos por los familiares de los pacientes y que solo aproximadamente el 10% de ellos recibe ayudas económicas.

Hoy en día, la escala de accidentes cardiovasculares de los Institutos Nacionales de Salud ("The National Institutes of Health Stroke Scale" o NIHSS) es la que se usa con más frecuencia para dictar el pronóstico funcional de un ictus. Esta escala se basa en un sistema por puntos y se correlaciona con el tamaño del infarto, la gravedad clínica y el resultado que se espera a largo plazo. Sin embargo, no todas las causas que provocan un accidente cerebrovascular, como náuseas, vómitos, disminución de la agudeza visual, dolor de cabeza o ataxia troncal, se ven reflejados en la escala NIHSS (Martin-Schild *et al.*, 2010).

Al tratarse de un problema grave de salud y del gran coste socioeconómico que suponen las personas que padecen secuelas, es importante el estudio de proteínas implicadas en el ictus para procurar terapias que ayuden a una mejor recuperación de los pacientes.

2.1. PATJ

Estudios recientes han relacionado el gen PATJ con el pronóstico funcional del ictus (Mola-Caminal *et al.*, 2019). Este gen, también conocido como INADL ("inactivation no after potential D-like"), codifica para una proteína con múltiples dominios PDZ, los cuales permiten la interacción entre proteínas transmembrana e intracelulares (Vaccaro *et al.*, 2001).

Esta proteína se localiza en uniones estancas y en la membrana apical de las células epiteliales. Se sabe que PATJ, proteína de polaridad conservada evolutivamente, es necesaria para procesos de migración direccional, en que las células se desplazan a través del tejido, y que se dan durante la curación de heridas (Shin *et al.*, 2007).

Para llevar a cabo su papel en la migración celular, PATJ regula la orientación del centro organizador de microtúbulos (MTOC) para dirigir la célula hacia el lugar de orientación (Palazzo *et al.*, 2001).

El grupo receptor ha modificado la expresión de PATJ en células humanas inmortalizadas derivadas de endotelio cerebral (hCEMC), con la finalidad de estudiar su función en el contexto del ictus isquémico. Así, han podido contrastar que células deplecionadas del gen PATJ activan el proceso celular “Endothelial to Mesenchymal Transition” (EndMT). La infra expresión del gen PATJ se produce con la incorporación de un RNA interferente pequeño (siRNA) mediante un lentivirus. Los siRNA se emparejan específicamente a secuencias de ARNm provocando la degradación del ARNm y bajando los niveles de expresión de las proteínas que iban a surgir de este ARNm. El lentivirus es uno de los vectores virales más usados actualmente porque posee relativamente baja inmunogenicidad, seguridad general y alta eficiencia de transfección (Pan M. *et al.*, 2015).

2.2. EndMT

EndMT es un mecanismo mediante el cual una célula endotelial sufre una serie de procesos de regulación génica que le provocan un cambio fenotípico que le llevan hacia célula mesenquimal, cosa que se facilita por la pérdida de uniones intercelulares, la pérdida de marcadores endoteliales, aumento de marcadores mesenquimales y la adquisición de propiedades invasivas y migratorias (Potenta *et al.*, 2008).

EndMT se observó por primera vez en la formación de válvulas cardíacas. Es un mecanismo necesario durante el desarrollo embrionario y la curación de heridas, pero también se sabe que está asociado a un amplio rango de situaciones patológicas como en la aterosclerosis, la hipertensión pulmonar y algunos tipos de fibrosis o el cáncer (Xiong *et al.*, 2018).

La familia TGF- β o BMP (proteína morfogenética) es la más importante para el proceso EndMT. Estas son ligandos que se unen al receptor tipo serina/ treonina/ quinasa de la superficie de las células endoteliales, a cuyo interior se transmite una señal que activa algunos factores de transcripción como SNAIL, Slug, Twist, Zeb1 y Zeb2, que finalmente activan el EndMT. Además, las proteínas TGF- β o BMP pueden iniciar el proceso EndMT de varias maneras, como, por ejemplo, metilando en exceso el promotor RASAL1, cosa que aumenta la actividad de Ras-GTP y finalmente activa el EndMT. Por el contrario, las vías MEK / ERK, I κ B α y bFGF pueden inhibir el EndMT inducido

por TGF. Otras vías no tan comunes son WNT / β catenina, PI3K / AKT / MTOR y MAPK / ERK (Hong *et al.*, 2018).

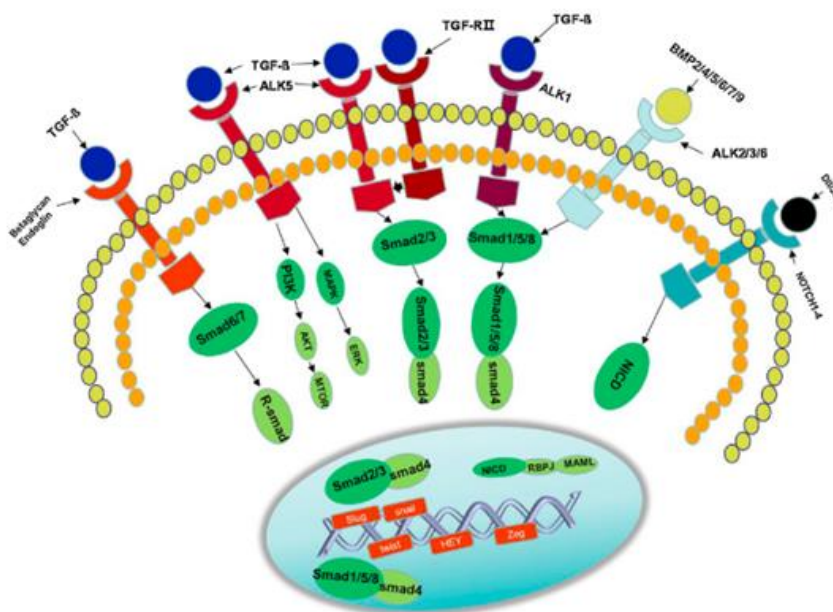


Figura 1. El proceso EndMT puede ser activado mediante varias vías. La señalización TGF/ BMP y NOTCH son las vías más importantes. La vía TGF/ BMP supone la fosforilación del receptor seguida de la unión de la proteína Smad (R- Smad). Los genes Smad entregan las señales necesarias al núcleo para regular la transcripción de los genes relacionados. En primer lugar, los ligandos TGF-beta se unen a sus ligandos TGF- beta, que son ALK5, ALK1, TGF-R II , Betaglycano, Endoglina y activa los receptores Smads (Smad1 / 2/3/5/6/7/8). A continuación, los receptores Smad2/3 se combinan con Smad4 para incorporarse en el núcleo y activan genes relacionados con el proceso EndMT. Las señales BMP2/4/5/6/7/9 se unen a sus receptores ALK2/3/6 y se activa por fosforilación a Smad1/5/8. Estos últimos se incorporan en el núcleo para activar genes relacionados con EndMT. El ligando de Notch (Dll y Jag) se une a sus receptores Notch1-4, estos se escinden y liberan NICD. Luego, la NICD ingresa al núcleo y se une con RBPJ u otra proteína para activar genes relacionados con EndMT. PI3K / AKT MAPK / ERK también participan en la regulación de EndMT (Hong *et al.*, 2018).

2.3. Relación de PATJ y EndMT con el ictus

Es importante conocer cómo funciona el proceso EndMT en relación con el gen PATJ en pacientes con diagnóstico de ictus para comprender mejor el pronóstico de estos pacientes y así poder proporcionarles un tratamiento adecuado y personalizado. Se sabe que el alelo de riesgo del polimorfismo de base única rs76221407 de PATJ se relaciona con un peor pronóstico del ictus (Mola-Caminal *et al.*, 2019).

Cuando se padece un ictus, en alguna zona del encéfalo hay una privación del flujo sanguíneo, que puede ser total o parcial, con lo que se produce una situación de hipoxia o anoxia. Esta situación provoca una activación de la angiogénesis. La angiogénesis es necesaria para formar nuevos vasos a partir de otros ya existentes en el tejido que ha resultado afectado y así aumentar la circulación sanguínea en la zona. Se sabe que el

proceso de angiogénesis se ve facilitado por la sobre expresión de algunas moléculas como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), el factor básico de crecimiento de fibroblastos (bFGF) o el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) (Rosell-Novel *et al.*, 2004). Estudios sugieren que la expresión del factor de transcripción Slug en células endoteliales promueve el proceso EndMT parcial durante la angiogénesis (Welch-Reardon *et al.*, 2014).

En cuanto al metabolismo de células que hacen el proceso EndMT, recientes estudios han demostrado que la inducción de EndMT mediante la señalización del factor de crecimiento transformante β (TGF β) se ve acompañada por la inhibición de la oxidación de los ácidos grasos (FAO) (Figura 2). La inhibición de la FAO potencia el proceso EndMT a través de la regulación de niveles intracelulares de acetil- CoA (Xiong *et al.*, 2018).

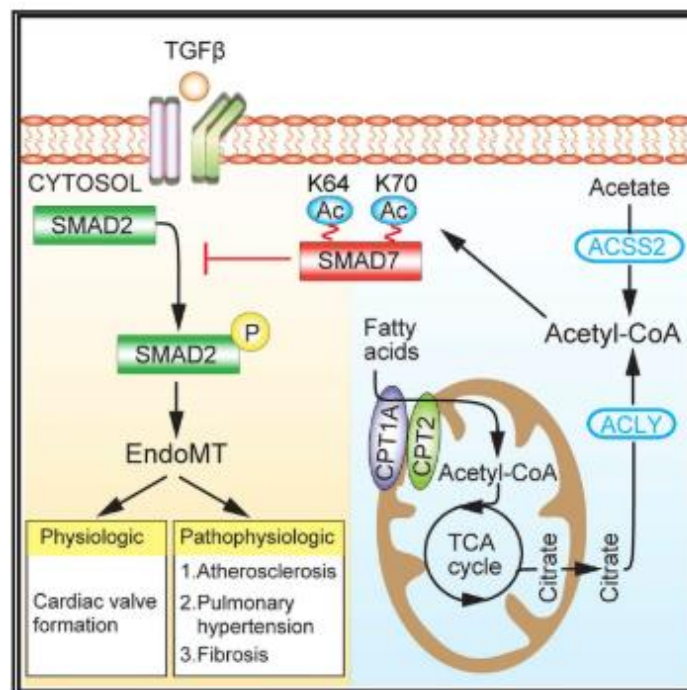


Figura 2. La inducción de EndMT mediante (TGF β) induce la inhibición de la FAO, cosa que estaría regulada por los niveles intracelulares de acetil-CoA (Xiong *et al.*, 2018). Una inducción de EndMT muestra una disminución temprana de CPT1A y CPT2, enzimas que desempeñan un papel limitante y necesario en la FAO. Además, la reducción de la expresión de CPT1A aumenta la fosforilación del efector SMAD2 bajo influencia de TGF- β , cosa que sugiere que la inhibición de la FAO sirve para aumentar la señalización endógena de TGF- β . Los niveles de acetil-CoA modulan la señalización inhibitoria SMAD7, que impide la señalización de TGF- β (Xiong *et al.*, 2018).

Además, en otros estudios se ha visto en células del tejido adiposo que se someten al proceso EndMT a base de TGF β y citoquinas proinflamatorias, en cultivo *in vitro*, hay cambios en cuanto a la morfología, reducción del potencial angiogénico, incremento de la migración, incremento de la

permeabilidad y reducción de la glicólisis, ácidos grasos oxidativos y producción de ATP (Haynes *et al.*, 2019), hecho que indica posibles diferencias metabólicas entre células con genotipo salvaje y células en que el gen PATJ se ha infra expresado.

2.4. Objetivo

El presente estudio tiene como objetivo caracterizar el metabolismo de células hCMEC/D3 que han sufrido el proceso EndMT como consecuencia de la modulación de la expresión génica de PATJ.

Para ello se compara el crecimiento de las células hCMEC/D3 salvajes (WT) con las PATJ deplecionadas (KD) y células que sobre-expresan PATJ en medios selectivos. Para saber si las células dependen del sistema de fosforilación oxidativa (OXPHOS) se utilizará medio de crecimiento deficitario en factores de crecimiento y suplementado con rotenona (inhibidor selectivo del complejo I de la cadena respiratoria) o con Oligomicina (inhibidor de la F₀F₁-ATP sintasa mitocondrial).

La Rotenona es una molécula con actividad insecticida y de origen vegetal que puede ser aislada de plantas como las del género *Lonchocarpus* o *Derris*, y que se conoce por su efecto inhibidor de la cadena respiratoria. Esta acción tóxica se debe a que la Rotenona está capacitada para inhibir el complejo I de la cadena de transporte de electrones mitocondrial, es decir, el complejo NADH- Ubiquitina reductasa. Este hecho se ve reflejado en la bajada del consumo de oxígeno (Voet, Voet & Pratt, 2009).

La Oligomicina es un antibiótico producido por microorganismos del género *Streptomyces* y que bloquea la síntesis de ATP ya que inhibe el movimiento de protones a través del dominio F₀ de la ATP sintasa. La ATP sintasa, también conocida como complejo V de la cadena de transporte de electrones mitocondrial, cataliza la síntesis de ATP gracias a la energía de un gradiente que se genera por el flujo a favor de gradiente electroquímico de protones desde el espacio intermembrana a la matriz mitocondrial. La ATP sintasa consta del dominio F₁, que es un complejo enzimático periférico, y F₀, un complejo integral de membrana a través del cual los protones se translocan (Devlin, 2006).

Por tanto, ambas moléculas inhiben la producción de energía mitocondrial, con lo que cabe esperar que las células más dependientes del sistema OXPHOS, tendrán más dificultades de crecimiento (Figura 3).

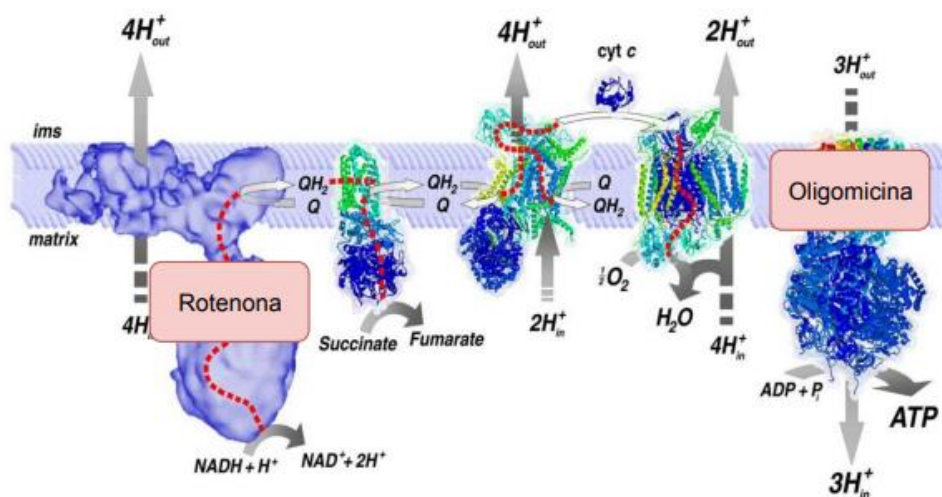


Figura 3. Los tratamientos con Rotenona y Oligomicina van a intervenir el funcionamiento del complejo I y V, respectivamente, de la cadena de transporte de electrones mitocondrial, provocando decremento de la viabilidad celular.

3. Materiales y métodos

3.1. Línea celular

Para llevar a cabo el experimento se utilizaron células hCMEC/D3 (“human cerebral microvascular endothelial cell”). Estas células forman una monocapa inhibida por contacto en colágeno tipo I o tipo IV. Forman estructuras características de endotelio cultivado. hCMEC/D3 es una línea celular, desarrollada en 2005, que representa un buen modelo celular para hacer estudios a nivel celular y molecular en mecanismos de transporte biológico y farmacológico importantes en el sistema nervioso central (Weksler *et al.*, 2013).

3.2. Cultivo celular

Se cultivaron células hCMEC/D3 con genotipo salvaje, células hCMEC/D3 con infra expresión del gen PATJ y células hCMEC/D3 con sobre expresión del gen PATJ en botellas de 150 ml con un soporte de gel de colágeno en medio EBM-2 (“Endothelial Cell Basal Medium- 2”) suplementado con suero fetal bovino (FBS), hidrocortisona, factor de crecimiento básico de fibroblastos humanos recombinante (hFGF-B), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor de crecimiento similar a la insulina I (R3- IGF-1), ácido ascórbico, factor de crecimiento epidérmico (hEGF), sulfato de gentamicina-anfotericina (GA-1000) y heparina.

Las células crecieron sobre un soporte de gel de colágeno. Se necesitaron 2 ml de preparación de colágeno (Tabla 1) para cada botella de cultivo celular de 150 ml.

Tabla 1. Porcentaje de productos necesarios para la elaboración del soporte de colágeno.

<u>Porcentaje</u>	<u>Producto</u>
10%	PBS 10%
0,05%	NaOH 1 N
87,65%	H2O destilada
2,3%	Colágeno 8.7 mg/ml

3.3. Subcultivo de células en placas de 24 pocillos

Para llevar a cabo el experimento se necesitaron 3 placas de 24 pocillos, una por cada tipo celular. Previamente en cada pocillo se introdujeron 300 µl de gel de colágeno. Se introdujeron 30000 células por pocillo, por lo que se tripsinizaron las células de cada botella de cultivo.

El procedimiento se inició retirando el medio de cultivo y lavando con 3,5 ml de tampón fosfato sódico PBS 1%. Se retiró el PBS y se añadieron 3,5 ml de tripsina- EDTA 25%. Se incubaron las células a 37°C durante 4 minutos para disociar las células de su soporte. Se añadieron 3.5 ml de medio de cultivo EBM-2 para parar la acción de la tripsina. Se recogió todo el volumen en un tubo Falcon. Se centrifugó el tubo con las células recogidas a 1800 rpm durante 3 minutos y se obtuvo un pellet de células. Se retiró el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 3 ml de medio de cultivo EBM-2 suplementado.

Para obtener el número de células que había en cada botella se hizo un conteo mediante la cámara de Neubauer, como se describe en el punto 3.5. En cada pocillo se introdujeron 500 µl de medio de cultivo EBM-2 completo con el número de células correspondiente, excepto para el tratamiento EBM-2 sin suplementos.

3.4. Diseño del experimento

Como se muestra en la figura 4, se sembraron los tres tipos celulares, cada uno en una placa de 24 pocillos. En cada placa se hizo un tratamiento control, con medio de cultivo EBM-2 con los suplementos mencionados anteriormente, un tratamiento con Rotenona con una concentración de 500 nM, un tratamiento con Oligomicina con una concentración de 0,8 µg/ ml, y un

tratamiento con medio de cultivo EBM-2. Todos los tratamientos se aplican por duplicado.

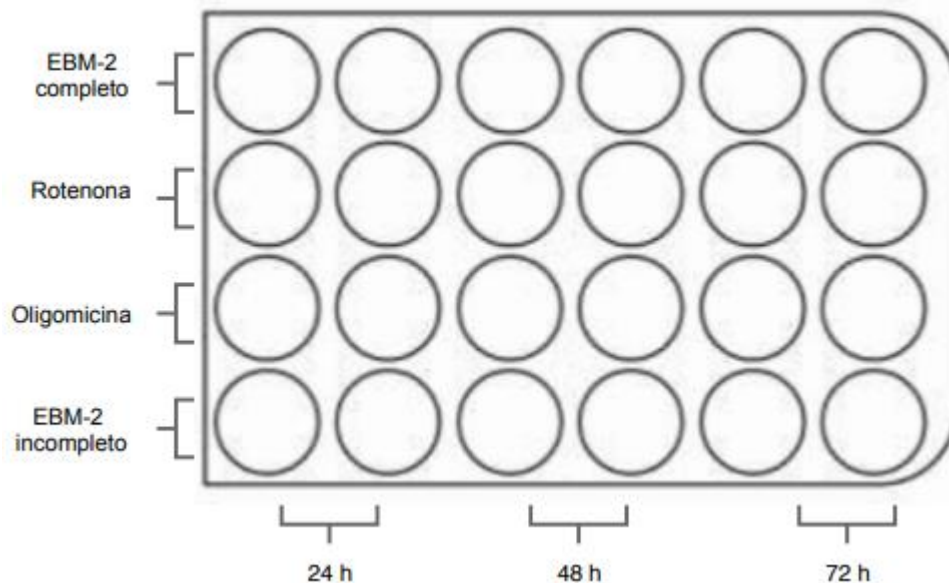


Figura 4. Esquema del diseño del experimento.

3.5. Ensayo de viabilidad celular mediante el uso de inhibidores del sistema de fosforilación oxidativa

Con la finalidad de determinar si las células deplecionadas en PATJ eran más o menos dependientes de la energía de las mitocondrias, se cultivaron las células en medio de cultivo EBM-2 suplementado como se describe previamente, medio de cultivo EMB-2 completo con Rotenona en una concentración de 500 nM, medio completo con Oligomicina en una concentración de 0,8 µg/ ml y medio de cultivo EMB-2 sin suplementos. La viabilidad celular se determinó a tiempos diferentes de incubación (0h, 24h, 48h y 72h).

El ensayo de viabilidad se basa en el conteo de células mediante la cámara de Neubauer en la cual se deposita una mezcla de suspendido celular con colorante Trypan Blue. El colorante Trypan Blue, o Azul de tripano, colorea de azul oscuro solo las células muertas ya que es capaz de atravesar la membrana deteriorada de una célula muerta pero no atraviesa la membrana de las células vivas. El conteo se lleva a cabo bajo un microscopio de campo claro. Bajo el microscopio, las células vivas se ven como puntos circulares redondos y brillantes, mientras que las células muertas tienen aspecto circular pero totalmente oscuro. La concentración de células vivas se averigua con la siguiente fórmula:

$$\text{N}^\circ \text{ células/ ml} = \frac{\sum n_i}{4} \times 10^4 \times \text{factor de dilución}$$

La incógnita n corresponde al número de células vivas contadas.

3. 6. Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos obtenidos se realizó mediante el programa R Studio. Se hizo la prueba estadística ANOVA, con un grado de confianza del 95%, para averiguar posibles diferencias significativas entre la viabilidad en células hCMEC/D3 que tienen el gen PATJ deplecionado y que hacen el proceso EndMT y células hCMEC/D3 de genotipo salvaje. Se realizaron gráficos para representar los resultados.

4. Resultados

Los resultados obtenidos del recuento celular para estimar la viabilidad de los diferentes tipos celulares se encuentran en las gráficas que se presentan a continuación. El nivel de viabilidad celular se estima en número de células por mililitro y el tiempo en horas.

Viabilidad celular en medio de cultivo EBM-2 completo

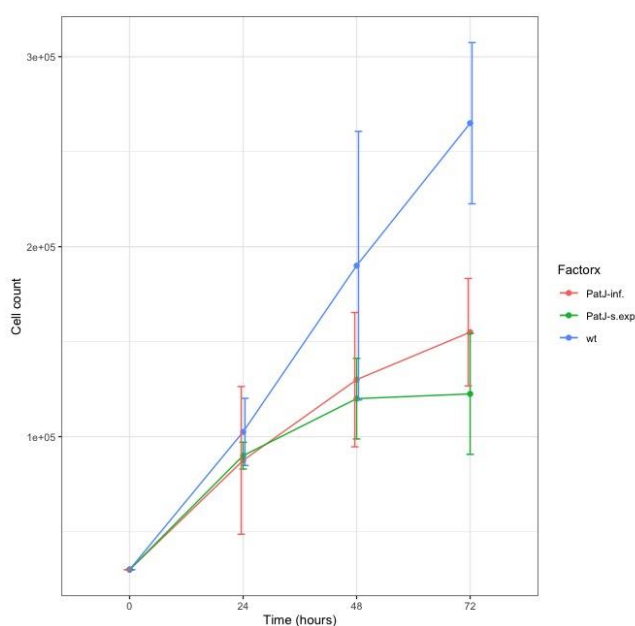


Figura 5. Representación del número de células por mililitro en función del tiempo en los tres tipos celulares diferentes en medio de cultivo completo.

Los resultados de la prueba ANOVA y la representación gráfica (Figura 5) indican que hay diferencias significativas entre el número de células por mililitro a las 72 h de células hCMEC/D3 de genotipo salvaje y células

hCMEC/D3 con el gen PATJ deplecionado o sobre expresado. Cabe destacar que entre células hCMEC/D3 con gen PATJ infra expresado o sobre expresado no existen diferencias significativas en cuanto a viabilidad.

Viabilidad celular en medio de cultivo EBM-2 completo con Rotenona

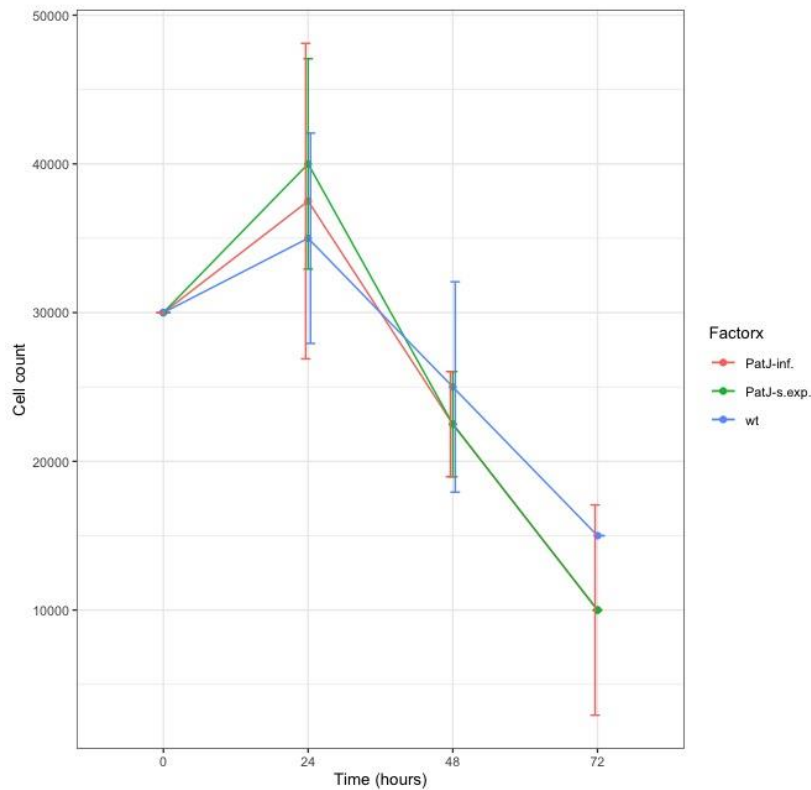


Figura 6. Representación del número de células por mililitro en función del tiempo en los tres tipos celulares en medio de cultivo completo con Rotenona.

Los resultados de la prueba ANOVA indica que no hay diferencias significativas entre el número de células en hCMEC/D3 de genotipo salvaje y células hCMEC/D3 con el gen PATJ deplecionado. En la representación gráfica (Figura 6) se puede observar que hay diferencias significativas entre células de genotipo salvaje y células con el gen PATJ sobre expresado. En todos los casos, en la primera lectura a las 24 horas, el número de células aumenta, pero finalmente decrece hasta haber menos células que al inicio del experimento.

Viabilidad celular en medio de cultivo EBM-2 completo con Oligomicina

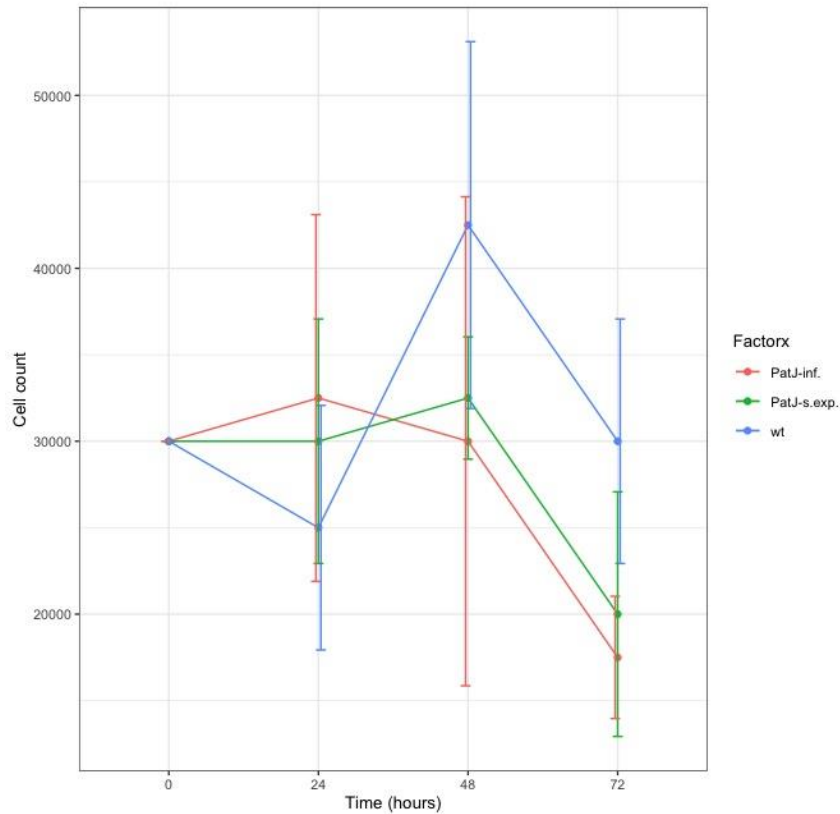


Figura 7. Representación del número de células por mililitro en función del tiempo en los tres tipos celulares en medio de cultivo completo con Oligomicina.

Los resultados del test ANOVA indican que solo hay diferencias significativas en la viabilidad de células hCMEC/D3 de genotipo salvaje y células con el PATJ infra expresado a las 72 horas. Como se observa en la figura 7, en un primer momento, las células con el gen PATJ sobre expresado aumentan en número, pero a continuación decrecen hasta haber menor número de células que al inicio del experimento, aun así, su viabilidad no es significativamente diferente a los otros dos tipos celulares. En el caso de las células con el gen PATJ infra expresado ocurre una situación similar a la anterior. Sin embargo, las células de genotipo salvaje evolucionan de modo que tienen un pico de crecimiento a las 48 horas, pero a continuación decrecen hasta presentar una media similar a la inicial.

Viabilidad celular en medio de cultivo EBM-2 incompleto

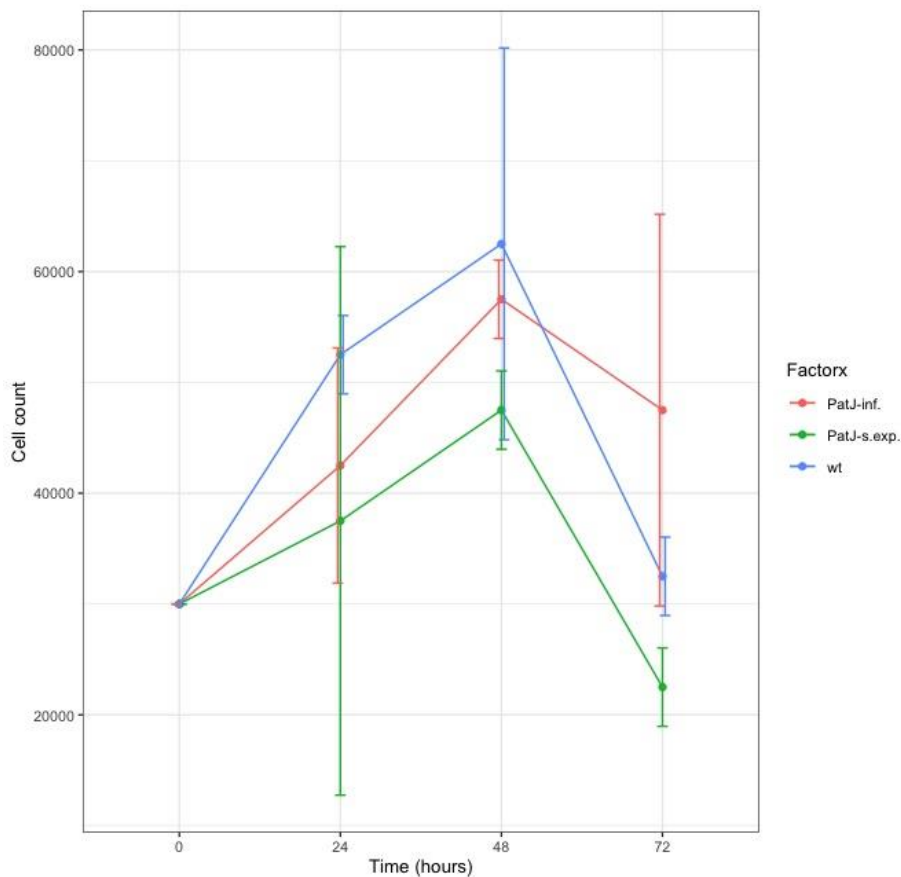


Figura 8. Representación del número de células por mililitro en función del tiempo en medio de cultivo incompleto.

Los resultados de la prueba ANOVA sugieren que no hay diferencias significativas entre células de genotipo salvaje y células que tienen el gen PATJ infra expresado en medio de cultivo incompleto. En la figura 8 se puede ver que, sin embargo, hay diferencias significativas entre células de tipo salvaje y células con el gen PATJ sobre expresado. Todos los tipos celulares tienen un pico de crecimiento a las 48 horas que disminuye hacia el final del experimento.

5. Discusión

Las mitocondrias son orgánulos celulares cuya función es producir la mayor parte de energía necesaria para el funcionamiento celular mediante el proceso de respiración. Para ello sintetizan adenosín trifosfato (ATP) a expensas de glúcidos, aminoácidos y ácidos grasos. Si la actividad de las mitocondrias se ve afectada, probablemente el metabolismo celular se verá comprometido.

Aunque los estudios del metabolismo en células que hacen el proceso EndMT son pocos, existen evidencias de que en células hay, entre otras cosas, cambios de morfología, reducción del nivel de glicólisis, reducción de ácidos grasos y menor producción de ATP (Haynes *et al.*, 2019). Esto concuerda con el hecho de que el número de células con el gen PATJ deplecionado es significativamente menor al de células con genotipo salvaje. Es decir, haber menor producción de ATP la viabilidad celular disminuye.

Los resultados obtenidos en relación con la viabilidad celular en medio de cultivo EBM-2 completo suplementado con Rotenona, indican que no hay diferencias significativas entre las células con el gen PATJ infra expresado y los otros dos tipos celulares, pero que si las hay entre las células de genotipo salvaje y las células con el gen PATJ sobre expresado. La Rotenona inhibe el complejo I de la cadena de transporte de electrones, por lo que se produce una mayor producción de ROS y del estrés oxidativo de la célula, cosa que normalmente conduce a la muerte celular (Voet, Voet & Pratt, 2009). Es, por ello, controversial que hayan sobrevivido células a este tratamiento. Hay estudios enfocados a la investigación de la resistencia a fármacos en células cancerosas, como el Docetaxel, que indican que estas desarrollan adaptaciones metabólicas para sobrevivir (Ippolito *et al.*, 2016). En el caso de células resistentes al Docetaxel, estas adquieren un comportamiento invasivo que producen una transición epitelial a mesenquimatoso, además de una bajada de ROS y del crecimiento celular. Podría ser que estas células tengan un fenotipo respiratorio más deficiente que las células normales, que implica el uso de glucosa, glutamina y lactato por el sistema de fosforilación oxidativa mitocondrial. Además, se sabe que el micro RNA-250 que está asociado a la resistencia al Docetaxel, es capaz de cambiar del sistema OXPHOS a un efecto Warburg (Ippolito *et al.*, 2016). El efecto Warburg se ha descrito en oncología y hace referencia a que la mayoría de las células cancerosas producen energía principalmente en el citosol, por un proceso de glicólisis anaeróbica, ósea, gracias a altas tasas de glicólisis seguidas por un proceso de fermentación láctica, en vez de producir energía mediante la vía de fosforilación oxidativa mitocondrial como ocurre de forma normal. Este efecto está relacionado con reguladores de la expresión génica como el factor inducible por hipoxia HIF-1, la proteína supresora de tumores p53 o el oncogén c-Myc. (Martinez- Costa, 2015). Esta es una posible explicación para el hecho de que no todas las células tratadas con Rotenona mueran. Es decir, tal vez las células que han sido resistentes a la Rotenona han sido capaces de desarrollar cambios metabólicos similares.

En cuanto al ensayo de viabilidad en medio EBM-2 suplementado con Oligomicina, la prueba estadística da indicios de que hay diferencias significativas entre las células de genotipo salvaje y las células con el gen PATJ infra expresado a las 72 horas. El antibiótico Oligomicina bloquea la síntesis de ATP obstaculizando el paso de protones a través del dominio F_0 de la ATP sintasa o complejo V (Devlin, 2006). Hay que tener en cuenta el hecho de que las células también pueden conseguir ATP a través de la glucólisis, es decir,

pasando de glucosa a lactato (Nicholls *et al.*, 2010). Hay estudios que demuestran que en condiciones de inhibición del complejo V mediante Oligomicina, hay una bajada del consumo basal de oxígeno debido a que no se puede sintetizar ATP mediante el sistema OXPHOS, por lo que las células utilizan la glucólisis para satisfacer la demanda de ATP (Nicholls *et al.*, 2010). Además, podría ocurrir una situación similar a la anterior, en que mediante el efecto Warburg las células consiguen modificar su metabolismo para sobrevivir.

El medio de cultivo celular EBM-2 incompleto no está suplementado por factores de crecimiento, pero conserva 2.5 g/L de glucosa, con lo que está a disposición para poder ser utilizada por la glicolisis. La prueba estadística arroja indicios de la existencia de diferencias significativas a las 72 horas entre las células de genotipo salvaje y las células con el gen PATJ infra expresado, y entre las células PATJ infra expresado y sobre expresado. Aún así, en todos los casos el número celular disminuye, seguramente debido a la falta de nutrientes y factores de crecimiento.

6. Conclusiones

1. Los estudios de viabilidad evidencian que las células con expresión diferencial de PATJ presentan diferencias de crecimiento respecto a las células WT.
2. Las células PATJ KD son más dependientes de la energía mitocondrial, tal y cómo se evidencia al crecerlas en presencia del inhibidor de la ATP sintasa mitocondrial
3. Tanto el tratamiento con Rotenona como Oligomicina, dos inhibidores del sistema OXPHOS, no ha provocado muerte masiva celular a las 72h. Esto puede ser debido a que las células desarrollan cambios metabólicos similares a los que ocurren en el efecto Warburg. Se tendrán que realizar estudios posteriores, alargando el tiempo de exposición a dichas drogas para confirmar dicho supuesto.

7. Bibliografía

- Devlin, T. M. (Ed.). (2006). Textbook of biochemistry: with clinical correlations (Vol. 27, p. 1208). Hoboken, NJ: Wiley-Liss.
- Haynes, B. A., Yang, L. F., Huyck, R. W., Lehrer, E. J., Turner, J. M., Barabutis, N., ... Dobrian, A. D. (2019). Endothelial-to-Mesenchymal Transition in Human Adipose Tissue Vasculature Alters the Particulate Secretome and Induces Endothelial Dysfunction. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 39(10), 2168–2191. <https://doi.org/10.1161/atvbaha.119.312826>
- Hong, L., Du, X., Li, W., Mao, Y., Sun, L., & Li, X. (2018). EndMT: A promising and controversial field. *European Journal of Cell Biology*, 97(7), 493–500. <https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2018.07.005>
- Ippolito, L., Marini, A., Cavallini, L., Morandi, A., Pietrovito, L., Pintus, G., ... Taddei, M. L. (2016). Metabolic shift toward oxidative phosphorylation in docetaxel resistant prostate cancer cells. *Oncotarget*, 7(38), 61890–61904. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.11301>
- Johnson, W., Onuma, O., Owolabi, M., & Sachdev, S. (2016). Stroke: A global response is needed. *Bulletin of the World Health Organization*, 94(9), 634A-635A. <https://doi.org/10.2471/BLT.16.181636>
- Martin-Schild, S., Albright, K. C., Tanksley, J., Pandav, V., Jones, E. B., Grotta, J. C., & Savitz, S. I. (2011). Zero on the NIHSS does not equal the absence of stroke. *Annals of emergency medicine*, 57(1), 42-45.
- Martínez Costa, Ó. (2015). Glicolisis, efecto Warburg y flexibilidad metabólica tumoral. *Encuentros En La Biología*, 8(154), 37–40. https://doi.org/10.18567/sebbmdiv_rpc.2015.06.1
- Mola-Caminal, M., Carrera, C., Soriano-Tárraga, C., Giralte-Steinhauer, E., Díaz-Navarro, R. M., Tur, S., ... Jimenez-Conde, J. (2019). PATJ Low Frequency Variants Are Associated with Worse Ischemic Stroke Functional Outcome: A Genome-Wide Meta-Analysis. *Circulation Research*, 124(1), 114–120. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.118.313533>
- Nicholls, D. G., Darley-Usmar, V. M., Wu, M., Jensen, P. B., Rogers, G. W., & Ferrick, D. A. (2010). Bioenergetic profile experiment using C2C12 myoblast cells. *Journal of Visualized Experiments*, (46), 1–6. <https://doi.org/10.3791/2511>
- Pan, M., Ni, J., He, H., Gao, S., & Duan, X. (2015). New paradigms on siRNA local application. *BMB Reports*, 48(3), 147–152. <https://doi.org/10.5483/BMBRep.2015.48.3.089>
- Palazzo, A. F., Joseph, H. L., Chen, Y. J., Dujardin, D. L., Alberts, A. S., Pfister, K. K., ... Gundersen, G. G. (2001). Cdc42, dynein, and dynactin regulate

- MTOC reorientation independent of Rho-regulated microtubule stabilization. *Current Biology*, 11(19), 1536–1541. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(01\)00475-4](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(01)00475-4)
- Potentia, S., Zeisberg, E., & Kalluri, R. (2008). The role of endothelial-to-mesenchymal transition in cancer progression. *British Journal of Cancer*, 99(9), 1375–1379. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6604662>
- Randolph, S. A. (2016). Ischemic Stroke. *Workplace Health and Safety*, 64(9), 444. <https://doi.org/10.1177/2165079916665400>
- Rosell-Novel, A., Montaner, J., & Álvarez-Sabín, J. (2004). Implicación de la angiogénesis en la isquemia cerebral humana. *Revista de Neurología*, 38(11), 1076–1082. <https://doi.org/10.33588/rn.3811.2004164>
- Shin, K., Wang, Q., & Margolis, B. (2007). PATJ regulates directional migration of mammalian epithelial cells. *EMBO Reports*, 8(2), 158–164. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400890>
- Vaccaro, P., Brannetti, B., Montecchi-Palazzi, L., Philipp, S., Helmer Citterich, M., Cesareni, G., & Dente, L. (2001). Distinct Binding Specificity of the Multiple PDZ Domains of INADL, a Human Protein with Homology to INAD from *Drosophila melanogaster*. *Journal of Biological Chemistry*, 276(45), 42122–42130. <https://doi.org/10.1074/jbc.M104208200>
- Voet, D., Voet, J. G., & Pratt, C. W. (2007). *Fundamentos De Bioquímica/Fundamental of Biochemistry*. Ed. Médica Panamericana.
- Weksler, B., Romero, I. A., & Couraud, P. O. (2013). The hCMEC/D3 cell line as a model of the human blood brain barrier. *Fluids and Barriers of the CNS*, 10(1), 1. <https://doi.org/10.1186/2045-8118-10-16>
- Welch-Reardon, K. M., Ehsan, S. M., Wang, K., Wu, N., Newman, A. C., Romero-Lopez, M., ... Hughes, C. C. W. (2014). Angiogenic sprouting is regulated by endothelial cell expression of Slug. *Journal of Cell Science*, 127(9), 2017–2028. <https://doi.org/10.1242/jcs.143420>
- Xiong, J., Kawagishi, H., Yan, Y., Jurczak, M. J., Fessel, J. P., Finkel, T., ... Yu, Z. (n.d.). *Short Article A Metabolic Basis for Endothelial-to-Mesenchymal A Metabolic Basis for Endothelial-to-Mesenchymal Transition*. 689–698. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.01.010>