

Rol de CPT1C en la supervivencia de las células madre mesenquimales.

Xavier Roa Mansergas

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tesisenxarxa.net) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tesisenred.net) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tesisenxarxa.net) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



UNIVERSITAT INTERNACIONAL DE CATALUNYA

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BÁSICAS

**ROL DE CPT1C EN LA SUPERVIVENCIA DE LAS
CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES**

Xavier Roa Mansergas

TESIS DOCTORAL

Sant Cugat del Vallès, 2016



UNIVERSITAT INTERNACIONAL DE CATALUNYA

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BÁSICAS

**ROL DE CPT1C EN LA SUPERVIVENCIA DE LAS
CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES**

Memoria de tesis doctoral presentada por Xavier Roa Mansergas para optar al título de Doctor por la Universitat Internacional de Catalunya

Esta tesis se ha realizada bajo la dirección y la supervisión de la Dra. Núria Casals Farré y de la Dra. Rut Fadó Andrés, en el Departamento de Ciencias Básicas de la Universitat Internacional de Catalunya

Sant Cugat del Vallès, 2016

Dra. Núria Casals Farré

Directora de tesis

Dra. Rut Fadó Andrés

Co-directora de tesis

Xavier Roa Mansergas

Doctorando

“Si tienes un sueño, tienes que protegerlo”

Will Smith

*“Si no puedes volar, entonces, corre; si no puedes correr, entonces, camina;
si no puedes caminar, entonces, arrástrate; pero hagas lo que hagas,
sigue moviéndote hacia adelante.”*

Martin Luther King

A los que me hacéis feliz...

Agradecimientos

Seguramente, éste es el apartado más importante de esta tesis doctoral; sin todos vosotros, no hubiese llegado aquí.

Quiero empezar por mi directora de tesis, Núria, porque para apostar por un químico sin casi experiencia para empezar un proyecto totalmente diferente al resto, hay que ser valiente. Un proyecto sin neuronas y sin ratones pero con células madre y humanos. Por enseñarme a ser crítico, a preguntarme el porqué de las cosas y por confiar en mí y en que, tarde o temprano, esta tesis saldría adelante.

Y, sin duda, hoy podríamos estar en muchos sitios y lugares pero no con una tesis en las manos si no fuese por Rut. Aquí aparecerás como co-directora de tesis pero, en realidad, eres mi ejemplo de lucha y esfuerzo, mi ejemplo de entrega y sacrificio. Como científica, eres la persona que apostó porque este proyecto sobre células madre, algún día, saldría adelante. Cuando todo era pesimismo y parecía un callejón sin salida, tú tuviste claro que sin sufrimiento no hay premio y que algún día cantaríamos victoria con las MSC. Y, sobre todo, gracias por enseñarme a pensar. Como persona, eres la única que solo ve soluciones donde el resto ven problemas y, por supuesto, eres una luchadora incansable y la prueba es Magí, puede estar orgulloso de tenerte como madre.

También tengo que dar las gracias al humor de nuestra sevillana Marta por estos años juntos, a las locuras y chillidos de Mari Carmen, al buen rollo ilimitado de Rosi, al optimismo de Cris pa' tirar siempre hacia adelante, a la sencillez de María como estilo de vida, a la disponibilidad de Bea para echar una mano siempre que sea necesario y, como no, a nuestra "lab technician" Marta, sin ti el laboratorio no avanza, está comprobado.

Aquí también quiero añadir a los "lab members" que se fueron: Sara, Maca y Jordi; a Pep por su opinión siempre que se la hemos pedido y a su gente: Ori, Eli, Javi, Samu, Nati, Abril, Eva, Bob, Sergio, Sara y Mariana. Gracias también a Arantxa por no darme nunca un no por respuesta cuando le he pedido ayuda, a Laura por su simpatía irrenunciable y a Lourdes por su lucha ilimitada contra las adversidades.

A todos vosotros, por mantenerme siempre la silla caliente y la cerveza fría.

Tengo que agradecer también al grupo "stemcellero", especialmente a Maher, Sheyla, Carlos, Esther, Raquel y Bego. Sin vuestros continuos consejos sobre MSC, seguiría haciendo el bobo delante de la centrífuga, de hecho, sigo haciéndolo pero no delante de la centrífuga...

Gracias al grupo de la UB: Dolors, Laura, Joan, María y Minéia por echarme una mano siempre que lo he necesitado, por guiarme cuando iba perdido y por poneros en mi lugar a la hora de enfocar los experimentos más adecuados.

Fuera de la UIC, gracias a Magic Five: Pau R, Pedro, Pau S e Iván. Sois muy grandes los cuatro, sería todo tan vacío sin vosotros...sin montañas a las que subir, sin Kulturinsel ni furgo tirada en Croacia, sin conciertos inolvidables como Fito o Sopa de Cabra, sin chistes absurdos...personas como vosotros no aparecen en cada esquina y yo, por suerte, tengo cuatro, grandes!!!

A esas químicas espectaculares, seis pedazo pivones y seis pedazo personas: Mireia, Ana, María, Patri, Lola y Aina. Cada una de vosotras es única y de cada una aprendo, no perdáis nunca esa personalidad que os hace tan geniales. También a Albert, a Dani y a Oscar que aunque nos veamos menos de lo que nos gustaría, sois esenciales. Una vez más, gracias a todos vosotros “quimiquishos”. Por las vivencias compartidas y por los viajes como Cuba, Menorca, Londres, Berlín, Croacia, Eslovenia y en unos meses ¡otro pa’ la saca!

También dar las gracias a “los del cole”. Siempre os he llamado así y así seguirá siendo, porque pasan los años y seguimos compartiendo un montón de aventuras y más. La gente se fascina cuando ve que seguimos viéndonos a menudo y sabiendo unos de los otros. Nosotros, simplemente, mostramos con orgullo lo que somos: una gran familia que no deja de crecer. Gracias por tantos años a mi lado...y los que ¡nos quedan! ¡Os echo de menos!

Gracias a “los del máster” porque tengo lo mejorcito de Alicante (Albert y Luis), Extremadura (Ananda y Marta), Salamanca (Manu) y Ávila (Javi). ¡Viva el vermut y las charlas interminables!

Tampoco puedo olvidarme de los que compartisteis mi sueño de conocer África en Camerún: Olga A, Agnès, Esther, Anna, Marta, Núria, Marina, Olga C y Aimar... ¡mis viajeros africanos! Sois un combinado ideal para reír, una receta 100% aconsejable.

A mis padres y a Carlos, merecéis una mención especial; ya no por la tesis, sino por tantos años apoyando cada una de mis decisiones, necesitaría un montón de hojas para agradeceros que hayáis estado siempre ahí. Podría resumirlas en no daros las gracias por estos 4 años sino por los 27; bueno Carlos, en tú caso, 24, que no son pocos.

A Elena, por complementarme tanto, por aguantar mis quejas y mis suspiros, tal vez seas la persona que, injustamente, haya aguantado más los malos días de esta tesis... gracias por hacerme tan feliz ¡eres única!

Y para finalizar, gracias a todos aquellos cameruneses y tanzanos que cada vez que he dicho que andaba metido en ciencia esbozabais sonrisas de ilusión, solo saber que confiáis

en mí y en la ciencia ya es suficiente para luchar por avanzar. Os aseguro que siempre que tenga la oportunidad de luchar por mejorar la sociedad en la que vivimos, lo haré, se podrá decir que no lo conseguí, que no salió como se esperaba, que no fue exitoso...pero jamás se podrá decir ¡que no lo intenté!

De pre-doc veterano a pre-doc novato

Dicen que cuando uno escribe una tesis doctoral, escribe un trabajo totalmente suyo; que redacta con sus palabras, que diseña con su estilo propio y que lo escribe con sus propias manos. Y estoy de acuerdo, tan de acuerdo que he querido redactar este pequeño capítulo, la razón es que no lo he visto en ninguna otra tesis y así le da un toque más personal todavía.

Posiblemente, escribo este breve capítulo porque es lo que me hubiera gustado leer al inicio del 2012, que era la época en que me planteaba realizar la tesis, quería que alguien me cogiera de la solapa y me fuera sincero y claro, que me contase qué había en este “mundillo” de las tesis y a qué fuego se cocían las ideas en este campo, todavía inexplorado para mí. Debo reconocer que conseguí informarme, pero creo que si lo hubiese encontrado escrito, me hubiese gustado leerlo. Y así nacen estas líneas, sin más, de mí para ti, de mí para un nuevo pre-doc, de mí para una persona ilusionada con realizar la tesis. No tiene más, se trata de la humilde opinión de un doctorando que ha llegado al final de esta etapa y quiere transmitirte sus pensamientos.

En primer lugar, felicitarte por haber sido valiente, por haber tomado esta decisión, de veras, enhorabuena. No te felicito por haber decidido realizar una tesis doctoral (posiblemente, si te gusta la investigación y tienes curiosidad, era la opción más viable y plausible por la que debías luchar). Te felicito por lo que vas a aprender de ciencia y de la vida, créeme, madurarás como científico y como persona. Para madurar como persona te aconsejo viajar y escuchar a tu alrededor, que vivimos en una sociedad con muchos licenciados en hablar pero con muy pocos doctores en escuchar (lo siento, ya he hecho el paralelismo con licenciados y doctores pero me resulta inevitable tras varios meses escribiendo).

Pero aparte de viajar, la tesis también te ayudará a madurar como persona. Antes de echarte piropos y darte alegrías, permíteme que te sea sincero y te hable claro, porque ya que vas a atravesar esta selva y te vas a encontrar con estas situaciones, si te lo advierto, al menos, irás concienciado, que yo no lo iba hace unos años cuando empecé y vivía en mi mundo de pin y pon.

Para empezar, debo decirte que hay algunos conceptos que debes sacártelos de la cabeza: eso de “disfrutarás todos los días como nunca”, “te levantarás de la cama siempre con ilusión por ver qué descubres de nuevo” y “sabrás un montón de cosas durante años que

nadie sabe” es mentira. Lo siento, siento ser así de duro contigo que recién empiezas pero vale la pena que alguien te sea sincero. No te creas nada de estas utopías, no existen. Sé que lo pensabas pero es así, no existe. Y sé que lo piensas porque yo en su día también. Y en el fondo, me sabe mal decírtelo así...pero es la verdad.

Te levantarás muchos días con la sensación (al menos yo la he tenido varias veces) que vienes al laboratorio y te irás a casa, al final de la jornada, igual que un niño de P-5, habiendo aportado nada. Es así y habrá días que te sentirás un fracasado porque no consigues tus objetivos, porque los experimentos no salen como esperabas, porque te quedas sin ideas, porque tus células se contaminan y por mil historias más que ni te imaginas. Esto de “encontrarás el remedio a una enfermedad”, “probablemente, descubrirás una cura contra el cáncer” y demás frases del estilo es mentira. Repito: es mentira. Y no quiero ser cruel contigo, tan solo te explico lo que verás durante estos años. A mí me hubiese gustado que me lo hubieran dicho y que alguien me hubiese dado un baño de realidad.

¡Ojo! No te vengas abajo ahora, no he dicho que te quites las ilusiones de la cabeza, ¡en absoluto! Hay que ser optimista y, sobre todo, ponerle ilusión al proyecto donde te metes. Esto sí que no lo puedes perder nunca y sobre todo ¡échale ganas a aquello que se ponga por delante! Que la guerra es larga y tendrás muchas batallas pero ganando batallas es como se logra ganar la guerra. Una vez más, enhorabuena, porque a las peores guerras solo mandan a los mejores generales, no olvides que muchos no han conseguido llegar hasta aquí, tú sí.

En el fondo, estas batallas van bien porque te enseñan a vivir. De verdad, ganando no se consigue nada, bueno sí, la victoria ¿y qué más? Ya está, la victoria, punto. Pero cuando pierdes, cuando fracasas, ahí sí que ganas. Por lo tanto, como dice la frase, unas veces se gana y otras se aprende. Con lo cual, espero que ganes pero que de tanto en tanto, pierdas, digo, aprendas.

Si algo he aprendido en estos cuatro años es que va bien sentir que la soga te ahoga para ver que todavía no te han ahorcado, va bien tener heridas para saber que sigues vivo, va bien ver borroso para darte cuenta que no eres ciego, va bien ir con muletas para saber que tienes piernas...va bien fracasar en tus experimentos para saber que tu cerebro funciona y tienes ideas nuevas que ensayar.

Y dicho esto, dale duro a esta tesis porque te aseguro que te hará ser crítico/a con tus propios experimentos y tu manera de hacer, dale duro porque te hará ser una persona más

responsable con tu trabajo diario, dale duro porque de cada resultado fallido producirás nuevas ideas para mejorar.

¡Ah! Y un último consejo, así como todos los que he dicho, sencillo y que no pretende aleccionar sino que es una reflexión personal. Durante tu tesis, ¡haz algo que te haga brillar los ojos! O dicho en otras palabras, algo que te ponga la piel de gallina, que te erice la piel, que te haga sentir vivo, que te atraiga, que sea tu vicio, tu adicción, ¡Tu droga! Creo que me has entendido ¿no? Tiene que ser algo que te ponga objetivos por delante.

Si no hay nada que te haga brillar los ojos, estás perdido. Durante la tesis, vas a tener días muy duros (no voy a decir exactamente cuán duros serán porque sonaría grosero pero ya sabes a lo que me refiero).

Te diré qué es eso por lo que yo suspiro. A mí me fascinan los viajes pero no puedo “teletransportarme” por un día a África; a mí me fascina rodearme de mi gente pero cada uno tiene su propia vida que vivir y, tal y como es lógico, no pueden estar en cualquier momento a tu lado. Me fascinan las aventuras pero no siempre se pueden realizar, en ocasiones requieren dinero, tiempo o improvisación. Así que rebusqué en mi interior y encontré lo que hace brillar mis ojos: el triatlón.

Cada semana, durante horas puntuales, me aísla en un mundo paralelo en el que solo convivo yo conmigo mismo, y me lanzo a una piscina donde solo estamos el agua y yo y nado como si no hubiera mañana; disfrutando todas y cada una de las brazadas. O sino, me calzo las bambas y me voy a correr unos kilómetroillos por Barcelona, donde cada zancada me aísla más de mi tesis y de mi alrededor, ¡desconecto! Y mi tercera opción es pedalear en mi bici de carretera por Montjuic o el Tibidabo normalmente, contemplar la ciudad desde arriba y decir ¡hoy sí, un día más he conseguido tener Barcelona a mis pies! Y me pierdo entre sus vistas...son minutos que no tienen precio. Y tal ha sido mi adicción a esta droga que corro carreras lúdicas de 10 km por Cataluña, que me apunto a travesías por aguas abiertas allá donde sea necesario y que hago tiradas largas de bicicleta allá donde haya un camino que recorrer. Y el día que me surge hacerlo todo junto, entreno y hago un triatlón. Siempre planteándome nuevos retos, asequibles y alcanzables con sacrificio, pero son un nuevo motivo para luchar. Mi próximo objetivo es hacer el Triatlón Olímpico: 1.5km a nado, 40 km en bici y 10km corriendo. Espero que el reto caiga antes de defender esta tesis y, si no cae por una lesión física o porque psicológicamente me vengo abajo, tendré la excusa perfecta para apuntarme a otra en 2016. Y si lo consigo, también tendré excusa: mejorar mi tiempo personal.

Conclusión: Busca en tu vida eso que te absorba, eso ¡que te haga sentir vivo!

Ahora sí, me despido, suerte nuevo pre-doc y recuerda siempre que, por muy largo que veas el camino, todos los caminos empiezan con un primer paso.

ÍNDICE

Abreviaturas	21
---------------------------	-----------

<u>Capítulo 1: Introducción.....</u>	25
---	-----------

1. Carnitina aciltransferasas	27
1.1 Sistema carnitina palmitoiltransferasa (cpt).....	27
1.2 CPT1A y CPT1B.....	29
1.3 CPT1C: la nueva isoforma descubierta.....	31
2. CPT1C: carnitina palmitoiltransferasa 1c.....	31
2.1 Distribución tisular y localización subcelular	32
2.2 Actividad catalítica.....	33
2.3 Regulación del balance energético	36
2.4 Regulación de la ingesta a través de grelina y leptina.....	38
2.5 Función motora	39
2.6 Maduración de espinas dendríticas y cognición.....	40
2.7 CPT1C y cáncer	41
3. Células madre	43
3.1 Orígenes	43
3.2 Características	44
3.3 Tipos.....	45
3.3.1 Clasificación en función de su potencial de diferenciación	45
3.3.2 Clasificación en función de su origen.....	46
3.4 Células madre de la pulpa dental.....	50
3.5 Dental pulp pluripotent-like stem cells	51
3.6 Terapia celular y medicina regenerativa	52
3.7 Cáncer.....	54
3.8 Carcinogénesis	56
3.9 Células madre cancerígenas	57
4. Metabolismo de las células madre	59
4.1 Metabolismo celular de las células totipotentes.....	60
4.2 Metabolismo celular de las células pluripotentes.....	61
4.3 Metabolismo celular de las células mesenquimales.....	63
4.4 Cuerpos lipídicos.....	65
4.5 Autofagia.....	67

Capítulo 2: Hipótesis	71
Capítulo 3: Objetivos	75
Capítulo 4: Materiales y métodos	79
1. Biología molecular.....	81
1.1 Obtención de vectores víricos recombinantes	81
1.1.1 Obtención de pLVTHM-shCPT1C humana	83
1.1.2 Microbiología	85
1.2 Obtención y análisis de RNA	87
1.2.1 Extracción de RNA.....	87
1.2.2 Síntesis de DNA copia (cDNA)	88
1.2.3 PCR cuantitativa a tiempo real	88
1.3 Obtención y análisis de proteínas.....	89
1.3.1 Extracción de proteínas	89
1.3.2 Western blot.....	90
2. Biología celular.....	93
2.1 Obtención y aislamiento de MSC humanas	94
2.2 Obtención de MSC humanas con sobre-expresión e inhibición estable de la CPT1C	95
2.3 Mantenimiento de líneas celulares	100
2.3.1 Contaje de la concentración de células.....	101
2.3.2 Criopreservación de células.....	101
2.3.3 Descongelación de células.....	102
2.4 Obtención de lentivirus	103
2.4.1 Producción de lentivirus	103
2.4.2 Titulación de lentivirus.....	105
2.5 Análisis de la supervivencia celular mediante MTT	107
2.6 Ensayo de producción de adenosina trifosfato (ATP).....	108
2.7 Ensayo de oxidación de ácidos grasos	110
2.8 Tinción de cuerpos lipídicos	113
3. Análisis estadístico	114
Capítulo 5: Resultados	115

<u>Parte I:</u> ¿Se expresa CPT1C en células madre?	117
1. CPT1C se expresa en células madre mesenquimales.....	117
2. Las células madre mesenquimales expresan niveles similares de CPT1C en comparación con cerebro humano	119
<u>Parte II:</u> ¿Es capaz CPT1C de proteger a las MSC en situaciones de estrés metabólico?	122
3. CPT1C protege las MSC en ausencia de glucosa o cuando son tratadas con 2- desoxi-d-glucosa (2-dg)	123
4. CPT1C protege las MSC cuando son privadas simultáneamente de glucosa y de oxígeno	125
5. CPT1C no protege las MSC cuando son tratadas con H ₂ O ₂ ni con factores de estrés de retículo endoplasmático	126
6. El silenciamiento de CPT1C incrementa la mortalidad de las MSC en ausencia de glucosa o cuando son tratadas con 2-desoxi-d-glucosa (2-dg)	127
7. CPT1C protege las MSC de la médula ósea en ausencia de glucosa o cuando son tratadas con 2-desoxi-d-glucosa (2-dg).....	131
8. La ausencia de glucosa incrementa la expresión de CPT1C endógena en MSC ...	132
<u>Parte III:</u> Identificación del mecanismo a través del cual CPT1C protege a las células madre y, en consecuencia, promueve la supervivencia celular	134
9. La protección que confiere CPT1C no ésta inducida por AMPK	134
10. CPT1C no confiere mayor capacidad oxidativa de ácidos grasos a las MSC.....	137
11. En ausencia de glucosa, las MSC que presentan CPT1C sobre-expresada producen más ATP que las MSC control	140
12. En ausencia de glucosa, CPT1C aumenta la síntesis de autofagosomas.....	142
13. CPT1C no protege las MSC cuando se paraliza el ciclo autofágico en ausencia de glucosa	143
14. CPT1C no incrementa la producción de ATP cuando se paraliza el ciclo autofágico en ausencia de glucosa	145
15. En ausencia de glucosa, CPT1C promueve la formación de cuerpos lipídicos ...	146
16. La autofagia es un paso previo a la formación de cuerpos lipídicos para que CPT1C confiera protección a las MSC.....	148
17. CPT1C no protege las MSC cuando se inhibe la degradación de cuerpos lipídicos	150

18. En ausencia de glucosa, cuando se inhibe la degradación de cuerpos lipídicos, las MSC que presentan CPT1C sobre-expresada producen menos ATP	152
--	-----

Capítulo 6: Discusión 155

1. Un nuevo tipo celular para CPT1C: las células madre.....	159
2. CPT1C confiere protección a las células madre mesenquimales	161
3. ¿Mediante qué mecanismo promueve CPT1C la supervivencia celular en ausencia de glucosa?.....	165
4. Perspectivas futuras.....	169

Capítulo 7: Conclusiones 171

Capítulo 8: Bibliografía 175

ABREVIATURAS

AA	Aminoácido
AC	Autoclavado
ACC	Acetil-CoA carboxilasa
ACS	Acetil-CoA Sintasa
AG	Ácido graso
AGCL	Ácido graso de cadena larga
AMP	Adenosina monofosfato
AMPK	Proteína quinasa activada por AMP
ATG	Genes asociados a autofagia
ATGL	Lipasa de triglicéridos adiposa
ATP	Adenosina Trifosfato
BM-MSC	Célula madre mesenquimal procedente de la médula ósea
BSA	Albúmina de suero bovino
CACT	Carnitina Acilcarnitina Transferasa
CHQ	Cloroquina
CL	Cuerpo lipídico
CoA	Coenzima A
CPT	Carnitina palmitoiltransferasa
CrAT	Carnitina acetiltransferasa
CrOt	Carnitina octanoiltransferasa
CSC	Célula madre cancerígena
DAG	Diacilglicerol

DEPC	Dietilpirocarbonato
DEUP	Dietillumberil fosfato
2-DG	2-desoxiglucosa
DMEM	Medio Eagle modificado por Dulbecco
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Deoxinucleótido trifosfato
DPMSC	Célula madre mesenquimal procedente de la pulpa dental
DPPSC	Célula madre con cualidades de pluripotencia procedente de la pulpa dental
ESC	Célula madre embrionaria
EV	Vector vacío
FACS	Clasificación de células activadas por fluorescencia
FBS	Suero fetal bovino
GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
GFP	Proteína Verde Fluorescente
HIF1α	Factor Inducible por Hipoxia 1 α
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
HSL	Lipasa sensible a hormonas
iPS	Célula madre pluripotente inducida
KO	Animal modificado genéticamente
LC3	Cadena ligera 3 proteína asociada a microtúbulos
LD	Cuerpo lipídico
MAG	Monoacilglicerol

MAMs	Membranas asociadas a mitocondria
mRNA	ARN mensajero
MSC	Célula madre mesenquimal
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
NaCl	Cloruro de sodio
NADP⁺	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido
OGD	Privación simultánea de oxígeno y glucosa
O/N	Durante toda la noche (12-16h)
PBS	Tampón fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
qPCR	PCR cuantitativa
RE	Retículo endoplasmático
RNA	Ácido ribonucleico
RNAsa out	Inhibidor de la ribonucleasa
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RT	Transcripción Reversa
SDS	Dodecilsulfato de sodio
TAG	Triacilglicerol
WT	Animal Salvaje

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

1. CARNITINA ACILTRANSFERASAS

La oxidación de los ácidos grasos en la mitocondria es una de las principales fuentes de obtención de energía en las células. Para que se produzca correctamente, los ácidos grasos deben ser transportados a la matriz mitocondrial y las enzimas responsables de este transporte son aquellas que poseen actividad aciltransferasa (1). Existen varias enzimas con este tipo de actividad y se acostumbra a clasificar en función del tamaño del ácido graso que utilizan como sustrato. Así pues, la clasificación es la siguiente:

1. Carnitina acetiltransferasa (CrAT o CAT): El sustrato principal es acetil-CoA (2).
2. Carnitina octanoiltransferasa (CrOT o COT): El sustrato principal es octanoil-CoA y fue ampliamente descrita por Ferdinandusse y colaboradores (3).
3. Carnitina palmitoiltransferasa (CPT): El sustrato principal es el palmitoil-CoA, aunque también transportan otros ácidos grasos de cadena larga. En este subtipo existen la CPT1 y la CPT2, las cuales se caracterizarán en el siguiente apartado pero ambas tienen en común que ejercen el transporte de ácidos grasos de cadena larga (AGCL-CoA) de entre 16 y 20 carbonos (1).

Las CPT son realmente importantes ya que los ácidos grasos de cadena larga (AGCL), a diferencia de los de cadena corta y media, son incapaces de entrar al interior de la mitocondria y, en consecuencia, necesitan un sistema transportador (CPT1/translocasa/CPT2) que los ayude.

1.1 SISTEMA CARNITINA PALMITOILTRANSFERASA (CPT)

Conviene comentar que previo al inicio del sistema CPT, la Acil-CoA-Sintetasa (ACS) cataliza la unión del ácido graso con la coenzima A de manera que el AGCL-CoA ya está entonces activado para el inicio del sistema CPT.

La principal función de este sistema es la entrada de los AGCL-CoA a la matriz mitocondrial para la posterior β -oxidación de éstos y generación de energía en forma de ATP.

En el primer paso del sistema CPT interviene la carnitina palmitoiltransferasa 1 (CPT1), una proteína transmembrana situada en la membrana mitocondrial externa, que se

encarga de intercambiar el coenzima A de los AGCL a carnitina obteniendo así AGCL-carnitina en el espacio intermembrana. A continuación interviene una translocasa llamada carnitina-acilcarnitinatranslocasa (CACT), situada en la matriz mitocondrial interna, que transporta el producto acilcarnitina a la matriz mitocondrial. Finalmente, una vez en la matriz mitocondrial, interviene la carnitina palmitoiltransferasa 2 (CPT2) que transfiere el grupo acilo de la acilcarnitina a una molécula de coenzima A (CoA). Ahora, los AGCL-CoA ya están listos para entrar en el ciclo de la β -oxidación y producir, en última instancia, acetil-CoA (Figura 1) (4).

La reacción catalizada por CPT1 es un paso clave en la regulación del flujo de AGCL-CoA para que se lleve a cabo la β -oxidación. El compuesto que regula esta reacción es el malonil-CoA (5), un intermediario en la síntesis de los ácidos grasos. Este compuesto es muy importante en el metabolismo intracelular ya que no solo modula la CPT1 para la posterior oxidación de los AGCL, sino que determina la disponibilidad de AGCL para procesos como la síntesis de lípidos complejos. Más concretamente, cuando los niveles de malonil-CoA son elevados, inhibe la acción de la enzima CPT1 y favorece la lipogénesis y la oxidación de la glucosa. En cambio, cuando los niveles de malonil-CoA son bajos, no ejerce su efecto inhibitorio sobre CPT1 y se favorece la oxidación de los ácidos grasos.

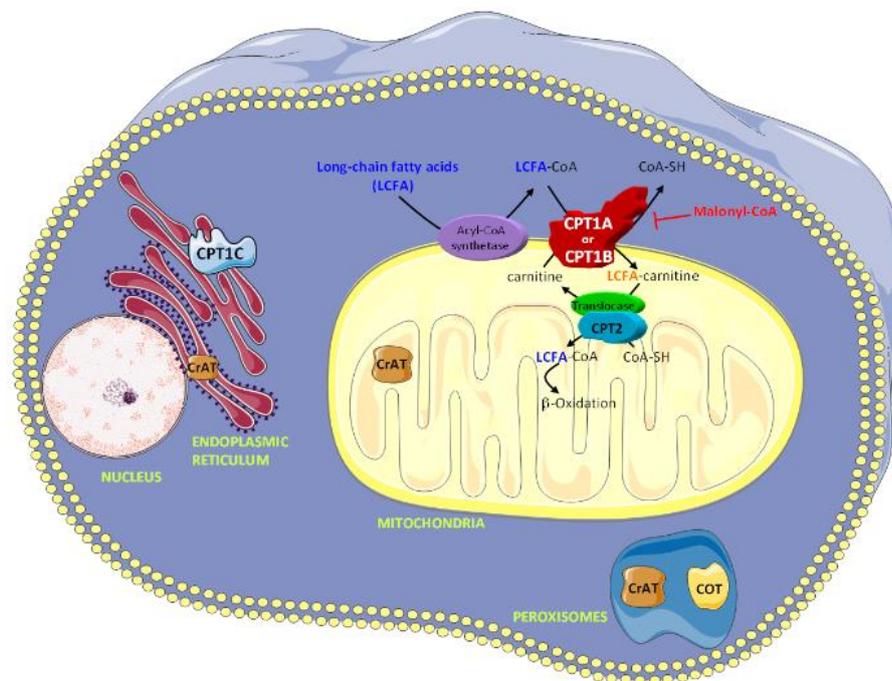


Figura 1. Mecanismo de transporte de los ácidos grasos de cadena larga (AGCL) desde el citosol a la matriz mitocondrial ejercido por el sistema CPT para la posterior β -oxidación. (Extraído de Casals et.al., 2015).

Como se aprecia en la figura 1, en mamíferos existe únicamente una proteína CPT2, mientras que la familia de enzimas CPT1 presenta tres isoformas distintas:

- CPT1A o CPT1-L (del inglés **L**iver) es la que presenta una expresión más ubicua de las tres y se encuentra en hígado, páncreas, riñón, pulmón, intestino, ovarios y cerebro (6–8).
- CPT1B o CPT1-M (del inglés **M**uscle) se identificó inicialmente en músculo esquelético y cardíaco, pero también se ha descrito en tejido adiposo y testículos (9,10). Aunque el rol de CPT1B en cerebro no parece muy claro, hay autores que han descrito su presencia en este tejido en gallos (11).
- CPT1C es la última isoforma que se ha descubierto y se expresa principalmente en cerebro y, en menor medida, en testículos (12). Actualmente, su función todavía resulta desconocida.

Conviene destacar que CPT1C se expresa únicamente en mamíferos mientras CPT1A y CPT1B se expresan además en reptiles, insectos, peces y aves, lo cual sugiere que CPT1C está presente en aquellos organismos más complejos.

1.2 CPT1A Y CPT1B

Tal y como se ha comentado anteriormente, los ácidos grasos de cadena larga requieren la enzima CPT1 para poder entrar en la mitocondria y ser sometidos al proceso conocido como β -oxidación. Curiosamente, CPT1A está muy presente en hígado y en tejidos que poseen altos ratios de síntesis de ácidos grasos, mientras que CPT1B se expresa en tejidos caracterizados por tener un alta capacidad de oxidar ácidos grasos, como puede ser el músculo o el tejido adiposo marrón (8). También difieren considerablemente en la afinidad que presentan respecto al inhibidor fisiológico de las CPT1 (malonil-CoA) ya que CPT1A presenta una afinidad por malonil-CoA unas 15 veces superior en comparación con CPT1B (8).

Los mismos autores que observaron esta variación en la afinidad observaron 4 años más tarde, a través de experimentos de clonación y secuenciación, que CPT1A y CPT1B presentan una alta afinidad de secuencia (13). A pesar de que ambas secuencias fueron

claramente descritas, no se ha conseguido cristalizar ninguna de las dos. La razón por la cual se desconoce la estructura cristalina es que son proteínas integrales de membrana y pierden la función catalítica cuando son solubilizadas (requisito imprescindible para la cristalización). Sin embargo, el análisis de homología de sus secuencias en comparación con la familia de carnitina aciltransferasas (CrAT, COT, CPT2), que son globulares y solubles y para las cuales se han obtenido estructuras cristalinas de alta resolución, han permitido obtener modelos *in silico* de la estructura terciaria de CPT1A (14–16).

Adicionalmente, estudios más profundos sobre la relación estructura-función en CPT1A han demostrado interacciones entre un dominio regulador N-terminal relativamente pequeño (47 residuos) y un dominio catalítico C-terminal grande (unos 610 residuos), los cuales están separados por dos dominios transmembrana y una corta secuencia conectora. Aunque esta estructura terciaria se ha observado para CPT1A, la comunidad científica considera que probablemente las tres isoformas de CPT1 adopten la misma.

Estos hallazgos han favorecido que se conozca con detalle el complejo mecanismo molecular de la sensibilidad de CPT1A a malonil-CoA. Incluso ya se saben los aminoácidos clave del dominio regulador N-terminal que actúan positiva o negativamente en la sensibilidad de CPT1A a este metabolito (17–24)

Además, se han asociado cambios en la sensibilidad de la enzima a malonil-CoA con homo-oligomerización (25,26) o heteroasociación con otras proteínas (27). Estos cambios también dependen de la composición y curvatura de la membrana en la que se encuentra CPT1A (24,28).

Resulta interesante el hecho que las propiedades moleculares de CPT1A le permiten adaptar su función catalítica a las necesidades celulares, por ejemplo, varía en hígado en función de si está en una situación de alimentación o bien en ayuno o en condiciones diabéticas (29–31).

En el caso de CPT1B, aunque también es una proteína integral de la membrana mitocondrial externa, no se observan cambios en función de la sensibilidad a malonil-CoA y presenta siempre una afinidad baja para esta molécula inhibidora (28).

1.3 CPT1C: LA NUEVA ISOFORMA DESCUBIERTA

En 2002, la búsqueda *in silico* en bases de datos basada en la secuencia de CPT1A humana resultó en la identificación de un nuevo gen (12), el cual fue designado como CPT1C debido a su similitud de secuencia con las isoformas CPT1A y CPT1B. La diferencia de secuencia más significativa que se observó fue que CPT1C presenta en el extremo C-terminal una cola de unos 30 aminoácidos aproximadamente (figura 2, A). Además Wolfgang y colaboradores realizaron en el 2006 un estudio sobre el parecido y la identidad de CPT1C respecto las otras isoformas y concluyeron que CPT1C guarda mayor conservación respecto CPT1A que no CPT1B (32) (figura 2, B)

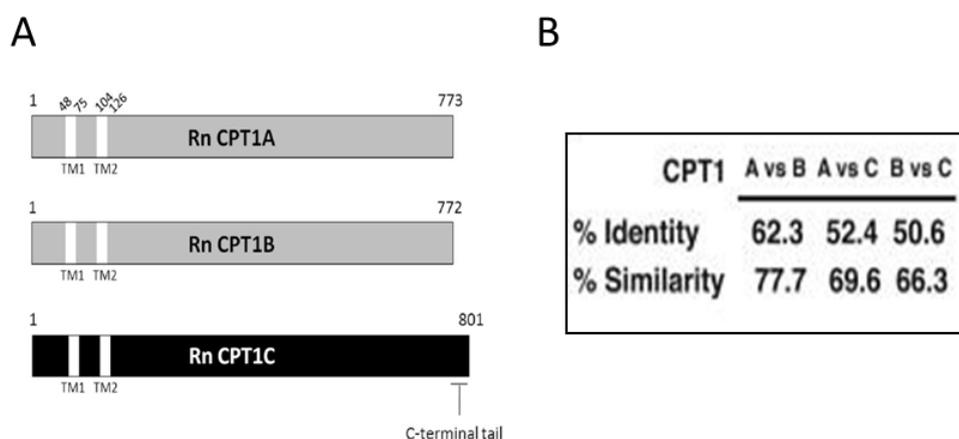


Figura 2. Comparación de las isoformas de CPT1. A) Representación esquemática de CPT1A, CPT1B y CPT1C de rata (Rn) en la que se muestra la cola extra de CPT1C en el extremo C-terminal, los dominios transmembrana (TM1 y TM2) así como la posición de los aminoácidos. B) Comparación de la identidad y la similitud de la secuencia aminoacídica de las tres isoformas de CPT1 (Extraído de Wolfgang et.al., 2006).

2. CPT1C: CARNITINA PALMITOILTRANSFERASA 1C

Desde el descubrimiento de la carnitina palmitoiltransferasa 1C (CPT1C) en 2002 (12) hasta el día de hoy se han hecho grandes avances sobre esta proteína. Así pues, se sabe en qué tejidos se expresa, dónde se localiza, cómo se regula e incluso ya se han averiguado varios procesos en los cuales la CPT1C participa directa o indirectamente.

Dicho esto, a continuación se resume la información aportada hasta la fecha sobre la CPT1C.

2.1 DISTRIBUCIÓN TISULAR Y LOCALIZACIÓN SUBCELULAR

Desde la aparición de esta nueva isoforma de la familia de CPT1, la comunidad científica coincide en que CPT1C se expresa fundamentalmente en cerebro, ya que es en este órgano donde se ha demostrado repetidamente su presencia (12,32–34). Más recientemente, se ha demostrado que CPT1C también se expresa en células tumorales (35), esta aportación en 2011 ha sido clave y esencial para entender la base de este trabajo, en consecuencia, más adelante, se le dedicará un apartado exclusivo para la relación entre CPT1C y células tumorales (sección 2.7).

Es importante tener en cuenta que CPT1C no se expresa en la totalidad del cerebro sino que únicamente se encuentra en neuronas. Esta aportación la produjo nuestro grupo (33) seis años después de su descubrimiento, es decir, en 2008. Para ello, se realizaron estudios de co-localización mediante dos aproximaciones distintas (hibridación *in situ* e inmunohistoquímica) y se demostró que CPT1C es una proteína específica de neuronas y no de astrocitos (figura 3, A).

En relación a la localización subcelular, fue un tema que al principio generó controversia. Price y colaboradores publicaron, al mismo tiempo que el descubrimiento de esta isoforma, su localización en la matriz mitocondrial externa (12). De hecho, parecía lógico teniendo en cuenta que el orgánulo donde se encuentran CPT1A y CPT1B es la mitocondria. Incluso Dai y colaboradores llegaron a confirmar las ideas iniciales de que CPT1C estaba en mitocondria (36). No fue hasta 2008 donde nuestro grupo, a la vez que aportaba que CPT1C estaba en neuronas y no en astrocitos, demostró que CPT1C se localiza en retículo endoplasmático (33). De nuevo, se hicieron dos aproximaciones distintas: por un lado se transfectaron fibroblastos con CPT1A o con CPT1C fusionadas con GFP y se observó claramente que CPT1A co-localizaba con el marcador de mitocondria (mitotracker) mientras que CPT1C co-localizaba con el marcador de retículo endoplasmático (calnexina) (figura 3, B). Por otro lado, se realizaron subfraccionamientos celulares y se detectó por WB que CPT1C estaba en la fracción microsomal y CPT1A en la fracción mitocondrial (figura 3, C).

Actualmente, nadie discute que CPT1C se localiza en retículo endoplasmático aunque no se descarta que en determinadas situaciones pudiera migrar a la mitocondria. Probablemente, esta diferente localización subcelular entre CPT1C y CPT1A/B,

juntamente con la cola adicional en el extremo C-terminal de CPT1C, sea la indicación más clara de que esta proteína tiene una función celular que difiere de las otras dos isoformas.

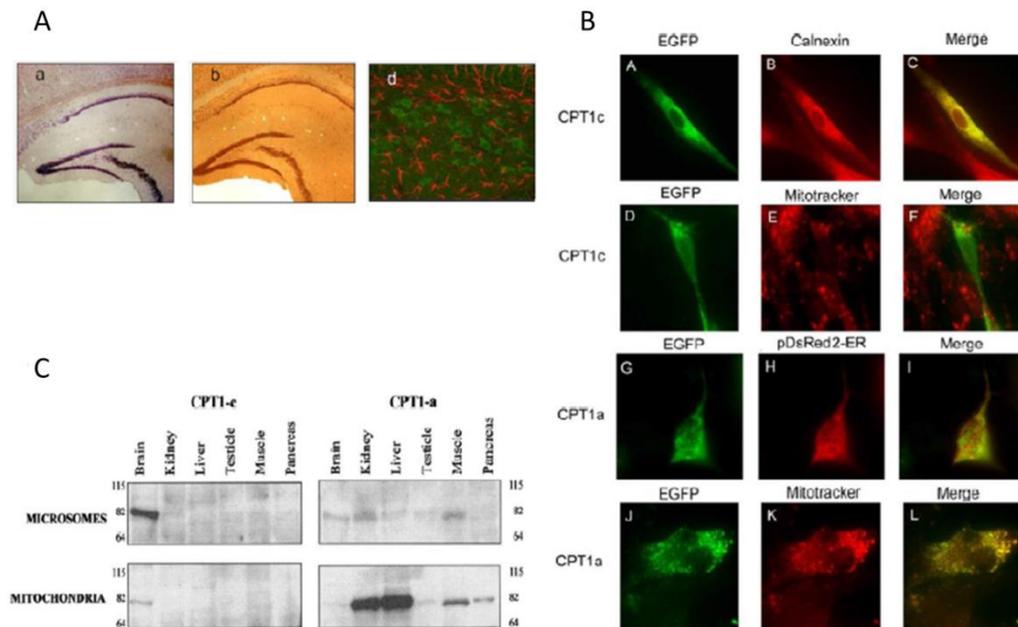


Figura 3. Distribución tisular y localización subcelular de CPT1C. A) Estudios de co-localización del mRNA de CPT1C con las proteínas NeuN y GFAP en secciones de cerebro de ratón. Se realizó hibridación *in situ* con una ribosonda anti-CPT1C (a), una inmunohistoquímica con anticuerpos primarios para NeuN y secundarios biotinilados (b) y doble inmunohistoquímica con anticuerpos para CPT1C (verde) y GFAP (rojo) (d). B) Co-localización de CPT1C-EGFP o CPT1A-EGFP con Calnexina o Mitotracker. C) Western Blot de CPT1C y CPT1A en distintas subfracciones celulares y tejidos. (adaptado de Sierra et al., 2008).

2.2 ACTIVIDAD CATALÍTICA

La actividad catalítica de CPT1C también ha generado mucho debate desde su descubrimiento. A diferencia de la localización subcelular, que está en retículo endoplasmático y ya no hay discusión sobre el tema, en el caso de la actividad sigue habiendo cierta discusión, aunque cada vez menor ya que todos coinciden en que, si tiene, es muy baja.

La discusión cronológica sobre si tiene (o no) actividad catalítica es la siguiente: Primeramente, Price al descubrirla, demostró que CPT1C tiene la misma afinidad por el malonil-CoA que CPT1A (12) (figura 4), sin embargo, no detectó actividad catalítica, un hecho que resultó sorprendente ya que el análisis aminoacídico comparativo entre las tres

isoformas reveló que CPT1C conserva todos los residuos involucrados en la actividad carnitina aciltransferasa, así como el lugar de unión de malonil-CoA.

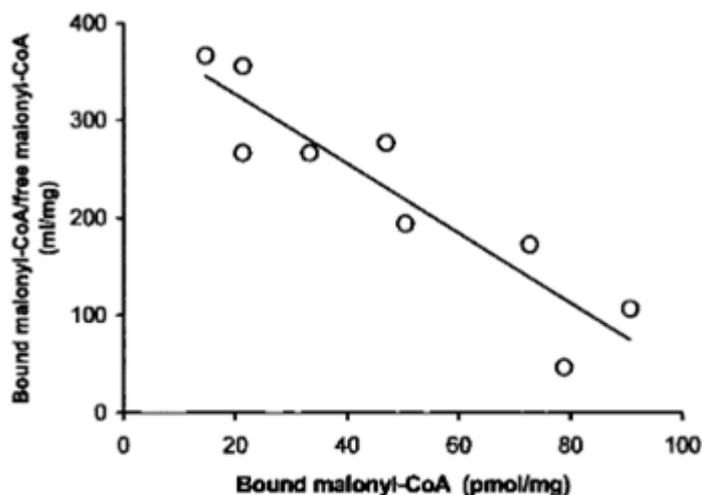


Figura 4. Afinidad de CPT1C por malonil-CoA. (Extraído de Price et. al., 2002).

Más adelante, el grupo de Daniel Lane, mediante ensayos radiométricos con células HEK293T y con aciles-CoA como sustrato más complejos, tampoco fue capaz de detectar actividad catalítica (32). Ellos mismos decidieron aumentar la complejidad utilizando explantes hipotalámicos y corticales de ratones salvajes y deficientes de CPT1C, pero tampoco observaron diferencias CPT1C dependientes (37).

Al mismo tiempo, nuestro grupo, en el mismo estudio que mostró la localización reticular de CPT1C, mostró también, mediante cromatografía líquida en tándem con un espectrómetro de masas (HPLC-ESI-MS/MS) en células PC-12, que CPT1C es capaz de utilizar al palmitoil-CoA como sustrato aunque la eficiencia catalítica es 200 veces inferior a la observada en el caso de CPT1A (figura 5) (33).

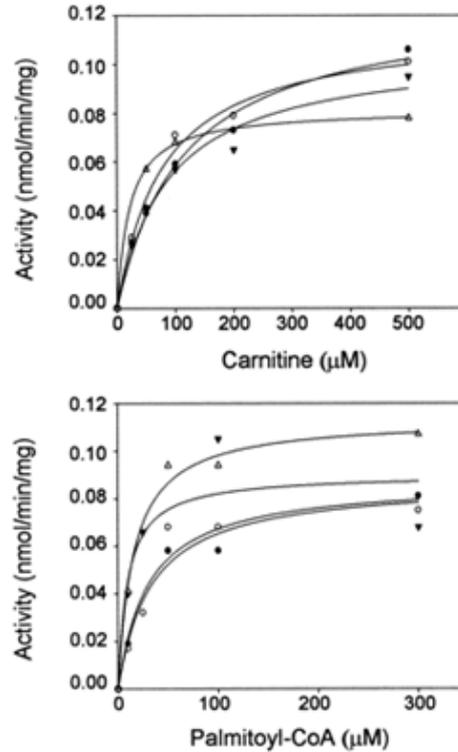


Figura 5. Ensayo de actividad CPT1. Incubación de microsomas de células PC-12 a diferentes concentraciones de carnitina (gráfica superior) y de palmitoil-CoA (gráfica inferior) y medición de actividad CPT1. (Extraído de Sierra et. al., 2008).

De 2008 a 2014 no aparecieron más estudios sobre su actividad y la comunidad científica coincide en que, si presenta actividad carnitilpalmitoiltransferasa, ésta es muy inferior a la de CPT1A y CPT1B.

Hace dos años, se publicó un estudio (38) que ha profundizado en la posible conformación de CPT1C mediante experimentos de resonancia magnética nuclear (RMN). Dicho estudio concluye que, según las condiciones fisiológicas de la célula, el dominio N-terminal de CPT1A (dominio regulador) podría adoptar una conformación $N\alpha$ (inactiva) o $N\beta$ (activa) (figura 6). En cambio, CPT1C estaría permanentemente en un estado $N\alpha$, la cual cosa justificaría la baja actividad catalítica que presenta.

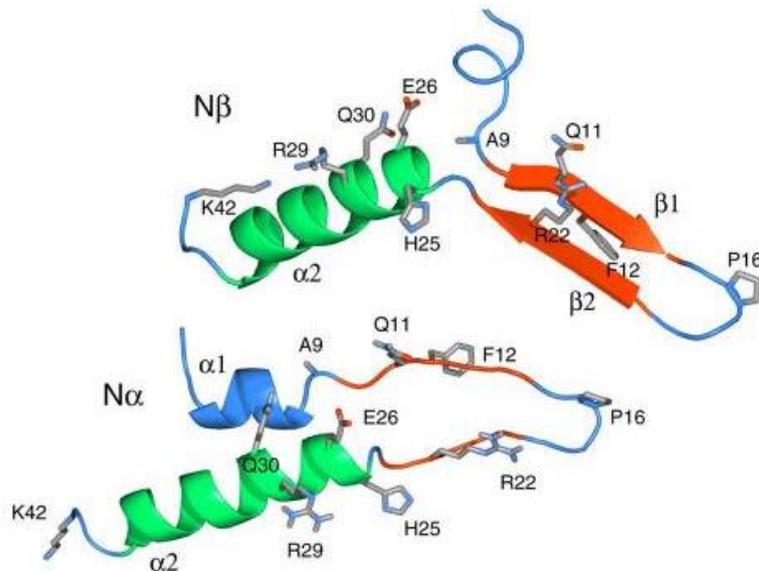


Figura 6. Conformaciones $N\alpha$ y $N\beta$ del dominio regulador de CPT1A. Los aminoácidos que se encuentran sustituidos en CPT1C se muestran representados. (Extraído de Samanta et. al., 2014)

2.3 REGULACIÓN DEL BALANCE ENERGÉTICO

Con el fin de averiguar la función fisiológica de CPT1C, Wolfgang y colaboradores crearon en 2006 el primer modelo animal deficiente de CPT1C (32). Estos animales no manifiestan ninguna anomalía evidente en el desarrollo ni tampoco en la temperatura corporal, aunque presentan una leve disminución del peso corporal y de la ingesta cuando son alimentados con dieta estándar. Sin embargo, cuando son expuestos a dieta rica en grasas, los ratones deficientes de CPT1C (CPT1C KO, del inglés **K**nock**O**ut) son más susceptibles a padecer obesidad, ya que presentan un incremento de peso superior que los ratones salvajes o WT (del inglés *Wild Type*), junto con una menor sensibilidad a la insulina (figura 7).

Estos resultados indican que CPT1C estaría implicada en la patogénesis de la obesidad inducida por la dieta y que esta enzima podría tener un papel protector sobre esta enfermedad.

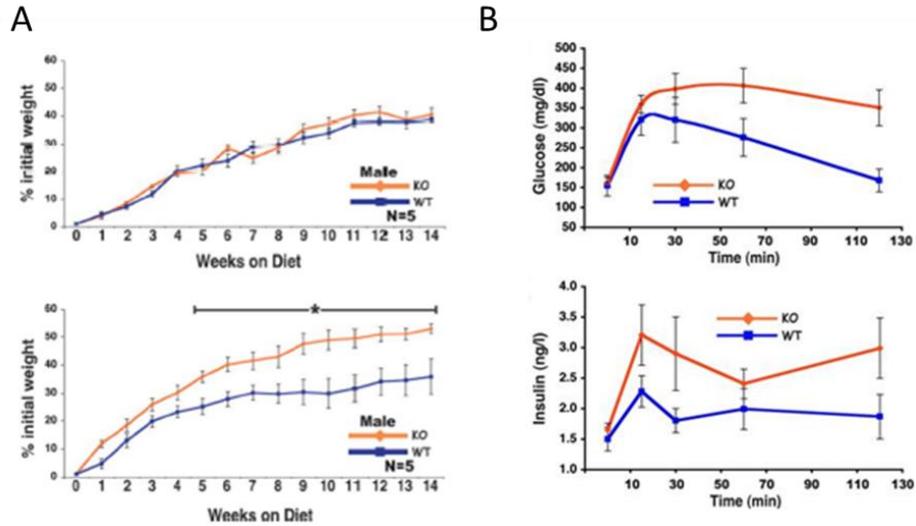


Figura 7. Los ratones CPT1C KO son más susceptibles a los efectos de una dieta alta en grasa. Ratones macho WT y CPT1C KO fueron alimentados con dieta control (10% Kcal provenientes de la grasa) (A, superior) o con dieta rica en grasas (45% Kcal provenientes de la grasa) (A inferior) durante 14 semanas. B) Los ratones alimentados con dieta grasa durante 17 semanas fueron sometidos a una prueba de tolerancia a la glucosa. Los ratones CPT1C KO muestran valores superiores en los niveles de glucosa (superior) e insulina (superior) indicando mayor resistencia a la insulina. (Extraído de Wolfgang *et al.*, 2006)

Resulta sorprendente que cuando se sobre-expresa la CPT1C en el hipotálamo, mediante adenovirus, ésta previene significativamente el aumento de peso causado por una dieta rica en grasas desde el sexto día después de la infección, el cual no está mediado por una reducción de la ingesta (figura 8) (36). Estos nuevos datos muestran que la CPT1C hipotalámica está involucrada en la regulación de la homeostasis energética y, más concretamente, en la regulación del gasto energético.

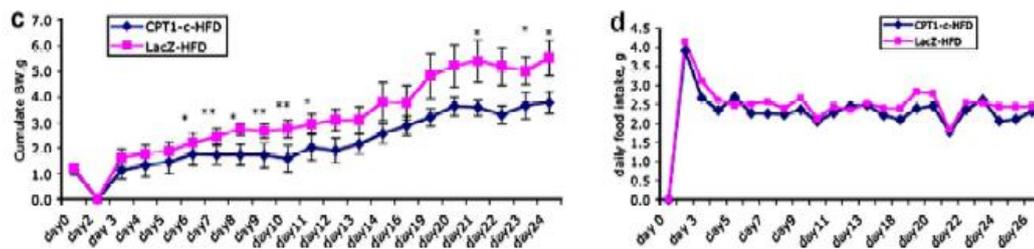


Figura 8. CPT1C protege frente los efectos de la dieta rica en grasa. Efecto de la inyección de adenovirus control (LacZ) o de sobreexpresión de CPT1C en el hipotálamo de ratones alimentados con dieta rica en grasa sobre el peso (c) y la ingesta (d). CPT1C protege frente la ganancia de peso inducida por la dieta, a pesar de no provocar cambios en la ingesta. (Extraído de Dai *et al.*, 2007).

Ya en 2009, un segundo grupo generó otro modelo murino deficiente de CPT1C (34). Estos ratones no presentaban diferencias en el peso ni en la ingesta cuando eran alimentados con dieta estándar, pero al igual que en el modelo anterior, presentaban mayor susceptibilidad a la obesidad. Los ratones CPT1C KO mostraban un incremento de peso mayor que los WT en dieta alta en grasas y además, desarrollaron resistencia a la insulina a las 8 semanas de alimentación grasa en la misma medida que los ratones WT después de 24 semanas, a pesar de que el peso de los ratones CPT1C KO a las ocho semanas era bastante inferior que el peso de los WT a las 24. En este trabajo también se señaló una mayor gluconeogénesis y una menor oxidación de ácidos grasos en hígado y músculo en los ratones CPT1C KO en situación de dieta grasa en comparación con los ratones WT. Estos datos contribuyen a determinar el fenotipo observado en los ratones CPT1C KO e indicarían que CPT1C juega un papel en el mantenimiento de la homeostasis de la glucosa y en la regulación del metabolismo lipídico periférico.

2.4 REGULACIÓN DE LA INGESTA A TRAVÉS DE GRELINA Y LEPTINA

La leptina es un importante regulador fisiológico de la ingesta y el balance energético y una de las acciones que lleva a cabo para ejercer sus efectos anorexigénicos es inducir un aumento en los niveles de malonil-CoA en el núcleo arcuato del hipotálamo (39). El mismo grupo demuestra que la leptina no altera los niveles de AGCL-CoA ni tampoco los de acilcarnitina que como ya se ha descrito son los principales sustratos y productos de la actividad CPT1A. De esta manera, se sugirió que CPT1A no está implicada en la señalización anorexigénica inducida por leptina en el núcleo arcuato (40).

Posteriormente, los mismos autores en colaboración con nuestro grupo de investigación, identificaron el papel de CPT1C en la señalización de la leptina, proceso en el cual está implicada la modulación de los niveles de ceramidas, mediado por CPT1C (41). A partir de los descubrimientos descritos en el trabajo anterior, nuestro grupo se planteó el papel que podría ejercer CPT1C en la señalización de la hormona orexigénica grelina y la implicación de las ceramidas en este proceso. Entre otras aportaciones, se demostró que la CPT1C es imprescindible para el aumento de la síntesis de ceramidas, inducida por la grelina (42).

Este trabajo de nuestro grupo aporta información de interés sobre la regulación de la ingesta y los neuropéptidos por CPT1C pero no se describen aquí con más detalle porque se escapa del tema principal de esta tesis.

2.5 FUNCIÓN MOTORA

Una de las funciones más interesantes que se ha descubierto sobre CPT1C es que su ausencia genera problemas motores. Estos datos fueron obtenidos por nuestro grupo (43) después de llevar a cabo una batería de pruebas neurológicas realizadas a ratones deficientes en CPT1C (CPT1C KO). Una de las pruebas más concluyentes se muestra a continuación (figura 9). Aquí se detallan los resultados obtenidos en el test Rotarod, que consiste en aplicar una velocidad determinada a una rueda giratoria y evaluar el tiempo que el roedor se mantiene sobre ella, y los obtenidos en un test de aceleración sobre el mismo sistema, donde se aumenta progresivamente la velocidad hasta que el animal no es capaz de mantenerse encima de la barra rotatoria.

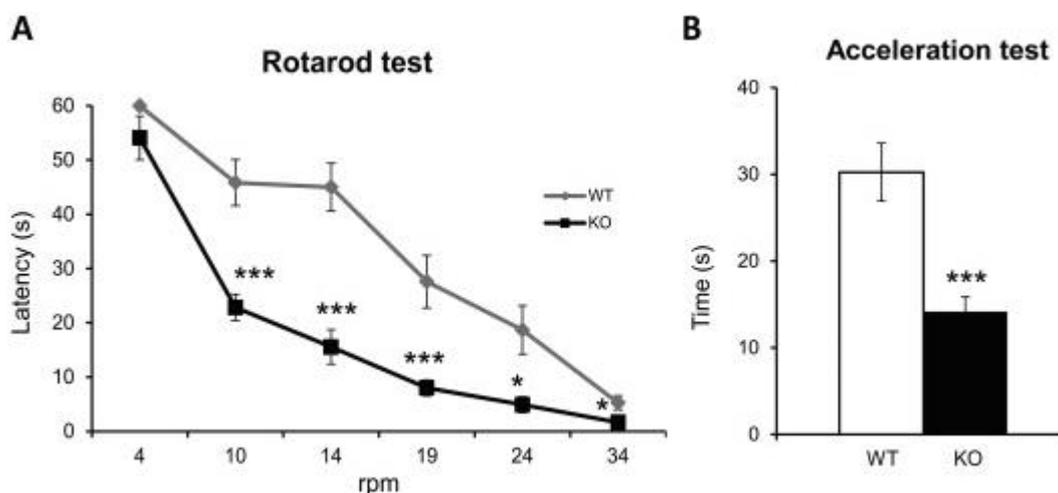


Figura 9. Evaluación de la función motora en ratones WT y CPT1C KO. A) Test Rotarod. Valoración del comportamiento a velocidades rotacionales crecientes. B). Test de aceleración. La velocidad de rotación fue incrementada de 4 a 40rpm durante 1 minuto y se analiza el tiempo que se mantiene sobre la rueda.

Esta misma publicación demuestra que ratones deficientes de CPT1C padecen una debilidad muscular severa y una actividad locomotora diaria disminuida. También se

evaluaron los reflejos sensoriales y la función autónoma pero no se observó ninguna alteración de estos sistemas.

Sí resulta sorprendente que las deficiencias motoras en ratones CPT1C KO están presentes en animales jóvenes (6 semanas) y estas alteraciones incrementan progresivamente con la edad. Además, los análisis de la expresión de CPT1C en regiones motoras cerebrales durante el desarrollo revelaron que los niveles de CPT1C eran bajos en el nacimiento y luego incrementaron rápidamente, llegando a un pico en el día 21, coincidiendo con el día de destete. Esta observación sugiere que CPT1C puede tener un papel clave en la función motora.

También en la misma publicación (43), se muestra que la deficiencia motora y la hipoactividad que causa una ausencia de CPT1C están asociadas con los niveles de ceramidas en distintas regiones cerebrales involucradas en la función motora.

Estas alteraciones en la función motora por parte de CPT1C han adquirido mayor relevancia todavía cuando se ha descubierto que algunos miembros de tres generaciones de una familia del sur de Italia con paraplejía espástica hereditaria, presentaban una mutación en el gen de la CPT1C (44). Dicha enfermedad afecta fundamentalmente a la función motora con parálisis progresiva de las extremidades inferiores y espasticidad. Esta publicación reciente de 2015 muestra el primer caso de una enfermedad humana relacionada con una mutación en el gen de la CPT1C.

Estos mismos autores también describen por primera vez una proteína que interacciona con CPT1C: Atlastina-1 (44), una de las proteínas más frecuentemente mutadas en pacientes con paraplejía espástica hereditaria (45).

2.6 MADURACIÓN DE ESPINAS DENDRÍTICAS Y COGNICIÓN

Estudios en nuestro grupo, mediante cultivos primarios de neuronas hipocampales, demostraron que los ratones deficientes de CPT1C tenían alterada la morfología de las espinas dendríticas ya que mostraban un incremento de las espinas inmaduras o filopodios y una disminución de las espinas maduras o en forma de seta (figura 10, A). Y lo que resultó más interesante es que la sobre-expresión de CPT1C revertía el fenotipo inmaduro

de las espinas dendríticas de los ratones KO de CPT1C indicando así su rol en la maduración (46).

En concordancia con estos resultados, mediante el test del laberinto de agua de Morris (Morris Water Maze, (MWM)), se demostró que los ratones CPT1C KO presentan una deficiencia en el aprendizaje espacial (figura 10, B).

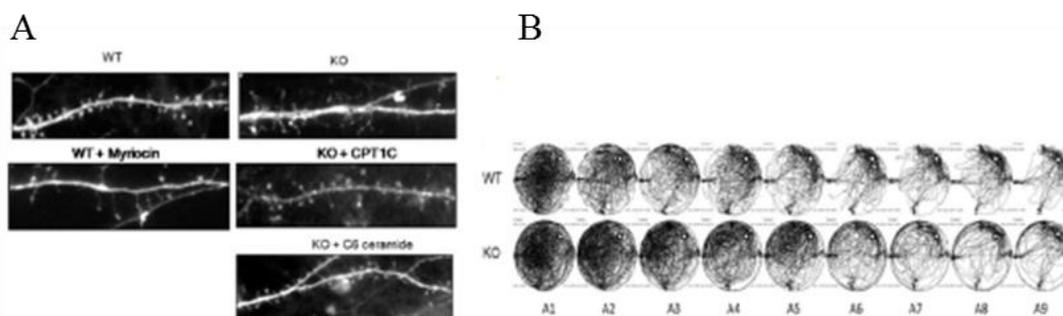


Figura 10. La CPT1C es necesaria para la maduración de las espinas dendríticas y el aprendizaje espacial. A). El tratamiento con miriocina de neuronas de ratones WT perturba la maduración de las espinas dendríticas, mientras que la administración del análogo de ceramida Cer-C6 revierte el fenotipo de espinas inmaduras de los ratones CPT1C KO **B).** Los ratones CPT1C KO presentan déficits en el aprendizaje espacial evaluado por el laberinto de agua de Morris (MWM). (Extraído de Carrasco et al., 2012).

2.7 CPT1C Y CÁNCER

Probablemente, la relación entre CPT1C y cáncer sea la razón que da sentido a este trabajo y sobre la cual se haya edificado el proyecto que se detalla.

Actualmente no resulta complejo encontrar datos sobre CPT1C en humanos ya que se han diseñado varios estudios; destaca especialmente el trabajo de Rinaldi y colaboradores en 2015 sobre la paraplejia espástica hereditaria en una familia italiana (44). Hasta 2011 había muy pocos estudios, se podría señalar el de Roomets y colaboradores en 2008 (47) en el cual asociaban CPT1A y CPT1C con una retinopatía. Así pues, fue en 2011 cuando un grupo canadiense dirigido por TW Mak y llevado a cabo por K Zaugg, entre otros, descubrió que CPT1C humana promovía la supervivencia de las células cancerosas y el crecimiento tumoral en condiciones de estrés metabólico (35). Analizaron tumores humanos y observaron que los niveles de CPT1C estaban muy elevados, especialmente en pacientes con cáncer de pulmón.

Un año más tarde, Reilly y colaboradores, que también habían participado en el hallazgo anterior, publicaron que CPT1C se expresa en muchos tipos de tumores (48) tal y como se muestra en el gráfico siguiente (figura 11), donde destaca especialmente la alta cantidad de RNA mensajero de CPT1C en tumores relacionados con el sistema nervioso central y en sarcomas, es decir, en los tumores muy virulentos. Así pues, desde 2011 se sabe que CPT1C, además de expresarse en neuronas, se expresa también en una amplia variedad de células tumorales.

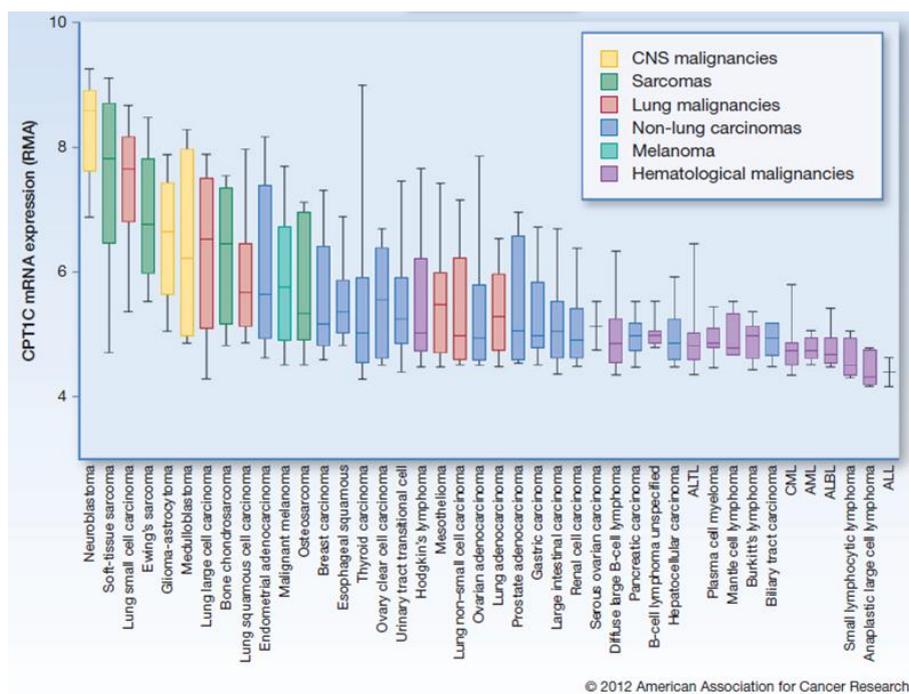


Figura 11. Niveles de expresión de mRNA de CPT1C. CPT1C se expresa en gran cantidad de tumores, especialmente en los relacionados con sistema nervioso central, sarcomas y enfermedades de pulmón. (Extraído de Reilly et. al., 2012)

En el primer estudio (35) Zaugg y colaboradores mostraron que la expresión de CPT1C correlaciona inversamente con la activación de mTOR y protege a las células tumorales frente al tratamiento con rapamicina en tumores primarios murinos.

Por lo que se refiere a MCF-7, una línea tumoral de cáncer de pecho humano, observaron que sobre-expresar la CPT1C humana conllevaba un aumento de la oxidación de ácidos y de la producción de ATP. Adicionalmente, esta sobre-expresión protegía las células tumorales MCF-7 en situación de estrés metabólico, como puede ser la ausencia de glucosa o de oxígeno (hipoxia) tal y como indica la figura 12.

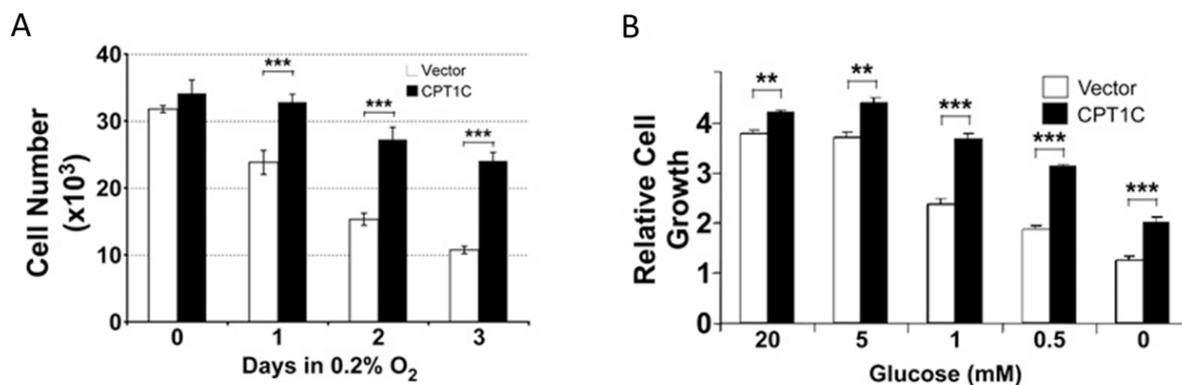


Figura 12. Efecto protector de CPT1C. Comparación de la proliferación celular entre células MCF-7 y células MCF-7 que sobre-expresan la CPT1C A) a lo largo de los días en situación de hipoxia y B) en situación de hipoglucemia. (Extraído de Zugg et. al., 2011)

A continuación, corroboraron este mismo resultado mediante la inhibición de CPT1C con dos RNA de interferencia (siRNA) en la línea tumoral humana de cáncer de próstata PC3.

Por otro lado, concluyeron que cuando se inducía un estado de hipoxia o de privación de glucosa, incrementaba también la expresión de CPT1C, la cual estaría regulada por AMPK (del inglés **AMP**-Activated Protein **K**inase).

Todos estos datos muestran que CPT1C participa en un mecanismo novedoso y distinto al descrito hasta el momento para conferir protección a las células tumorales.

3. CÉLULAS MADRE

3.1 ORÍGENES

Hoy en día, el término “stem cell” está muy utilizado y resulta cotidiano cuando se habla de células madre pero sus orígenes datan de 1868 cuando el zoólogo alemán Ernst Haeckel definió a los órganos unicelulares (o protozoos) que, según él, eran los antepasados filogenéticos de los organismos multicelulares, como “Stammzellen”. A lo largo del siglo XIX este concepto fue evolucionando y hasta hace unos 35 años era un campo de investigación interesante pero sin mayor trascendencia.

La gran revolución surgió en 1981 cuando se consiguió aislar y cultivar por primera vez células madre embrionarias (ESC, del inglés **E**mbryonic **S**tem **C**ell) a partir de la masa celular interna del blastocisto de ratón (49,50). Este es el punto en el cual se sentaron las bases metodológicas que darían lugar al establecimiento de la primera línea celular humana de ESC (51).

Durante los últimos 15-20 años, la investigación en células madre no ha parado de crecer, pero el gran hito llegó en 2007. Gracias a la identificación de los principales genes implicados en el mantenimiento de las características de estas células, Takahashi generó células pluripotentes similares a las ESC a partir de células diferenciadas somáticas humanas sobre-expresando únicamente cuatro factores de transcripción (52). Estas nuevas células se denominan células madre pluripotentes inducidas (iPS, del inglés **I**nduced **P**luripotent **S**tem **C**ell).

Este trabajo llevado a cabo por Takahashi y dirigido por Shin'ya Yamanaka culminó con el Premio Nobel de Fisiología y Medicina en el 2012 para Yamanaka.

3.2 CARACTERÍSTICAS

Las células madre son células que están presentes en todos los organismos multicelulares. Se definen en sus orígenes como células indiferenciadas con capacidad ilimitada de auto-renovación, a lo largo de toda la vida del individuo, y que pueden diferenciarse en una amplia gama de tipos celulares (53,54). Como todo concepto, va sufriendo ligeras modificaciones a lo largo de los años pero toda célula madre debe tener capacidad de auto-renovarse. Si esta condición no se cumple, ya no se considera célula madre. En referencia a las células adultas, para ser considerada célula madre debe cumplir estas cuatro características:

1. Tiene que ser capaz de **auto-renovarse**. Al menos una de las células hija de la célula madre será una célula madre, de tal forma que el número de células madre, a lo largo de nuestra vida, más o menos se mantiene constante. Lo que cambia con los años es su funcionalidad/actividad, ésta es la única característica que comparte con las células madre embrionarias.

2. Tiene que ser capaz de mantener la **homeostasis tisular**. Tiene que haber un equilibrio entre el número de células perdidas por los tejidos a lo largo del día y las células nuevas del tejido que se generan a partir de células madre. Existe una gran cantidad de complejas rutas que modulan la diferenciación (55–57).
3. Tiene que ser capaz de percibir un tejido dañado y de **repararlo**. Debe reconocer un daño celular como un corte o herida en la piel y repararlo.
4. Tiene que ser capaz de **adaptarse a cambios** externos e internos. Debe tener adaptabilidad a las situaciones nuevas como la aparición de nuevos patógenos.

3.3 TIPOS

La clasificación de las células madre se suele realizar en función de su potencial de diferenciación y/o en función de su origen.

3.3.1 CLASIFICACIÓN EN FUNCIÓN DE SU POTENCIAL DE DIFERENCIACIÓN

A lo largo del proceso de diferenciación, una célula madre va adquiriendo una función especializada hasta alcanzar un estado diferenciado específico y, por lo tanto, pierde su capacidad de generar distintos tipos celulares.

Entonces, según el potencial de diferenciación se dividen, a grandes rasgos, en totipotentes, pluripotentes, multipotentes o unipotentes.

Hay quien también utiliza el término oligopotente para referirse a células que se diferencian a unos tipos celulares estrechamente relacionados (58) como, por ejemplo, considerar las células mieloides y linfoides ya que solo se diferencian a un subconjunto de células en particular (59) pero no se acostumbra a utilizar este término.

1. **Totipotente**: Puede generar cualquier célula diferenciada de las tres capas germinales (ectodermo, mesodermo y endodermo) y tejidos extraembrionarios como la placenta. Estrictamente, la única célula que se considera célula totipotente es el cigoto (58) y, en todo caso, las primeras fases de división hasta tener 8-16 células (mórula).

2. **Pluripotente:** Generan células de las tres capas germinales pero no extraembrionarias y no pueden dar lugar a un individuo completo. Básicamente, se consideran células madre pluripotentes a las células madre embrionarias (ESC). En realidad, hoy en día, también podemos llamar pluripotentes a las iPS pero como ya se ha detallado anteriormente son células pluripotentes inducidas, con lo cual, no lo son de manera natural sino que son células diferenciadas somáticas reprogramadas. En esta categoría también se puede incluir un tipo de células madre de la pulpa dental descritas en 2012 (60) que, de manera natural, poseen las características de células pluripotentes. No son las únicas células adultas con cualidades de pluripotencia ya que también existen las VSEL (**V**ery **S**mall **E**mbrionic-**L**ike) (61) o las MAPC (**M**ultipotent **A**dult **P**rogenitor **C**ells) (62), entre otras.
3. **Multipotente:** Estas células pueden diferenciarse a cualquier célula de su capa germinal. Por ejemplo, las células madre hematopoyéticas son multipotentes ya que pueden diferenciarse a cualquier célula madre sanguínea o las células madre mesenquimales son multipotentes porque pueden dar lugar a osteoblastos, adipocitos y condrocitos.
4. **Unipotente:** Solo puede diferenciarse en un único tipo de célula concreto como las células madre musculares (58).

3.3.2 CLASIFICACIÓN EN FUNCIÓN DE SU ORIGEN

Existe una gran diversidad de opiniones sobre la clasificación en función del origen de las células madre, generalmente se suelen dividir entre embrionarias (ESC), adultas (ASC) o pluripotentes inducidas (iPS). Aun así, hay bastantes autores que consideran que a la hora de clasificarlas hay que categorizar en cinco apartados, ya que se incluirían en este caso, por separado, las fetales y las perinatales.

Brevemente, las fetales tienen menor potencial de diferenciación que las embrionarias (ESC) y están presentes durante el desarrollo fetal. Estas células madre proceden del feto, se obtienen de embarazos interrumpidos y su aislamiento y utilización depende de la regulación de cada país. Muchas líneas de células madre neuronales tienen este origen y se han probado en ensayos clínicos (58).

Se consideran perinatales las células madre presentes en tejidos extraembrionarios que se forman durante el desarrollo del embrión, como serían el fluido amniótico, la placenta y el cordón umbilical (58). En estos tejidos se han encontrado células con cualidades parecidas a las células madre mesenquimales (MSC, del inglés **M**esenchymal **S**tem **C**ells) (63).

Si hacemos caso a la clasificación más clásica, tenemos:

1. **Embrionarias (ESC):** Las células madre embrionarias derivan de un estado temprano del embrión. Cuando se fertiliza un óvulo con un espermatozoide se obtiene el cigoto. El cigoto se empieza a dividir aproximadamente 30 horas después de ser fertilizado y el tercer o cuarto día el embrión es una bola compacta de 12 células o más y pasa a denominarse mórula. Cinco o seis días después de la fertilización y tras varios ciclos de división celular, la mórula empieza a especializarse dando lugar a una esfera hueca de células llamada blastocisto (64), este término se suele aplicar cuando contiene 64 células o más. La capa externa del blastocisto se llama trofoblasto y el clúster de células interno de la esfera se llama masa celular interna. En este estado, hay unas 70 células trofoblásticas y unas 30 células en la masa celular interna. Estas células de la masa celular interna son las conocidas como células madre embrionarias (ESC), las cuales son pluripotentes y pueden dar lugar a las tres capas germinales (ectodermo, mesodermo y endodermo) del embrión (58,65,66).

En 1998 Thomson y colaboradores descubrieron un método para mantener ESC derivadas de la masa células interna de los blastocistos humanos *in vitro*, mediante su cultivo sobre fibroblastos embrionarios de ratón, a esta capa de células se la conoce como “feeder-layer” (51). Este descubrimiento permitía estudiar fármacos, evaluar el desarrollo de diferentes enfermedades o como modelo para regeneración tisular (67) pero tenía un gran inconveniente y es que requería utilizar embriones humanos.

Además de este gran obstáculo, presentaba otros distintos a tener en cuenta:

- A) Limitada accesibilidad
- B) El riesgo de formación de teratomas
- C) Obtener células diferenciadas a un linaje celular puro
- D) Rechazo post-trasplante al ser un trasplante alogénico
- E) Riesgo derivado del empleo de fuentes animales para su cultivo

Muchos grupos de investigación enfocaron sus estudios en perfeccionar el mantenimiento de ESC sin la necesidad de utilizar fuentes animales en los cultivos. Las estrategias fueron o bien utilizar “feeder-layer” de origen humano (68–70) o directamente emplear cultivos libres de “feeder-layer” (71–74).

2. **Adultas (ASC):** Las células madre adultas (ASC) son células indiferenciadas, auto-renovables y capaces de diferenciarse a un determinado tipo de células. Se localizan en varios tejidos del individuo a lo largo de su vida, participan en su homeostasis, median el continuo reemplazamiento de células diferenciadas y se mantienen quiescentes para responder a señales de lesión de tejido y así poder regenerarlo (75).

Las primeras ASC que se descubrieron fueron en 1968 por Friedenstein y colaboradores (76), las cuales eran células mesenquimales de la médula ósea que eran capaces de diferenciarse a hueso. Hoy en día, la médula ósea es una de las principales fuentes de obtención de células madre adultas, dentro de la médula encontramos dos tipos de ASC:

A) Hematopoyéticas: Capaces de generar todo tipo de células sanguíneas.

B) Mesenquimales: Dan lugar a hueso, adipocito y cartílago (77)

Estas células madre mesenquimales han sido estudiadas en gran profundidad ya que han generado mucho interés en el campo de la medicina regenerativa. Se sabe (77) que se pueden movilizar a la circulación y participar en la regeneración de tejidos tras producirse una lesión. La manera en que lo hacen suele ser diferenciándose a células maduras o renovando las células madre del tejido, secretando factores que inducen la proliferación y/o diferenciación de las células madre que residen en el tejido, secretando factores anti-apoptóticos que favorecen la supervivencia de las células dañadas o bien regulando el sistema inmune alterando la producción de citoquinas.

Otra fuente importante de células madre adultas (ASC) es el tejido adiposo, donde se encuentran también células madre mesenquimales. Éstas poseen cualidades muy similares a las MSC de la médula ósea (78,79) y aunque muestran algunas diferencias a las de la médula, el potencial clínico es similar (80).

A pesar de tener un potencial clínico similar sí es cierto que, a nivel de investigación biomédica, las de tejido adiposo tienen algunas ventajas como que el

tejido adiposo es muy abundante, puede ser obtenido en grandes cantidades a través de un proceso quirúrgico simple con muy poco riesgo para el paciente, al poder aislarse del propio individuo permite su trasplante autólogo y pueden ser cultivadas y manipuladas de acuerdo a las guías de buenas prácticas de fabricación (GMP) (81).

Aparte de médula ósea y tejido adiposo, existen ASC en gran cantidad de tejidos como cerebro, músculo, piel, cordón umbilical, pulpa dental, páncreas o intestino (81,82). Conviene decir que estas células madre que se encuentran en distintos tejidos se localizan en nichos que les proporcionan un microambiente especial para su regulación y su mantenimiento como célula madre (83,84).

3. **Pluripotentes inducidas (iPS):** Estas células son pluripotentes así que pueden dar lugar a cualquier célula de las tres capas germinales pero se obtienen a base de reprogramar células diferenciadas obteniendo así células muy similares a las ESC (85), tan similares que se obtuvieron ratones viables derivados de células iPS (86,87).

Esto se consiguió ya que tres años antes, en el año 2006, Takahashi y Yamanaka identificaron cuatro factores transcripcionales (OCT3/4, SOX2, KLF4 y c-MYC) como los responsables del mantenimiento de las características pluripotenciales de las ESC. Además, introduciendo únicamente estos cuatro en fibroblastos de ratón consiguieron establecer la primera línea celular pluripotente a partir de células diferenciadas y convirtiéndose en las primeras iPS (88). Un año después, se consiguió generar células iPS humanas a partir de células somáticas maduras (52,89). A lo largo de 2008 y 2009 ya se obtuvieron células iPS con únicamente uno o varios de los cuatro factores (90–92).

Debido a su gran posibilidad para evaluar enfermedades e incluso fármacos para cada paciente posibilitando así la medicina personalizada (esto no se puede realizar con ESC), el avance de este campo ha sido espectacular. Sin embargo, también tienen algunos problemas, como que ya se ha demostrado que pueden ser rechazadas inmunológicamente (93), que su diferenciación posterior es complicada y existe riesgo de teratomas (94).

3.4 CÉLULAS MADRE DE LA PULPA DENTAL

Debido a las ventajas expuestas en el apartado anterior, se han utilizado células madre de la pulpa dental.

La pulpa dental es un tejido conectivo laxo que alberga varios tipos de células madre. La comunidad científica considera que deben provenir de las células de la cresta neural migratorias durante el desarrollo (95). Desde que se aislaron por primera vez en el año 2000 (96), se han descrito varios tipos de células madre adultas de los dientes: de la pulpa dental (DPSC, del inglés **D**ental **P**ulp **S**tem **C**ells), de los dientes deciduos exfoliados (SHEDs, del inglés **S**tem **C**ells from **H**uman **E**xfoliated **D**eciduous **T**eeth), del ligamento periodontal (PDLSC, del inglés **P**eriodontal **L**igament **S**tem **C**ells), de las células precursoras del folículo dental (DFPCs, del inglés **D**ental **F**ollicle **P**recursor **C**ells) y de la papila apical (SCAPs, del inglés **S**tem **C**ells from **A**pical **P**apilla) (96–100).

Estas poblaciones de células madre post-natales poseen características muy similares a las células madre mesenquimales (MSC), como la diferenciación a osteoblastos o condroblastos.

Las DPSC se aíslan con bastante éxito mediante digestión enzimática de la pulpa dental y morfológicamente son muy parecidas a los fibroblastos y, comparadas con otras células madre de los dientes, son bastante proliferativas. Poseen propiedades inmunosupresoras y expresan marcadores como CD73, CD44 o Stro-1 pero no expresan CD24 ni CD34. Estas células representan menos del 1% del total de la población celular presente en la pulpa dental (101).

Este trabajo se ha llevado a cabo con estas células madre mesenquimales (DPSC). Hasta hace poco se les llamaba así porque se desconocían células madre en la pulpa dental con mayor potencial pero, tal y como se comentará a continuación, en 2012 se descubrió un nuevo tipo que poseen cualidades de células pluripotentes (DPPSC). Así pues, actualmente, a las DPSC se les denomina también DPMSC (del inglés, **D**ental **P**ulp **M**esenchymal **S**tem **C**ells) para distinguir las clásicas mesenquimales/ multipotentes de las “pluripotentes”.

3.5 DENTAL PULP PLURIPOTENT-LIKE STEM CELLS

Si bien estas células solo se han utilizado en experimentos muy iniciales, creo que merecen ser brevemente detalladas por ser las células madre de la pulpa dental con un futuro más prometedor.

En 2012, Atari y colaboradores descubrieron una nueva población de células madre adultas llamadas DPPSC (del inglés **D**ental **P**ulp **P**luripotent-like **S**tem **C**ells) (60). Estas células se aislaron de la pulpa dental del tercer molar, expresan marcadores de pluripotencia como OCT4, NANOG y SOX2 y tienen características de células embrionarias, siendo pues capaces de diferenciarse a células de cualquier capa germinal.

Las DPPSC no son las primeras células madre adultas que se aíslan que presentan cualidades de pluripotentes. En este sentido, ya se han identificado varios tipos en los últimos años. Algunos ejemplos serían las MIAMI (**M**arrow-**I**solated **A**dult **M**ultilineage **I**nducible) (102), las VSEL (**V**ery **S**mall **E**mryonic-**L**ike) (61), MAPC (**M**ultipotent **A**dult **P**rogenitor **C**ells) (62) o las MPC (**M**esodermal **P**rogenitor **C**ells) (103).

Una de las principales ventajas de las DPPSC comparadas con otras células es que el tercer molar (o muela del juicio) es una fuente de células muy accesible porque la extracción del diente es una técnica muy usual y, a menudo, estos dientes son considerados como deshecho. Este diente es el último que se desarrolla en humanos y permite obtener una gran cantidad de tejido de pulpa dental para el posterior aislamiento de células madre. A diferencia de otras células madre, el porcentaje de DPPSC disminuye con la edad pero siempre hay una población celular suficiente, incluso en ancianos (60).

Si bien la obtención y el aislamiento de las DPPSC es muy similar al de las DPMSC, el medio de crecimiento de las DPPSC es más complejo ya que requiere factores de crecimiento como EGF, PDGF o LIF, entre otros. Además deben ser sembradas a una densidad muy baja (80-100 células/cm²), siendo pues re-sembradas cada 36-48h (104)

Los factores que mantienen a las DPPSC en un estado de pluripotencia tan similar a las ESC todavía son desconocidos y actualmente están en proceso de investigación. A pesar de ello, están adquiriendo bastante importancia de cara a estudios de medicina regenerativa y ya se han comparado estas DPPSC con otras fuentes de células madre. Se ha demostrado que las DPPSC tienen mayor capacidad para generar células de hueso que las

DPMSC (105) y, además, no se han observado alteraciones cromosómicas cuando las DPPSC se han cultivado *in vitro* (60).

3.6 TERAPIA CELULAR Y MEDICINA REGENERATIVA

Los orígenes de la terapia celular datan del siglo XVII cuando, entre 1656 y 1668, aparecieron los primeros estudios sobre transfusión de sangre entre animales y seres humanos. Estos hallazgos los llevaron a cabo los científicos Richard Lower y Jean-Baptiste Denys (106) y se considera la transfusión sanguínea como una manera de terapia celular. Ya en 1912, el médico alemán Kuettner empleó las primeras células no sanguíneas, concretamente, inyectó células tiroideas para tratar a niños que padecían hipotiroidismo, estableciendo así las bases de la terapia celular.

A pesar de estos hechos, Paul Nihans es considerado como el padre de la terapia celular por su descubrimiento en 1931. Este médico suizo disgregó en pequeños trozos la glándula paratiroides extraída de un animal, mezcló los fragmentos en solución salina y los inyectó en el cuello de un paciente, consiguiendo la completa recuperación de la glándula paratiroides. De esta manera, demostró que era posible trasplantar células frescas para la regeneración tisular y recogió sus trabajos en un libro en 1960.

Gracias a la evolución sobre los mecanismos responsables de la respuesta inmune, hoy en día, se extraen células madre autólogas y se trasplantan en el propio individuo sin riesgo de rechazo inmunológico. Este es el gran avance de la terapia celular.

Así pues, se puede definir la terapia celular como el proceso de introducir nuevas células en un tejido para poder tratar una enfermedad. Es evidente que las células son la herramienta clave de la medicina regenerativa, pero existe una gran variedad de fuentes celulares y, para su aplicación clínica, es importante considerar su origen. Así pues, las ESC y las iPS tienen mayor potencial de diferenciación que las células madre de otros orígenes, pero muestran mayor riesgo de formación de teratomas y, además, las ESC solo pueden utilizarse para trasplantes alogénicos (94).

Por lo que se refiere a la ingeniería de tejidos (o tisular), se define como el uso de una combinación de células, ingeniería, materiales y métodos para la fabricación *ex vivo* de

tejidos u órganos vivos que pueden ser implantados para mejorar o reemplazar las funciones biológicas (107)

Los primeros avances datan de 1933 cuando Bisceglie demostró que con una membrana de polímero era capaz de envolver células tumorales de ratón con el fin de protegerlas del ataque del sistema inmune al ser implantadas en un cerdo. El uso de biomateriales para aplicarlos en medicina regenerativa empezó alrededor de 1980 cuando se desarrollaron estructuras bidimensionales de colágeno para el trasplante de injertos de piel (108,109). Y el paso crucial fue el desarrollo de estructuras tridimensionales de materiales biocompatibles, como los “scaffolds”, que permiten el crecimiento de un gran número de células, mejoran la resistencia e incorporan propiedades de reconocimiento celular, dando lugar a la creación de tejidos en tres dimensiones (110).

La medicina regenerativa es el proceso para reemplazar o regenerar las células con el fin de recuperar la función perdida. Es importante considerar que esta amplia rama de la biomedicina se basa en el empleo de los mismos mecanismos que el propio organismo utiliza para su auto-reparación. Así pues, es de suma importancia conocer el proceso de aislamiento y diferenciación de las células madre, saber los mecanismos que median su migración y cómo se integran en los tejidos dañados para recuperar su funcionalidad (111).

Como resumen, podemos afirmar que la medicina regenerativa hace uso de la terapia celular y la ingeniería de tejidos con el objetivo de mejorar la calidad de vida del paciente.

Recientemente, se han llevado a cabo ensayos clínicos para el tratamiento de patologías mediante el trasplante de células madre. Por ejemplo, se han hecho ensayos para la insuficiencia cardíaca con trasplantes alogénicos utilizando células madre fetales, para la osteoartritis con células madre de la médula ósea con trasplantes autólogos (112), incluso para Parkinson procedentes también de la médula ósea con trasplantes autólogos (113).

Una prueba del interés que suscita esta nueva rama de la medicina es el incremento del número de publicaciones en la última década (figura 13).

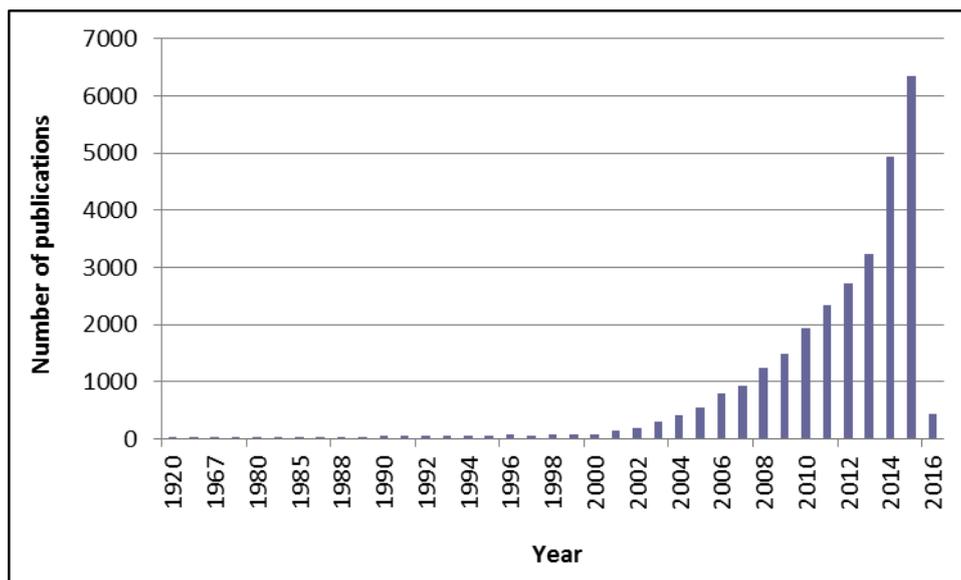


Figura 13. Número de publicaciones encontradas en PubMed introduciendo las palabras “Regenerative Medicine”. Datos actualizados hasta Enero 2016

3.7 CÁNCER

El término “cáncer” abarca un campo extremadamente amplio. Existen multitud de grupos de investigación enfocados a averiguar por qué se produce, cómo, qué rutas se activan, qué convierte una célula en célula tumoral, por qué un tipo de cáncer se desarrolla en un tejido específico, cuáles son las causas de la metástasis, qué tratamientos son eficaces y podemos añadir un largo etcétera. Así pues, cualquier explicación que aquí se pueda detallar resultará simplista y poco profunda.

Lo único que se pretende en este apartado es establecer una relación entre las células tumorales y las células madre. Esta relación nos permitirá entender por qué se ha realizado este trabajo con células madre y por qué nos lo planteamos al inicio de este bonito camino cuando Zaugg y colaboradores demostraron que la CPT1C promovía la supervivencia tumoral en situación de estrés metabólico (35).

Podríamos definir el cáncer como una enfermedad caracterizada por un crecimiento anormal e incontrolado de las células de un tejido u órgano que modifican su metabolismo y que pueden llegar a propagarse a otros órganos, a través del sistema linfático y la circulación sanguínea, mediante un proceso conocido como metástasis.

Los tipos de cáncer más frecuentes difieren muchos entre países desarrollados y países en vías de desarrollo y entre hombres y mujeres (figura 14), pero los de mayor incidencia a nivel mundial son el de pulmón, el de mama, el colorrectal, el de estómago y el de próstata (114).

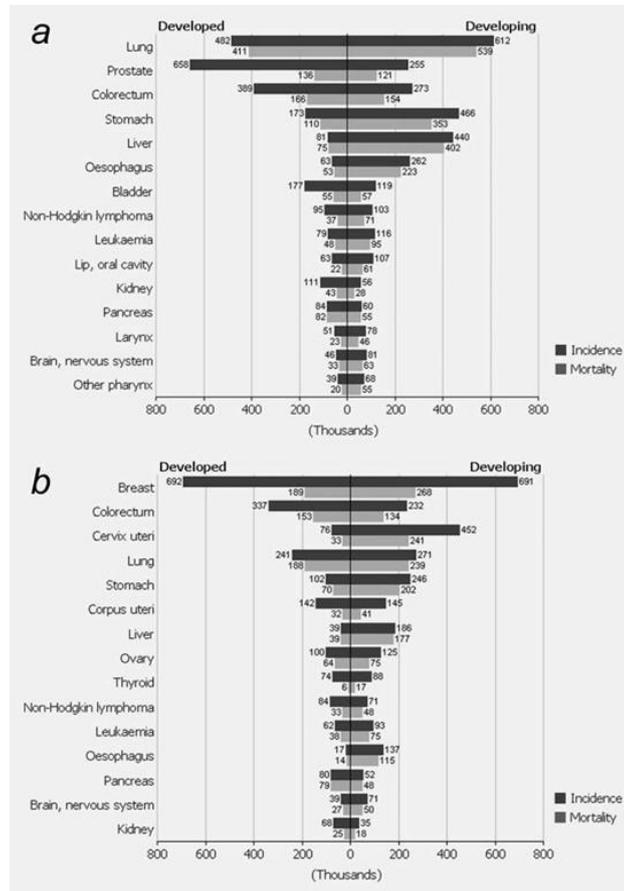


Figura 14. Número estimado (en millares) de nuevos casos (incidencias) y muertes (mortalidad) regiones desarrolladas y/o envías desarrollo en el 2008 en A) Hombres y B) Mujeres. Extraído de Ferlay et.al., 2008)

Su incidencia ha ido aumentando en los últimos años y seguirá ascendiendo debido al crecimiento de la población mundial ya que, como dijo el científico Joan Massagué en 2013, “mientras haya vida, habrá cáncer, es el precio que pagamos por estar vivos”.

Esta transformación de una célula sana a una célula tumoral es debida al resultado de la interacción entre factores genéticos y factores ambientales (115), tales como la radiación ultravioleta, la exposición a agentes tóxicos, el tabaco o algunas infecciones víricas. Esta transformación es conocida como carcinogénesis.

3.8 CARCINOGENESIS

La carcinogénesis se define como un proceso escalonado durante el cual las células experimentan profundos cambios (tanto metabólicos como de comportamiento) que conducen a una proliferación excesiva permitiéndoles escapar de la acción del sistema inmune y finalmente invadir tejidos distantes para formar metástasis (116).

Como ya se ha descrito anteriormente, existe una gran variedad de razones por las cuales se puede producir este fenómeno. A continuación, se detallan las características más comunes (117):

1. Mantenimiento de una señal proliferativa
2. Evasión de los mecanismos supresores del crecimiento
3. Resistencia a la muerte celular
4. Inmortalidad replicativa
5. Inducción de la angiogénesis
6. Activación de su capacidad de invasión y metástasis
7. Reprogramación del metabolismo energético
8. Capacidad de evadir su destrucción por el sistema inmune
9. Inestabilidad genómica e incremento de las tasas de mutación.
10. Inducción de procesos inflamatorios.

En la figura 15 se detallan posibles maneras de afrontar estos procesos, los cuales fueron recogidos por Hanahan y Weinberg en 2011 (117).

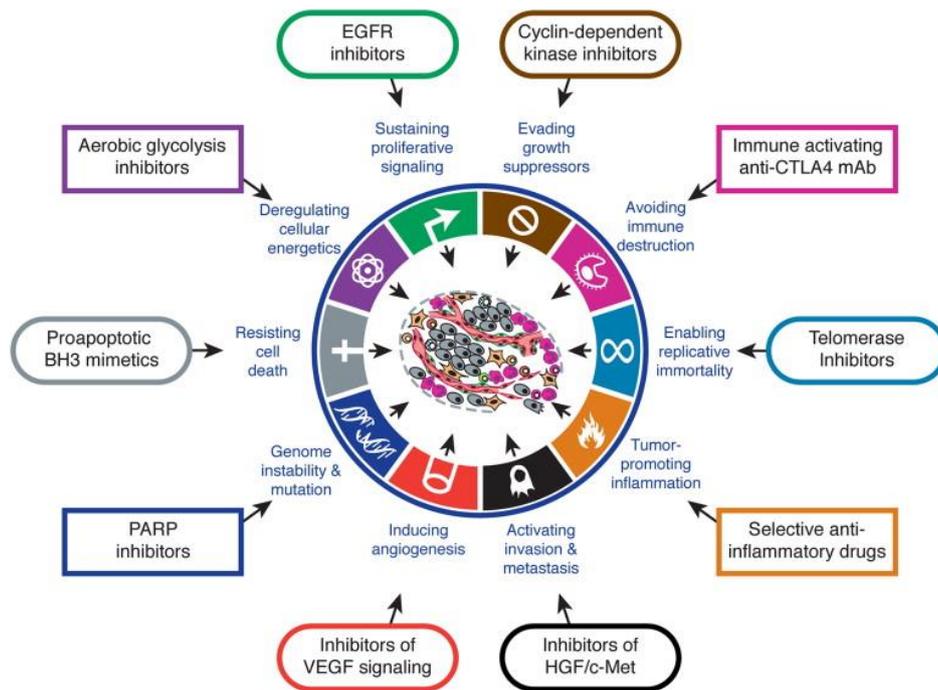


Figura 15. Características de las células cancerosas. Se muestran redondeadas y recuadradas las posibles estrategias para suprimir estos procesos. (Extraído de Hanahan and Weinberg, 2011).

Cabe destacar que, a la dificultad que supone comprender el metabolismo de las células cancerosas, se añade otro hecho más complejo; las células sanas asociadas al tumor adquieren unos rasgos distintivos creando así un “microambiente tumoral” (117).

3.9 CÉLULAS MADRE CANCERÍGENAS

Existen multitud de evidencias que indican que la mayoría de los cánceres, si no todos, dependen de una pequeña población de células denominadas células madre cancerígenas (CSC, del inglés **C**ancer **S**tem **C**ells). Éstas son las responsables del continuo crecimiento y expansión del tumor. En consecuencia, se ha postulado que los tumores pueden originarse a partir de la transformación maligna de células individuales de la población de células madre del organismo (118).

Los avances en el estudio de las CSC han demostrado que éstas y las células madre poseen muchas similitudes.

Una de ellas es que muestran una capacidad de renovación ilimitada, la cual las hace prácticamente inmortales. A nivel molecular, en las CSC se han descrito varias rutas

de señalización similares a las células madre, como las rutas Wnt, Notch o Hh (118–120). Otra de las similitudes es que ambos tipos de células se dividen de manera que aseguran su auto-renovación, es decir, tanto pueden diferenciarse a una célula en concreto y generar otra idéntica a sí misma o bien generar dos idénticas (121). Hay que tener en cuenta que, mientras las células madre, al diferenciarse, generan una progenie normal, las CSC se diferencian anormalmente (118), dando lugar a cualquier célula tumoral. Esta nueva célula tumoral tiene una capacidad limitada o nula de auto-renovación y se acabará deteniendo su proliferación o bien morirá (119,120).

Las CSC también pueden mantenerse en estado de quiescencia (118,120). En un tejido sano, las CSC pueden permanecer quiescentes pero, si lo consideran oportuno, pueden salir de este estado, expandirse con rapidez y diferenciarse. La capacidad de las CSC para permanecer en un estado de quiescente podría explicar que cánceres como el de mama o el de colon puedan recurrir incluso una década después del tratamiento inicial (122)

Adicionalmente, también se ha demostrado que ambos tipos celulares tienen una alta capacidad de reparación del ADN y son resistentes a la apoptosis (118,119).

Para finalizar este capítulo, es interesante mencionar que ya es posible aislar y caracterizar CSC. A través de ensayos funcionales, métodos de tinción o marcadores de superficie específicos se consiguen aislar.

Existe una gran variedad de marcadores según el tejido cancerígeno y algunos como el colon están ampliamente descritos (123). En los tumores en general, uno de los marcadores más utilizados para identificar poblaciones enriquecidas en CSC es el CD133. Se trata de una glicoproteína transmembrana de la cual no se conoce su función fisiológica pero se cree que está implicada en la organización de la membrana plasmática (123). Otro marcador frecuentemente utilizado es el CD44 (124).

Habitualmente, para el correcto aislamiento de CSC se recurre al estudio de más de un biomarcador, lo que permite una mayor selección de esta población de células dentro del conjunto celular que constituye el tumor. Así pues, para cada tipo tumoral se emplean diferentes combinaciones de biomarcadores.

1. Leucemia: CD34+/CD38-(125)
2. Melanoma: CD133+/CD20+ (126)

3. Páncreas: CD24+/CD44+/CD326+ (127)
4. Ovario y próstata: CD44+/CD24- (128,129)

4. METABOLISMO DE LAS CÉLULAS MADRE

Tal y como se ha visto en la sección anterior, los estudios en medicina regenerativa avanzan a un ritmo muy elevado como consecuencia del enorme interés que supone para la regeneración de tejidos y, en consecuencia, para el tratamiento de algunas enfermedades.

Esto conlleva implícito el estudio del metabolismo celular de las células madre, el cual resulta fundamental para averiguar su funcionamiento y hacer un uso adecuado.

A diferencia de otros tipos celulares, el conocimiento sobre el metabolismo de las células madre es limitado. Además, no se comportan todas iguales, es decir, el metabolismo de una célula pluripotente y una célula mesenquimal diferenciada a osteoblasto resulta radicalmente distinto con lo cual cada tipo de célula madre y cada diferenciación requiere un estudio personalizado y profundo.

Cierto es que se ha avanzado en este campo y que no es totalmente desconocido. Por ejemplo, se han hecho muchos pasos en la *fertilización in vitro* (FIV). Durante la década de los 60 y los 70 la comprensión del metabolismo de las ESC permitió el cultivo y desarrollo de blastocistos *in vitro* y a inicios de los 80 estos ensayos ya se empezaban a llevar a cabo a diario. A día de hoy, es una técnica ampliamente utilizada y con mejoras constantes posibilitando un aumento en el número de embarazos.

Otro ejemplo más reciente es el que descubrió Tohyama y colaboradores en 2013 (130). Ellos demostraron que era posible producir cardiomiocitos humanos funcionales a partir de ESC humanas cambiando la fuente primaria de carbono en el medio de crecimiento de glucosa a lactato. De esta manera, se puede obtener una gran fuente de células que servirían en el futuro para tratar enfermedades degenerativas de corazón.

A continuación, se detalla el metabolismo de las células totipotentes, pluripotentes y mesenquimales. Se podría abarcar también otros tipos de células multipotentes pero se centrará únicamente en mesenquimales ya que es el tipo celular utilizado en este trabajo.

4.1 METABOLISMO CELULAR DE LAS CÉLULAS TOTIPOTENTES

El metabolismo de las células totipotentes está altamente controlado por las enzimas limitantes de la glucólisis, la hexoquinasa (HK) y la fosfofructoquinasa 1 (PFK1). Así pues, inicialmente (días en que la célula está en estado de totipotencia) la glucólisis está disminuida (131), como se muestra en la figura 16 (132).

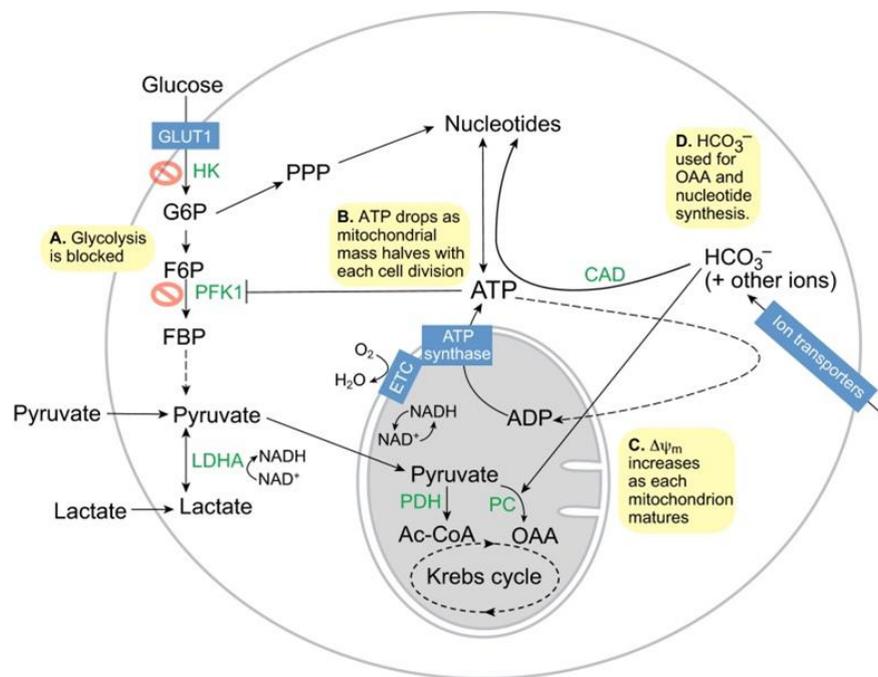


Figura 16. Metabolismo de las células madre totipotentes. (Extraído de Shyh-Chang et.al., 2013)

Entonces, en lugar de glucosa, las únicas fuentes de energía que utilizan las células totipotentes son el piruvato y el lactato. Este hecho no resulta sorprendente ya que las células germinales, óvulos y espermatozoides, utilizan fundamentalmente el piruvato y el lactato. Más exactamente, el piruvato secretado por las células del folículo ovárico y el lactato secretado por las células testiculares de Sertoli. Las ventajas del porqué las

totipotentes tienen preferencia por el piruvato son desconocidas pero sí es cierto que hasta que la célula no evoluciona a mórula, la tasa glucolítica es muy baja (133).

De esta manera, la oxidación de piruvato en la mitocondria suministra Acetil-CoA para el ciclo de Krebs, el cual genera intermediarios para la fosforilación oxidativa.

A pesar de la preferencia por la oxidación del piruvato, el consumo de oxígeno de las células totipotentes es muy bajo, consistente con el hecho que las mitocondrias de estas células son estructuralmente inmaduras. Además, los niveles totales de ATP y el ratio ATP/ADP es alto inicialmente en las totipotentes pero decrecen linealmente con el desarrollo (figura 16), mientras que el ratio NADH/NAD⁺ se mantiene siempre alto (134). Teniendo en cuenta que el ATP es un potente inhibidor alostérico de la PFK1, este decremento del ATP podría explicar la activación de la glucólisis cuando la célula llega al estado de blastocisto (135).

4.2 METABOLISMO CELULAR DE LAS CÉLULAS PLURIPOTENTES

Durante el desarrollo de mórula a blastocisto, las células se convierten en pluripotentes, lo cual conlleva un aumento drástico de la actividad metabólica y, más precisamente, de la degradación de la glucosa aumentando la expresión de los transportadores de glucosa GLUT1 y GLUT3 (figura 17) (136). Debido al aumento del flujo glucolítico aumenta la síntesis de lactato (133).

Tanto las tasas oxidativas como el consumo de oxígeno de los blastocistos aumenta, si bien este incremento es debido a las mitocondrias del trofoectodermo que tienen un alto potencial de membrana. En cambio, las mitocondrias de la masa celular interna (MCI) tienen un potencial de membrana bajo (137). De acuerdo con este bajo potencial, las células madre embrionarias pluripotentes (ESC) derivadas del cultivo in vitro de la MCI muestran altas tasas glucolíticas (138,139).

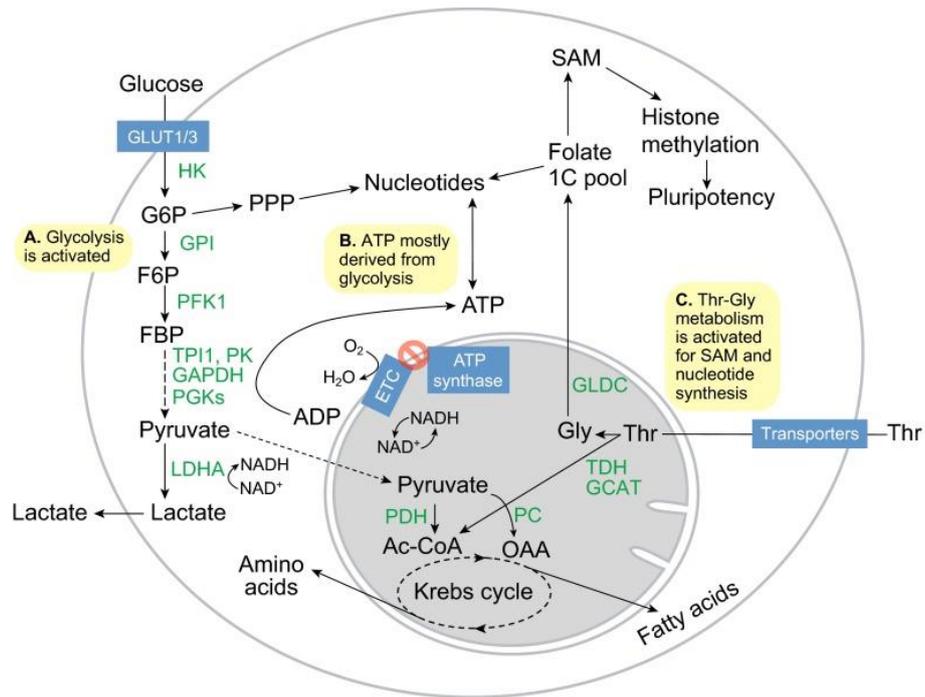


Figura 17. Metabolismo de las células madre pluripotentes. (Extraído de Shyh-Chang et al., 2013)

También se ha observado un “switch” metabólico de fosforilación oxidativa a glucólisis durante la conversión de células diferenciadas a células pluripotentes inducidas (iPS) (140). Este aumento de la glucólisis precede la activación de marcadores de pluripotencia (141). Así pues, podemos concluir que cuando se promueve la glucólisis incrementa la reprogramación de las iPS, mientras que inhibir farmacológicamente la glucólisis o estimular la fosforilación oxidativa reduce dicha reprogramación (140).

En el efecto Warburg, las células cancerígenas también dan preferencia a la glucólisis respecto a la fosforilación oxidativa y desvían los intermediarios glucolíticos a aminoácidos, lípidos y síntesis de nucleótidos para proliferación celular (142). De manera similar, las ESC de ratón tienen aumentada la vía metabólica de las pentosas fosfato (PPP, del inglés **Pentose Phosphate Pathway**), lo cual permite una síntesis rápida de nucleótidos. Así pues, dicha ruta es una característica común del metabolismo de las ESC y las células cancerígenas.

4.3 METABOLISMO CELULAR DE LAS CÉLULAS MESENQUIMALES

Cuando las ESC (células pluripotentes) se diferencian, el flujo glucolítico disminuye considerablemente y también la vía de las pentosas fosfato (143). Así pues, incrementa la fosforilación oxidativa (144). A partir de entonces ya se producen las células multipotentes, las cuales, a diferencia de las ESC, permanecen en estado de quiescencia hasta que reciban una señal para proceder a diferenciarse.

Las MSC residen en ambientes (nichos) hipóxicos *in vivo* y se caracterizan por ser glucolíticas, aunque no son tan glucolíticas como las embrionarias (pluripotentes).

Cuando se expanden las MSC (en condiciones de normoxia) son capaces de realizar la fosforilación oxidativa con un alto consumo de oxígeno, sugiriendo que la glucólisis es una adaptación que han hecho las MSC en condiciones donde el oxígeno escasea, dado que en hipoxia realizan más la glucólisis que en normoxia (145). En realidad, la proliferación de las MSC incrementa significativamente en normoxia (146). Esta adaptación que han hecho las MSC para poder realizar la fosforilación oxidativa en normoxia tiene un inconveniente considerable, y es que muestran incrementada de tres a cuatro veces la senescencia, sugiriendo que la glucólisis inducida por la hipoxia permite prevenir la senescencia inducida por estrés oxidativo y, en consecuencia, pueden mantener a largo plazo la auto-renovación (146).

También resulta interesante tener en cuenta que en 2013 un grupo de investigadores finlandeses demostraron que HIF-1 α (**H**ypoxia **I**nducible **F**actor-1 α) está sobre-expresado en situación de normoxia en hMSC (147). Dicho factor es el factor de transcripción responsable de la inducción de genes que facilitan la adaptación y supervivencia de células y/organismo en el paso de normoxia a hipoxia (148–150). En consecuencia, este grupo finlandés sugiere que este hecho, junto con su disminución en la expresión cuando las MSC se diferencian a osteoblastos, podría ser beneficioso en retener la multipotencia. Además, consideran que el aumento de HIF-1 α en normoxia puede ser lo que mantiene la glucólisis y la expresión de genes glucolíticos (147), sugiriendo que el metabolismo en normoxia e hipoxia podría ser intercambiable.

En referencia a las posibles rutas de diferenciación de las MSC, los pre-adipocitos activan un sistema lipogénico en el cual la enzima ATP citrato liasa (ACL) incrementa el metabolismo de la glucosa y sintetiza lípidos para el almacenamiento de grasas (figura 18

A, B). Los adipocitos también dependen de la ACL para incrementar el suministro de acetil-CoA y, en consecuencia, aumentar la acetilación de las histonas durante la adipogénesis (Figura 18, B, C).

Como se puede visualizar en la figura 18, durante la adipogénesis incrementa la fosforilación oxidativa y las especies reactivas de oxígeno (ROS, del inglés **R**eactive **O**xxygen **S**pecies). El ROS endógeno que se genera debido a la cadena de transporte electrónico es necesario para iniciar la adipogénesis, lo cual demuestra que la fosforilación oxidativa y ROS no son una consecuencia de la adipogénesis sino la causa del proceso (151).

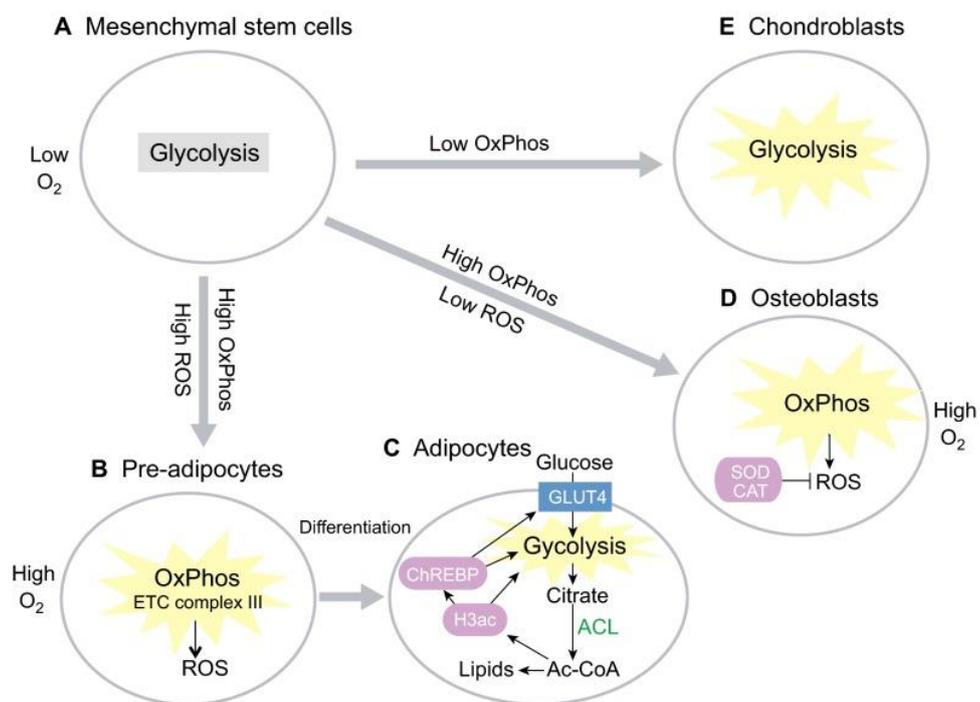


Figura 18. Metabolismo de las células madre mesenquimales. (Extraído de Shyh-Chang et al., 2013)

De manera parecida, la osteogénesis de las MSC conlleva un incremento de la fosforilación oxidativa (152) aunque, a diferencia de los adipocitos, para diferenciarse las MSC a osteoblastos no puede haber ROS (figura 18, D). De hecho, las enzimas antioxidantes superóxido dismutasa y catalasa están simultáneamente aumentadas para prevenir la acumulación de ROS (152).

En contraste con la adipogénesis y la osteogénesis, en el proceso de condrogénesis las MSC reducen significativamente el consumo de oxígeno y la fosforilación oxidativa,

indicando un aumento de la glucólisis (figura 18, E) (145). Pattappa y colaboradores también observaron que mientras la hipoxia inhibe la osteogénesis, la condrogénesis no se ve afectada (146).

Como conclusión, podemos decir que estos estudios demuestran que una manipulación cuidadosa del metabolismo oxidativo puede dirigir la diferenciación de las MSC a adipocitos, osteoblastos o condrocitos.

A continuación, y de acuerdo con el metabolismo de las células madre, se tratarán los cuerpos lipídicos y la autofagia, a menudo relacionados entre sí, pues son dos conceptos importantes en los resultados de esta tesis.

4.4 CUERPOS LIPÍDICOS

El metabolismo lipídico se lleva a cabo principalmente en el retículo endoplasmático (RE), donde residen muchas de las enzimas implicadas. Dentro del RE, existen tres tipos de lípidos complejos: los esfingolípidos, los fosfolípidos anfifílicos y los lípidos neutros, como triacilgliceroles y ésteres de colesterol. Los esfingolípidos se sintetizan básicamente en el aparato de Golgi, pero las ceramidas (estructura básica de los esfingolípidos) se sintetizan también en el retículo. Los fosfolípidos son esenciales para el ensamblaje de membranas y de vesículas de transporte de proteínas, mientras que los triglicéridos y ésteres de colesterol son almacenes del exceso de ácidos grasos y colesterol. Debido a que son hidrofóbicos se guardan en forma de cuerpos lipídicos (LD, del inglés **Lipid Droplets**) (153,154).

Cabe destacar que los cuerpos lipídicos son depósitos intracelulares de ésteres lipídicos envueltos por una monocapa de fosfolípidos y separados del medio hidrofílico citosólico por un recubrimiento de proteínas estructurales (figura 19).

Hasta hace un tiempo, la comunidad científica creía que eran reservas inertes y que simplemente almacenaban grasas. Con el paso de los años, se ha observado que tienen una alta actividad metabólica y es tal la relevancia, que, debido a su naturaleza dinámica y multifuncional, ya hay autores que consideran estas entidades como orgánulos intracelulares (155,156). Además, como muchos otros orgánulos, los LD interactúan de

forma regulada con otros compartimentos intracelulares, probablemente para proporcionarles lípidos específicos para sus membranas y para adaptarse a cambios en el entorno celular (157,158).

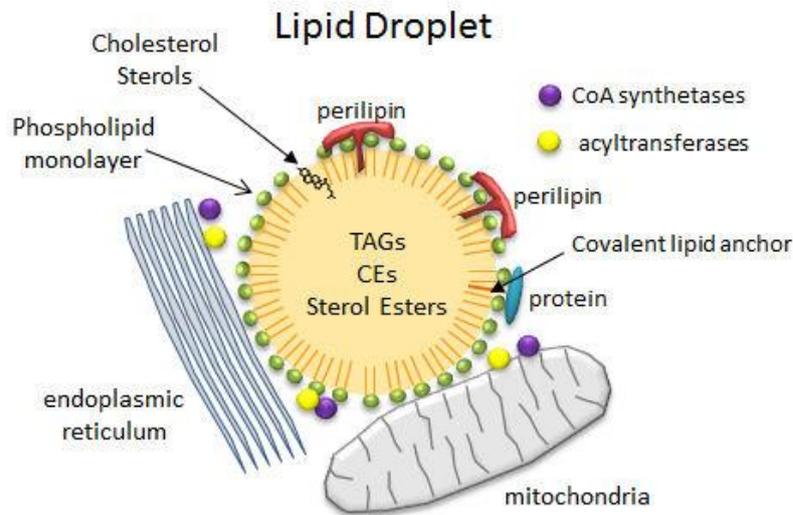


Figura 19. Composición de los cuerpos lipídicos e interacción con otros orgánulos celulares.

Un aspecto interesante de los cuerpos lipídicos es que no solo se saben sus funciones principales, como la de metabolizar lípidos o la de suministrar lípidos de membrana, sino que se han identificado funciones adicionales y se ha descrito su proceso de formación. Más exactamente, Kassan y colaboradores describieron que en determinados puntos del RE se aprecian cuerpos lipídicos que se están formando y tienen aspecto de pequeñas protuberancias en la bicapa lipídica. En consecuencia, si aumenta la concentración de lípidos en la célula, éstos irán rápidamente a esos puntos para ser almacenados de la manera más segura posible que será en forma de cuerpos lipídicos (159). Esta es la explicación más aceptada por la comunidad científica pero la formación de los LD sigue generando cierta controversia.

Por lo que se refiere a la estructura de los cuerpos lipídicos, son moléculas generalmente circulares, cuyos diámetros oscilan entre 0.1 y 5 μm en no-adipocitos, pero pueden llegar a superar los 100 μm en adipocitos blancos, aunque en éstos hay menor cantidad.

La superficie de los LD está bastante descrita y es sabido que no es una membrana convencional sino una monocapa de fosfolípidos, donde se incluyen la fosfatidilcolina, la

fosfatidiletanolamina, el fosfatidilinositol, la lisofosfatidilcolina y la lisofosfatidiletanolamina (156). También hay quien sugiere que hay colesterol libre en esta capa y que no es descartable que incluso haya en el interior.

En cambio, el contenido interno ya es más variable. En adipocitos blancos, predominan los triglicéridos, pero en la mayoría de tipos celulares, los triglicéridos y los ésteres de colesterol coexisten en varios ratios.

La primera proteína que se descubrió en los cuerpos lipídicos fue la perilipina, una proteína situada en la monocapa de fosfolípidos que regula la lipólisis en respuesta a hormonas en adipocitos blancos, inhibiendo la lipólisis basal y activándola al ser fosforilada por la quinasa PKA.

La lipólisis consiste en la hidrólisis de los triacilglicéridos hasta generar ácidos grasos libres y glicerol. La enzima limitante que regula este proceso es la lipasa ATGL (del inglés **A**dipose **T**riglyceride **L**ipase), que cataliza la conversión de triacilgliceroles a diacilgliceroles y libera un ácido graso. Entonces interviene la lipasa HSL (del inglés **H**ormone-**S**ensitive **L**ipase) que hidroliza los diacilgliceroles.

Además, está demostrado que la depleción de ATGL en ratones provoca la acumulación de cuerpos lipídicos en prácticamente todos los tejidos, especialmente en aquellos más oxidativos (160). También se ha demostrado que su depleción o su sobre-expresión, reducen o incrementan, respectivamente, el tamaño de los cuerpos lipídicos en células en cultivo (161).

4.5 AUTOFAGIA

La autofagia, se puede definir como un proceso de “auto-alimentación” que implica la liberación de material citoplasmático en el lisosoma para su posterior degradación (162). En función de cómo se produce dicha liberación en el lisosoma se distinguen tres tipos de autofagia denominadas macroautofagia, microautofagia y autofagia mediada por chaperonas (162,163). Debido a que se ha observado que la macroautofagia es la vía mejor regulada (162) y mejor caracterizada, de aquí en adelante nos referiremos a la macroautofagia como autofagia. Así pues, este proceso se define como el secuestro del citoplasma en una vesícula citosólica de doble membrana denominada autofagosoma, que

posteriormente se fusionará con un lisosoma para formar un autofagolisosoma (162). Dentro de los autofagolisosomas (o autolisosomas), las hidrolasas lisosomales degradan el material secuestrado para producir aminoácidos esenciales y ácidos grasos, que se utilizan para sintetizar proteína o ser oxidados para generar ATP para la supervivencia celular (figura 20).

¿Cómo se forman los autofagosomas? Esta es una pregunta que se realiza la comunidad científica pero a día de hoy aún no se conoce bien. Hay gran controversia debido a que tras 50 años de investigación se desconoce el origen de la membrana que dará lugar a los autofagosomas y es considerado como un proceso bastante complejo (162,164). Sin embargo, sí es conocido que en ausencia de nutrientes hay un incremento muy elevado de membranas autofágicas, de manera que la célula debe tener una alta capacidad para movilizar una cantidad sustancial de membrana para crear autofagosomas.

Está emergiendo un consenso en células mamíferas, que considera que la membrana del autofagosoma se origina a partir de las membranas del retículo endoplasmático (RE), aunque las pruebas demuestran que bastantes compartimentos celulares, como el aparato de Golgi, la membrana plasmática y las mitocondrias, contribuyen a la expansión del autofagosoma naciente. Últimamente también se está aceptando la idea que considera que el origen de la membrana del autofagosoma, denominada membrana de aislamiento (o fagóforo), nace en la interfase RE-mitocondria (MAM, del inglés **M**itochondria-**a**ssociated **m**embranes) y que el Golgi, la membrana plasmática y los endosomas son importantes para la expansión de la estructura inicial (164).

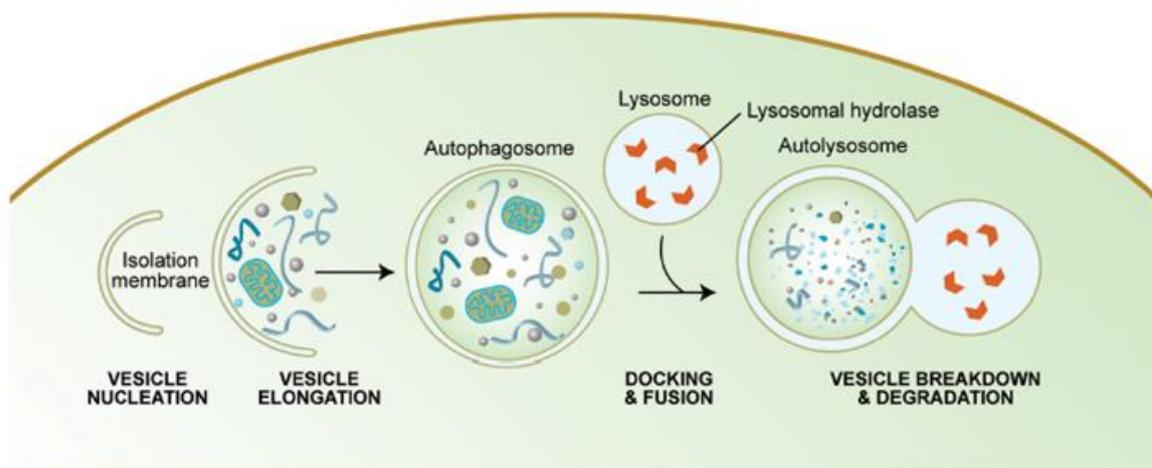


Figura 20. Diagrama esquemático de los pasos de la autofagia. (Extraído de Meléndez and Levine, 2009)

La autofagia es un proceso que tiene tres funciones principales:

1. Generar energía para la célula en situación de inanición (165).
2. Degradar componentes celulares (normales o defectuosos), los cuales pueden ser posteriormente reciclados (166).
3. Inducir una respuesta al estrés celular producido por agentes químicos y/o físicos que causan daños subcelulares, como por ejemplo agentes infecciosos, hipoxia o inflamación (167).

Este sofisticado proceso de autofagia está regulado por unos genes llamados “genes asociados a la autofagia (ATG, del inglés **A**utophagy-related **G**enes). Entre estos 35 genes ATG, estudios pioneros en levaduras indicaron que 15 son necesarios para las funciones básicas de la autofagia mientras otros tienen roles más particulares (168). Ya se han identificado algunos homólogos de estos genes (unos 15) en mamíferos (169,170).

Dos genes muy importantes y de los más estudiados son atg8 y atg4. Sus genes equivalentes (son varios) en mamíferos codifican para lc3 (microtubule-associated protein light chain 3) y atg4b, respectivamente (169). La proteína LC3 padece inmediatamente una modificación post-traducciona mediada por la actividad proteasa cisteína de una autophagina y se forma LC3-I, una proteína soluble localizada en el citosol. Cuando se induce la autofagia, LC3-I es lipidada mediante la adición de fosfatidiletanolamina (PE, del inglés **p**hosphatidylethanolamine) para formar LC3-II y ésta pueda asociarse en la membrana del fagóforo, que es el fragmento emergente de membrana inicial que reconoce a las moléculas u orgánulos que van a ser degradados (figura 21) (171). Una vez se ha generado el autofagosoma y durante la fusión con la membrana del lisosoma, la parte de LC3-II que queda situada en la cara externa de la membrana se recicla mediante la acción de otra autophagina. El resto de LC3-II que estaba en la cara interna de la membrana del autofagosoma permanecerá dentro (171).

Es por ello que LC3-II (o el ratio entre LC3-I y LC3-II) se utiliza para estudiar tanto la cantidad de autofagosomas presentes en una célula como los flujos de autofagia.

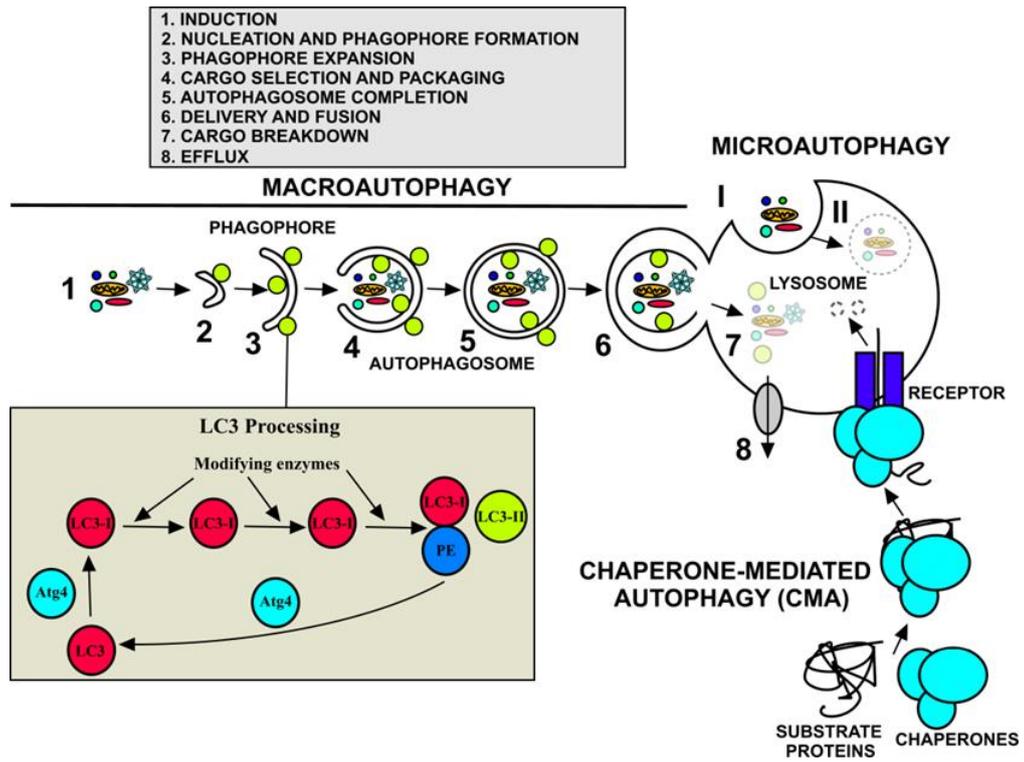


Figura 21. Esquema donde se representa la (macro)autofagia con el proceso de conversión de LC3-I a LC3-II, la microautofagia y la autofagia mediada por chaperonas. (Extraído de Mijaljica et. al.,2011).

CAPÍTULO 2

HIPÓTESIS

Dada la alta similitud entre células tumorales y células madre, se han diseñado las dos hipótesis que se plantean a continuación relacionadas con el rol de CPT1C.

- Hipótesis 1: CPT1C se expresa en células madre y ejerce un papel protector en situación de estrés metabólico.

- Hipótesis 2: CPT1C ejerce dicha protección ya que proporciona a las células madre una mayor capacidad oxidativa de ácidos grasos tal y como ocurre en células tumorales.

CAPÍTULO 3

OBJETIVOS

Los objetivos de este trabajo son:

1. Averiguar si CPT1C se expresa en células madre
2. En caso que se cumpla el objetivo anterior, verificar si CPT1C protege a las células madre en situación de estrés metabólico.
3. En caso que se cumpla el objetivo anterior, identificar el mecanismo a través del cual CPT1C protege a las células madre y, en consecuencia, promueve la supervivencia celular

CAPÍTULO 4
MATERIALES Y MÉTODOS

1. BIOLOGÍA MOLECULAR

En esta tesis se han llevado a cabo métodos de trabajo con DNA, RNA y proteína que nos han permitido obtener vectores plasmídicos recombinantes y analizar la expresión génica y proteica de células en cultivo. En este apartado también se incluyen los métodos de trabajo con bacterias realizados para la obtención de dichos vectores.

1.1 OBTENCIÓN DE VECTORES VÍRICOS RECOMBINANTES

VECTORES PLASMÍDICOS

Los vectores plasmídicos usados para las estrategias de clonaje y posterior producción de lentivirus han sido: 1) pWPI para la sobre-expresión de CPT1C y 2) pLVTHM para el silenciamiento de CPT1C humana mediante RNA de interferencia (shRNA) (figura 22).

El plásmido pWPI, utilizado para la sobre-expresión de CPT1C, es un vector de transferencia lentiviral de segunda generación bicistrónico que permite la expresión simultánea de un transgén y un marcador, GFP, para facilitar el seguimiento de las células transducidas. El cDNA de GFP que contiene está situado corriente abajo del EMCV IRES (Addgene plasmid # 12254).

El plásmido pLVTHM es el vector en el que se ha clonado la secuencia de silenciamiento de CPT1C humana entre las dianas de restricción MluI-ClaI (Addgene plasmid # 12247).

Ambos vectores han sido cedidos a Addgene por el Laboratorio Trono. Son vectores dirigidos a la expresión en mamífero, de tipo lentiviral y Cre/Lox. Ambos contienen el gen de resistencia a ampicilina para la selección en bacterias y éstas los generan en número alto de copias (figura 22).

Descripciones simples de los distintos componentes de los vectores se pueden encontrar en la siguiente tabla (tabla 1).

<i>Componente</i>	<i>Descripción</i>
5'LTR	Repetición larga en la terminación 5', contiene las regiones reguladoras cis que reclutan proteínas que promueven la transcripción de la longitud completa del lentivirus. Secuencias aquí facilitan la integración proviral en el genoma huésped. Una LTR en 5' intacta indica que este es un plásmido de transferencia segunda generación
Psi	Secuencia que facilita el empaquetamiento del RNA lentiviral
RRE	Elemento de respuesta a Rev: secuencia a la que la proteína Rev se une para facilitar la exportación nuclear de ARN viral
EF1 α	Promotor para el factor de elongación 1 α : utilizado para la expresión de un gen marcador tal como GFP
cPPT	Polipurina tracto central: permite la importación nuclear de lentivirus en células huésped
WPRE	Elemento de respuesta post-transcripcional del virus de la hepatitis de marmota: aumenta la expresión de shRNA
TetO	Sitio de unión para la proteína represora tet, que se puede utilizar para activar o desactivar la expresión de shRNA
H1	Promotor de la histona H1 utilizado para conducir la expresión shRNA
LoxP	Sitio que se recombina por la recombinasa Cre con el fin de eliminar condicionalmente los provirus de lentivirus del genoma del huésped después de la infección con y la incorporación éxito
3'LTR/SIN	LTR en 3' con una gran delección en la región U3, que hace que la replicación del virus incompetente

Tabla 1. Breve descripción de los principales componentes de los vectores pWPI y pLVTHM.

Cabe remarcar que para la sobre-expresión de CPT1C se utilizó un plásmido ya construido previamente que sobre-expresa la CPT1C de ratón, obtenida a partir del RNA de hipotálamo (tesis Dra. Macarena Pozo, 2015). La forma murina presumiblemente debe tener la misma funcionalidad que la CPT1C humana.

En cambio, se diseñó y se construyó un plásmido de silenciamiento de la CPT1C humana específico para este trabajo ya que el de silenciamiento de ratón no silencia la forma humana.

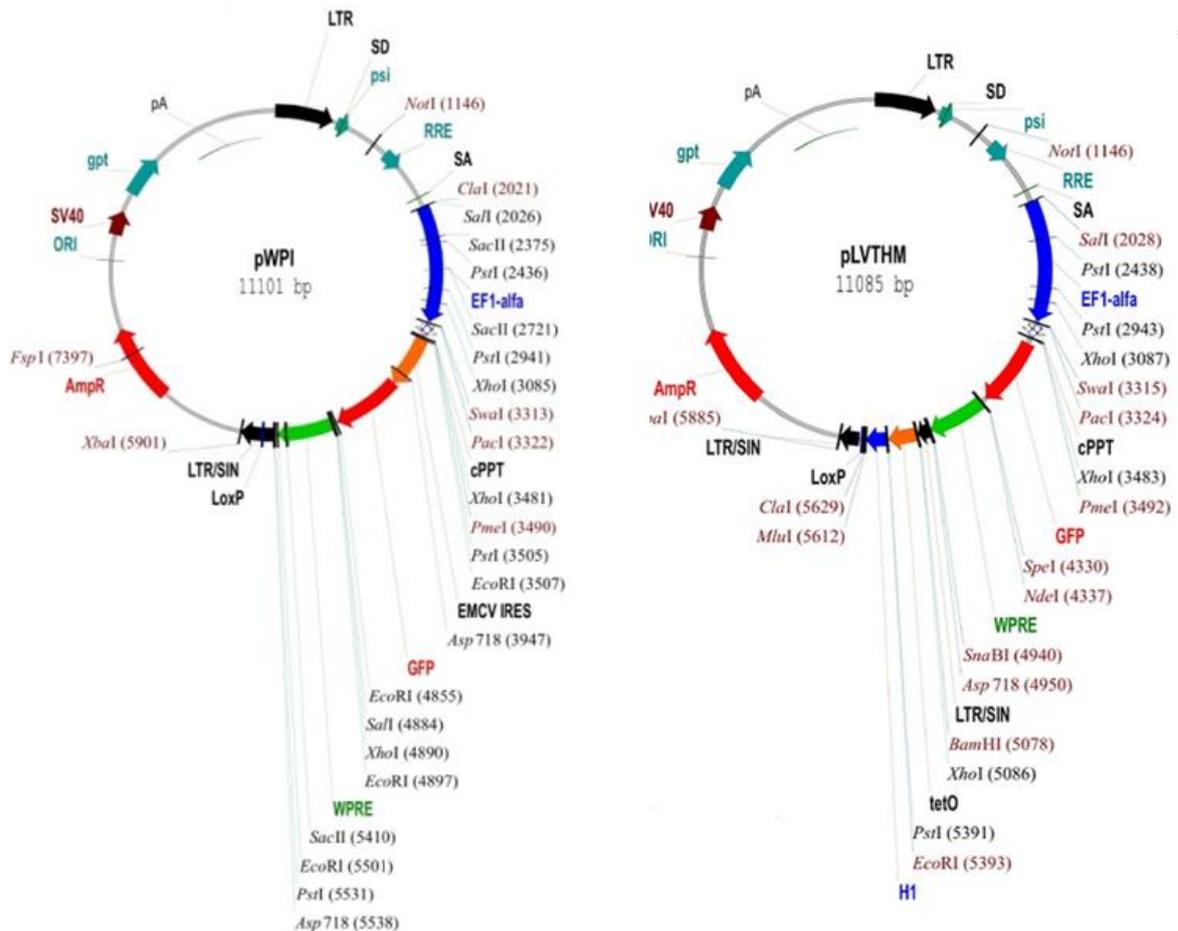


Figura 22. Esqueleto de los vectores pWPI i pLVTHM

1.1.1 OBTENCIÓN DE pLVTHM-shCPT1C HUMANA

Para la obtención del vector de silenciamiento de CPT1C humana, pLVTHM-CPT1C se siguió la siguiente estrategia de clonaje:

1) Secuencia del shRNA

Para silenciar la CPT1C humana se utilizaron como secuencias las únicas descritas hasta la fecha (35), las cuales son capaces de silenciar el gen en células en cultivo. Únicamente estos autores han publicado su inhibición y fue en células tumorales (MCF7 de cáncer de pecho y PC3 de cáncer de próstata).

Dado de que no sabíamos si una, las dos secuencias de shRNA (short hairpin RNA) que emplearon o ninguna era viable en células madre, hicimos los ensayos con las dos para

averiguarlo, la cuales eran las siguientes (azul: secuencia diana, verde: dianas de restricción de MluI y ClaI).

shRNA 1: 5'-GAAAUCCGCUGAUGGUGAA-3'

5' CGCGT CCCC GAAATCCGCTGATGGTGAATTCAAGAGA TTCACCATCAGCGGATTTC TTTT GGAA AT 3'

3' A GGGG CTTTAGGCGACTACCACTT AAGTTCTCT AAGTGGTAGTCGCCTAAAG AAAAA CCTT TAGC 5'

shRNA 2: 5'-GACAAAUCCUUCACCCUAA-3'

5' CGCGT CCCC GACAAATCCTTCACCCTAA TTCAAGAGA TTAGGGTGAAGGATTTGTC TTTT GGAA AT 3'

3' A GGGG CTGTTTAGGAAGTGGGATT AAGTTCTCT AATCCCACTTCCTAAACAG AAAAA CCTT TAGC 5'

2) Hibridación de los oligonucleótidos del DNA

La hibridación de los oligonucleótidos se realizó de la siguiente manera:

- Resuspensión de los oligonucleótidos en agua mQ autoclavada a 3mg/mL
- Añadir en un tubo de PCR, por parejas, 1 µL de *forward* y 1 µL de *reverse*.
- Añadir 48 µL de tampón de hibridación autoclavado: 100 mM NaCl, 50 mM HEPES pH 7.4
- Reacción en termociclador:

PCR
95°C, 4 min
70°C, 10 min
60°C, 20 min
50°C, 30 min
37°C, 45 min
10°C, 60 min

3) Obtención de pLVTHM digerido con MluI-ClaI

Primeramente se llevó a cabo la digestión con ClaI (10404217001, Roche) O/N (del inglés Overnight) a 37°C, partiendo de 4 µg de vector (2 µg/tubo) procedente de una maxiprep (*Maxiprep DNA Purification System*, #740414.50 Macherey-Nagel) realizada previamente. El producto de la digestión se resolvió en gel del 0.8% agarosa, purificado

mediante el *QIAEX II Gel Extraction Kit* de QIAGEN siguiendo las instrucciones del fabricante y cuantificado. 1 µg del plásmido obtenido pLVTHM/ClaI fue posteriormente digerido con MluI también O/N a 37°C y vuelto a purificar en gel de agarosa.

4) Ligación y comprobación de clones positivos

La ligación del vector pLVTHM/ClaI/MluI con los insertos shRNA se realizó con un ratio molar V:I = 1:4, con lo que la reacción se llevó a cabo con 40 ng de vector por 1 ng de inserto mediante la ligasa de DNA T4. Los productos de la ligación fueron transformados en *E.Coli* para su posterior comprobación.

De igual manera que en el clonaje anterior, a partir de las colonias obtenidas, se realizaron minipreps (*Miniprep DNA Purification System*, #A1330 Promega) y se obtuvo el DNA.

En este caso, la comprobación de los clones se hizo mediante una digestión simultánea EcoRI y ClaI a 37°C, durante 3 horas. Los clones positivos se denominaron sh1 y sh2 haciendo referencia a las secuencias diana de inhibición de CPT1C. Como se muestra en la figura 37, la secuencia 2 tuvo mayor capacidad inhibitoria en células 293T y, en consecuencia, el trabajo se ha desarrollado con la secuencia 2 en células madre ya que, como se observa en la figura 38, su inhibición también fue satisfactoria en dichas células.

1.1.2 MICROBIOLOGÍA

La cepa de *E.Coli* utilizada en este trabajo es la DH5α. Esta cepa no es patógena y fue desarrollada para su uso en estrategias de clonación de laboratorio, de tal forma que contiene múltiples mutaciones que les confieren una alta eficiencia de transformación. El procedimiento de transformación consiste en introducir un plásmido de DNA en células bacterianas competentes para su posterior purificación, amplificación o expresión de proteínas. En este trabajo se llevó a cabo la transformación por medio de choque térmico en células DH5α competentes producidas en el laboratorio, tal y como se indica a continuación.

Transformación bacteriana

Todo el procedimiento se lleva a cabo en condiciones de esterilidad:

1. Descongelar las células competentes (DH5 α) en hielo.
2. Añadir 50-100 ng de DNA a cada tubo de transformación (*eppendorf* 1.5 mL).
3. Añadir 50 μ L de células competentes al tubo de transformación con el DNA
4. Mantener 30 minutos en hielo.
5. Someter las células a choque térmico durante 1 minuto y 15 segundos a 42°C.
6. Dejar un minuto en hielo y sacar.
6. Agregar 500 μ L de medio SOC e incubar durante 1 hora a 37°C en agitación.
7. Plaquear el contenido del *eppendorf* con el antibiótico de resistencia del plásmido e incubar a 37°C O/N.

Medio SOC: Triptona (20 g/L), extracto de levadura (5 g/L), MgSO₄ (4.8 g/L), dextrosa (3.6 g/L), NaCl (0.5 g/L), KCl (0.186 g/L).

Cultivo de bacterias

En función del procedimiento, las bacterias fueron cultivadas en medio de cultivo LB (Luria-Bertani) líquido o bien LB sólido (LB agar) en presencia del antibiótico apropiado. El medio LB está compuesto por triptona (10 g/L), extracto de levadura (5 g/L) y NaCl (5 g/L), 20 g. se disuelven en 1L de agua destilada y se autoclava a 121°C durante 15 minutos.

Se almacena a 4°C hasta su uso, momento en el que se le añade el antibiótico. El medio LB agar se compone de agar bacteriológico (15 g/L) además de los descritos en el medio LB. 35 g. se disuelven en 1L de agua destilada y se autoclava, cuando la temperatura del medio baja a 45-50°C se añade el antibiótico (100 mg/L de ampicilina) y se distribuyen 30 mL de medio en placas de petri que se almacenan a 4°C hasta su uso.

Se realizaron stocks glicerolados de bacterias para el almacenamiento a largo plazo de los plásmidos obtenidos. Tras la transformación con el plásmido deseado, se inocula una colonia aislada en 3 mL de medio de cultivo LB líquido (pre-cultivo) durante 8 horas

en agitación, posteriormente los 3 mL se inoculan en 500 mL de medio LB durante 16 horas. Por último, se añaden 200 µL de glicerol 80% estéril a 600 µL de la suspensión celular. La adición de glicerol estabiliza las bacterias congeladas, evitando daños en las membranas de las células y manteniéndolas vivas.

1.2 OBTENCIÓN Y ANÁLISIS DE RNA

1.2.1 EXTRACCIÓN DE RNA

Se obtuvo RNA a partir de cerebro humano y de células madre mesenquimales procedentes de la pulpa dental.

El fragmento de cerebro humano liofilizado fue amablemente cedido por el grupo dirigido por la Dra. Dolors Serra (Facultad de Farmacia, Universidad de Barcelona).

En ambos casos, la purificación se realizó con el reactivo TRIzol® (15596-026 Invitrogen) siguiendo las instrucciones del manual. Este reactivo es una solución monofásica de fenol, isotiocianato de guanidina y otros componentes que facilitan el aislamiento de especies de RNA de distintos tamaños moleculares. Además mantiene la integridad del RNA mientras se lisan las células y su posterior procedimiento debido a la inhibición altamente eficaz de la actividad RNAsa.

A continuación, se añade cloroformo que permite que el homogenado celular se separe en tres fases: una superior acuosa donde se encuentra el RNA, una interfase y una orgánica inferior donde se encuentra el DNA y las proteínas. Se transfiere la fase acuosa (RNA) a un *eppendorf* nuevo, se precipita con isopropanol y se limpia con etanol al 75% para eliminar impurezas.

Ya para finalizar, se resuspende en agua DEPC autoclavada para proceder al siguiente paso.

La concentración final del RNA se cuantificó espectrofotométricamente utilizando el lector de micro-placas Synergy HT de Biotek®.

1.2.2 SÍNTESIS DE DNA COPIA (cDNA)

Para el análisis de la expresión de genes a partir de los mRNA es necesaria la síntesis de cDNA de cadena simple mediante la enzima transcriptasa inversa, el cual será amplificado posteriormente por la técnica de PCR a tiempo real.

La transcriptasa inversa (RT, *reverse transcriptase*) utilizada en el procesado de nuestras muestras fue la M-MLV RT (28025 Invitrogen). La RT es una DNA polimerasa que en presencia de un oligonucleótido inicia la síntesis de una cadena de DNA complementaria o copia (cDNA) a partir de una cadena simple de RNA o DNA. Para el análisis de la expresión génica de nuestras muestras, en todos los casos se partió de 1µg de RNA y se utilizaron *random primers*, que son una colección de oligonucleótidos de secuencia aleatoria que permiten sintetizar cDNAs a partir de todos los RNAs de la muestra. La reacción se lleva a cabo en presencia del tampón de reacción proporcionado juntamente con el enzima, DTT, dNTPs y un inhibidor de RNAsas, durante 1 hora a 37°C.

1.2.3 PCR CUANTITATIVA A TIEMPO REAL

La técnica de la PCR cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR) es una variante de la PCR convencional que permite amplificar y, simultáneamente, cuantificar el producto de la reacción.

Para ello, se añade un fluoróforo a la mezcla de reacción, la cual se lleva a cabo en un termociclador capaz de detectar la fluorescencia emitida por dicho fluoróforo, de manera que permite cuantificar la tasa de generación de DNA después de cada ciclo de amplificación. Existen dos tipos de fluoróforos en función de la especificidad de unión:

- 1) Agente intercalante *SYBRGreen*: Se trata de un fluoróforo inespecífico que se une a la doble cadena de DNA permitiendo detectar la generación de nuevas hebras.
- 2) Agente específico: Son sondas específicas con una secuencia complementaria al fragmento de DNA a amplificar marcadas con un fluoróforo.

En este trabajo únicamente se han utilizado los de tipo 1. Se utilizó la mezcla de reacción *SsoAdvanced™ SYBR®Green Supermix* (#172-5261 BioRad) siguiendo el protocolo descrito por el fabricante. El termociclador utilizado fue *C1000 Thermal Cycler CFX96™* de BioRad.

Se realizaron curvas patrón para determinar la eficiencia de amplificación de los pares de oligonucleótidos, se partió de 2 ug de cDNA para cada reacción y se analizó la temperatura de desnaturalización para comprobar la correspondiente especificidad del producto amplificado. La cuantificación de β -actina se utilizó para la normalización en el cálculo de la expresión relativa de los genes analizados. A continuación, se detallan las secuencias de los oligonucleótidos para la amplificación de los cDNAs de CPT1C y de β -actina humanas que han sido utilizados a lo largo de este trabajo (provistos por Integrated DNA Technologies).

Oligonucleótidos:

CPT1C Forward: 5' GGA CTG ATG GAG AAG ATC AAA GA 3'

CPT1C Reverse: 5' CAC AAA CAC GAG GCA AAC AG 3'

β -actina Forward: 5' CGT GAT GGT GGG CAT GGG TC 3'

β -actina Reverse: 5' ACG GCC AGA GGC GTA CAG GG 3'

1.3 OBTENCIÓN Y ANÁLISIS DE PROTEÍNAS

1.3.1 EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS

A continuación, se detalla el método de extracción de proteínas para células en cultivo.

1. Lavar las células con PBS (del inglés, **Phosphate Buffer Saline**) 1x.
2. Colocar la placa en hielo y añadir la cantidad correspondiente de tampón de lisis (placa de 6 pocillos: 50 μ L/pocillo, placa de 12 pocillos: 25 μ L/pocillo).
3. Recoger las células con la ayuda de un rascador en el tampón de lisis en un *ependorf* de 1.5 mL.

4. Dejar que se lleve a cabo la lisis celular manteniendo los *eppendorfs* 10 minutos en hielo.
5. Centrifugar 10 minutos a 10000 rpm a 4°C.
6. Proceder a la cuantificación de proteína final en el sobrenadante de las muestras de acuerdo con las instrucciones del *Bradford Protein Assay* (500-001 BioRad).
7. Preparar las muestras para el ensayo de *Western Blot*
8. Almacenar a -20°C.

PBS 1x: NaCl (8 g), Na₂HPO₄·2H₂O (1.44 g), KCl (0.2 g), KH₂PO₄ (0.2 g) disueltos en agua destilada hasta un volumen final de 1 litro.

Tampón de lisis: 10mM HEPES, 10 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂

1.3.2 WESTERN BLOT

El *Western Blot* es una técnica analítica que permite detectar una proteína concreta, mediante el uso de anticuerpos, en una muestra determinada. Para llevar a cabo esta detección deben realizarse varias etapas:

1) Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

En primer lugar, se añade tampón de carga 1x a las muestras y se hierven 5 minutos a 95°C para romper los puentes de azufre S-S y desnaturalizar las proteínas.

La electroforesis se realizó montando los geles en la cámara correspondiente sumergidos en tampón de electroforesis, fijando el voltaje a 130 V ya sean geles caseros o bien comerciales (*Mini o Midi-PROTEAN® gels BioRad*). El dodecilsulfato de sodio (*SDS*, proveniente del inglés **Sodium Dodecylsulfate**) confiere cargas negativas a las proteínas promoviendo así que se separen únicamente en función del peso molecular.

Tampón de carga 4x: 200 mM Tris-HCl pH 6.8, 8% SDS, 20% β-mercaptoetanol, 40% glicerol, 0.05% azul de bromofenol en agua destilada.

Tampón de electroforesis: 25 mM Tris-HCl pH 8.3, 192 mM glicina, 0.1% (w/v) SDS.

Gel de acrilamida apilador: Para 3 mL: 2.1 mL de agua destilada, 500 μ L de acrilamida/bisacrilamida 30%, 380 μ L de 0.5 M Tris-HCl pH 6,8, 30 μ L de SDS 10%, 30 μ L de persulfato amónico 10% y 3 μ L de TEMED.

Gel de acrilamida separador: Para 10 mL al 8% acrilamida: 4.6 mL de agua destilada, 2.7 mL de acrilamida/bisacrilamida 30%, 2.5 mL de 1.5 M Tris-HCl pH 8,8, 100 μ L de SDS 10%, 100 μ L de persulfato amónico 10% y 6 μ L de TEMED.

2) Transferencia

Una vez terminada la electroforesis, las proteínas son transferidas desde el gel a una membrana de polifluoruro de vinilideno (PVDF). Dicha membrana debe ser previamente humedecida con metanol.

Para transferir las proteínas desde el gel hacia la membrana montamos un *sandwich* con los siguientes componentes por orden (del polo negativo al polo positivo): esponja, papel *Whatman*, gel, membrana, papel *Whatman* y esponja. Éste se sumergió en una cubeta, la cual se llenó con tampón de transferencia. La transferencia se realizó durante una hora a 400 mA a 4°C.

Tampón de transferencia: 20 mM Tris pH 8,5, 150 mM glicina, 20% metanol.

3) Bloqueo de la membrana

Como se requiere bloquear los lugares de unión que han quedado libres tras la transferencia, se sumergió la membrana en solución de bloqueo. Esta solución contiene un 5% de leche desgrasada en polvo (Blotting-Grade blocker #170-6404 BioRad) en TBST.

La membrana fue bloqueada 20 minutos a temperatura ambiente en agitación.

TBST: 0,1% Tween 20 en TBST 1x (20 mM Tris, 137 mM NaCl, 3,9 mM HCl)

4) Incubación con anticuerpo primario

En todos los casos, las incubaciones con anticuerpos primarios fueron O/N a 4°C en agitación en bolsas de plástico selladas, siguiendo las instrucciones de la casa comercial para la preparación de cada anticuerpo (tabla 2). Seguidamente, las membranas fueron lavadas con TBST durante 10 minutos y 3 lavados posteriores de 5 minutos cada uno.

<u>Anticuerpo</u>	<u>Casa Comercial</u>
Anti CPT1C humana	SAB2501194
Anti CPT1C de ratón	Sintetizado por encargo contra los últimos 14 AA de CPT1C de ratón
Anti CPT1A	Sintetizado por encargo contra los AA 317-430 de CPT1A de rata
Anti fosfo-AMPK α (Thr172)	#9957 Cell Signaling
Anti AMPK α	#9957 Cell Signaling
Anti fosfo-ACC (Ser79)	#9957 Cell Signaling
Anti ACC	#9957 Cell Signaling
Anti LC3A/B (D3U4C) Xp®	#12741 Cell Signaling
Anti GFP	#2956 Cell Signaling
Anti β -actina (AC-15)	MA1-91399 Thermo Scientific
Anti GAPDH	AM4300 Applied Biosystems

Tabla 2. Descripción de los anticuerpos y sus respectivas casas comerciales usados en este trabajo

5) Incubación con anticuerpo secundario

El complejo antígeno-anticuerpo generado tras la incubación con el anticuerpo primario se visualizó por inmunoensayo enzimático indirecto utilizando un anticuerpo secundario. Este anticuerpo es una inmunoglobulina contra el anticuerpo primario conjugada con la peroxidasa de rábano (HRP, Horseradish Peroxidase). Por lo tanto, el anticuerpo secundario utilizado depende de la especie dónde ha sido sintetizado el anticuerpo primario. En todos los casos, la incubación se realizó durante una hora a temperatura ambiente.

Anticuerpo

Anti fracción constante de las IgG de conejo

Anti fracción constante de las IgG de ratón

Anti fracción constante de las IgG de cabra

Casa Comercial

9340 Amersham Biosciences

515-035-003 JacksonImmunoResearch

HAF 017 RD Systems

Seguidamente, la membrana fue lavada del mismo modo que en el paso anterior.

6) Detección quimioluminiscente y cuantificación

La detección del anticuerpo secundario se realizó con la adición a la membrana del sustrato de quimioluminiscencia (Luminata Forte WBLUF0500 Millipore). La enzima peroxidasa conjugada al anticuerpo secundario reacciona con el sustrato emitiendo luz, la cual es captada por una cámara y realiza la imagen, que nos permite mediante un software cuantificar la intensidad de las bandas de cada muestra. El sistema de detección y el software utilizados han sido Syngene G:Box y GeneTools de Syngene, respectivamente.

7) Reutilización de la membrana

La membrana con las proteínas transferidas puede utilizarse para más de una inmunodetección. La eliminación de los anticuerpos unidos evita la interferencia con la incubación y permite la detección de nuevos antígenos. Para ello, la membrana fue incubada con agua destilada hirviendo mediante 3 lavados consecutivos de 5 minutos cada uno. Tras este procedimiento, la membrana puede ser directamente re-incubada con el anticuerpo de interés.

2. BIOLOGÍA CELULAR

A lo largo de este trabajo se han realizado técnicas de trabajo de cultivo celular con tres tipos celulares distintos. El primer tipo son células **HEK293T**, las cuales derivan de

riñón humano embrionario y han sido utilizadas fundamentalmente para la fabricación de lentivirus. El segundo tipo son células madre mesenquimales humanas de la pulpa dental (**DPMSC** de **Dental Pulp Mesenchymal Stem Cells**, de ahora en adelante **MSC**), cuya obtención y aislamiento se detalla en el siguiente apartado. Con ellas se han realizado la gran mayoría de los experimentos y ensayos, han sido la pieza fundamental de este proyecto. El tercer tipo son células madre mesenquimales de la médula ósea (**BM-MS** de **Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells**) y se han utilizado para verificar si las bases de este trabajo también eran extrapolables a otro tipo de célula madre mesenquimal.

2.1 OBTENCIÓN Y AISLAMIENTO DE MSC HUMANAS

Las células madre mesenquimales humanas de la pulpa dental (**MSC**) fueron obtenidas del tercer molar de pacientes con edades comprendidas entre 14 y 25 años. Dichos molares estaban sanos pero fueron extraídos por razones de ortodoncia y profilácticas. Todas las muestras fueron proporcionadas tras obtener el consentimiento informado por parte de los donantes. Todos los experimentos fueron realizados de acuerdo con las guías de investigación en células madre humanas emitidas por Comité de Ética de la Universidad Internacional de Catalunya.

El aislamiento de estas células fue llevado a cabo por el Instituto de Investigación en Medicina Regenerativa de la Universidad Internacional de Catalunya y fue el siguiente:

Inmediatamente después de la extracción, los terceros molares fueron lavados utilizando gasas empapadas al 70% en etanol y luego lavados con agua destilada estéril. A continuación, se realizó una incisión entre el esmalte y el cemento utilizando una fresa cilíndrica mientras se sujetaba el diente con fórceps incisivos superiores. Luego, se realizó una fractura en la misma dirección que la incisión utilizando dos fórceps incisivos superiores y los dos fragmentos del diente se introdujeron en un tubo Falcon con PBS estéril 1x. Rápidamente, se llevaron las células al laboratorio.

En condiciones de esterilidad, el contenido del tubo fue vertido en una placa de Petri. Los tejidos fueron aislados de la pulpa dental utilizando un extractor de nervio estéril del tipo 15 y fórceps. Luego se realizó una separación celular digiriendo el tejido de la pulpa, ya cortado, con colagenasa tipo I (3mg/mL) (Sigma-Aldrich) e incubando durante 45 minutos a 37°C de cara a digerir completamente el tejido.

Hecho esto, con una jeringuilla de insulina se realizó una separación celular mecánica. Entonces, la muestra fue centrifugada durante 10 minutos a 400 rcf para separar el medio de las células. Las células fueron lavadas 2 veces con PBS estéril y centrifugadas de nuevo 10 minutos a 400 rcf.

Finalmente, fueron resuspendidas en su medio específico y cultivadas en frascos de 650 mL (Nunc) pre tratados con 100 ng/mL de Fibronectina (Life Technologies) durante 1 hora (104).

El medio específico contiene DMEM con 4.5g/L de glucosa (D5671 Sigma-Aldrich) suplementado con 10% FBS (del inglés **Fetal Bovine Serum**) (Cultek), 2mM Glutamax (35050 Life Technologies), 100 U/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomina.

2.2 OBTENCIÓN DE MSC HUMANAS CON SOBRE-EXPRESIÓN E INHIBICIÓN ESTABLE DE LA CPT1C

A lo largo de varios meses, se realizaron diversas pruebas para sobre-expresar de forma transitoria la CPT1C en las células madre mesenquimales de la pulpa dental (MSC). Ninguna de ellas resultó exitosa.

Se probó la transfección con fosfato cálcico sin llegar al 2-3% de eficiencia. Más adelante, se probó también mediante liposomas, dicho método se basa en la combinación de lípidos catiónicos (cargados positivamente) con el material génico aniónico (cargado negativamente) para formar un agregado con carga neta positiva fácilmente fusionable con la bicapa de fosfolípidos de las membranas celulares cargada negativamente. De esta manera, el DNA o RNA es introducido al interior de la célula.

El reactivo de transfección utilizado fue *LipofectamineTM2000* (#11668 Invitrogen) y se utilizaron diferentes concentraciones de *LipofectamineTM2000* y plásmido pero tras varios intentos en el mejor de los casos se llegaba a 5% de eficiencia. Así pues, se optó por

abandonar este método que aun siendo más efectivo que el fosfato cálcico quedaba lejos de ser una técnica eficiente.

Similar a este método, la casa comercial Biontix nos ofreció 2 procedimientos alternativos: uno con el *K2® Transfection System* (T060) y el otro con *DOTAP* (T010), ninguno de los fue exitoso en ninguna de las concentraciones intentadas.

La siguiente estrategia utilizada fue mediante el uso de lentivirus con el fin de mejorar la eficiencia de la transfección en células madre mesenquimales (denominada transducción en el caso de ser mediada por infección viral).

Los lentivirus son virus de la familia Retroviridae, cuyo genoma se basa en RNA, replicándose a través de la formación por retrotranscripción de un DNA provisional. Los retrovirus dependen de transcriptasas inversas para la retrotranscripción y de integrasas para que su DNA sea insertado en el genoma de la célula huésped. Por lo que el material génico introducido es integrado y heredado por las células hijas, aunque los lentivirus ofrecen la ventaja de ser altamente eficientes no sólo en células que se dividen, sino también en células quiescentes. Sin embargo, estos lentivirus modificados no tienen la capacidad de autoreplicarse por lo que una célula infectada no es capaz de generar más viriones.

Para la generación de lentivirus, además del vector lentiviral (pWPI y pLVTHM) también son necesarios un vector de empaquetamiento vírico (cápside) y otro de envoltura vírica que permite la fusión con la membrana de la célula huésped e introducir la cápside con el genoma. Los vectores utilizados fueron psPAX2 (#12260 Addgene) y pMD2.G (#12259 Addgene), respectivamente (figura 23).

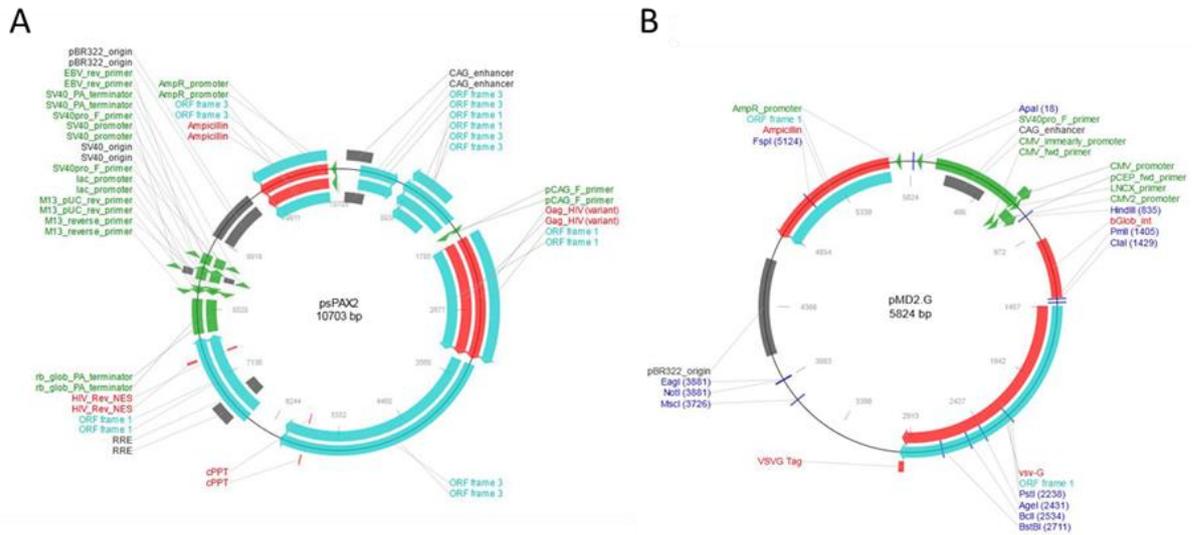


Figura 23. Descripción de los plásmidos psPAX2 y pMD2.G

Para la generación de los distintos lentivirus se siguió el método habitualmente empleado, que se basa en la transfección por fosfato cálcico de los tres vectores en células HEK293T y la purificación y titulación posterior (sección 2.4).

Este método mejoró la eficiencia de transfección llegando al 15% en los mejores casos. Como seguía siendo un porcentaje bajo para el análisis bioquímico posterior, aunque mucho más eficiente que los métodos anteriores, se procedió al aislamiento de las células infectadas mediante el citómetro de fluorescencia de separación celular, más conocidos como *FACS* (del inglés Fluorescence-Activated Cell Sorter). Estos citómetros de flujo pueden analizar partículas en función de su fluorescencia y tamaño. En nuestro caso, tanto el plásmido pWPI como el plásmido pLVTHM (figura 22) codifican para la proteína GFP (del inglés, Green Fluorescent Protein). Así pues, aquellas MSC que expresaron GFP fueron separadas del resto de la población.

A continuación, se detalla el protocolo llevado a cabo para la obtención de éstas células.

1. Aspirar el medio de un frasco de MSC que han estado creciendo en el incubador a 37°C y 5% de CO₂
2. Hacer 2 lavados con PBS, tripsinizar 5 minutos a 37°C, resuspender en medio y centrifugar 15 minutos a 1800 rpm.
3. Aspirar el sobrenadante y resuspender el pellet en 10 mL
4. Añadir 3 mL (aprox. 600000-800000 MSC) en tres tubos falcon diferentes.

5. Calcular cuántos virus debemos poner de cada tipo para introducir 10 MOI (del inglés **Multiplicity of Infection**) en 10 mL mediante la fórmula siguiente:

$$\mu\text{l virus} = 10 \text{ mL} \times \frac{n^{\circ} \text{ de células}}{\text{mL}} \times \frac{10 \text{ TU}}{\text{célula}} \times \frac{1 \text{ mL}}{n^{\circ} \text{ TU}}$$

NOTA: MOI es equivalente a unidad de transfección por célula (TU / célula)

6. Añadir los virus pertinentes en cada tubo. El tercero será el control (células sin infectar) para determinar los parámetros en el citómetro.
7. Rellenar los 3 tubos falcon hasta 10 mL.
8. Introducir cada tubo en un frasco de 175 cm² y mantener los 3 frascos en el incubador a 37°C durante 5 horas.
9. Transcurridas las 5 horas, aspirar el medio e introducir 25mL de medio fresco a cada uno.
10. Dejar los 3 frascos 5 días en el incubador a 37°C.
11. Transcurridos los 5 días, aspirar el medio de los 3 frascos, añadir PBS, tripsinizar 5 minutos a 37°C, resuspender en medio y centrifugar 15 minutos a 1800rpm.
12. Aspirar el sobrenadante y resuspender el pellet en 1 mL.
13. Transvasar el contenido de cada falcon a un criotubo de 1.8 mL.
14. Llevar los 3 criotubos al Departamento de Citometría del Centro Científico y Tecnológico de la UB en el Parc Científic de Barcelona (PCB).
15. Introducir en el FACS las MSC que **no** han estado infectadas para determinar los parámetros que permiten descartar agregados y trozos de células y poder definir correctamente el control negativo (sin fluorescencia).
16. Una vez determinados, añadir las otras 2 muestras en el citómetro y separar aquellas que emitan fluorescencia (debido a GFP).
17. Sembrar las fracciones deseadas (las que emiten fluorescencia) en frascos de 75 cm² y dejar en el incubador a 37°C del PCB O/N.
18. Transportar al laboratorio y dejar crecer hasta llegar a una confluencia del 70-80%.

A continuación, se muestra el resultado de las **MSC** que sobre-expresan la CPT1C de ratón, también el resultado del mismo protocolo aplicado a las que presentan la CPT1C (humana) silenciada y el resultado de las **BM-MS**C que sobre-expresan la CPT1C.

MSC con la CPT1C sobre-expresada:

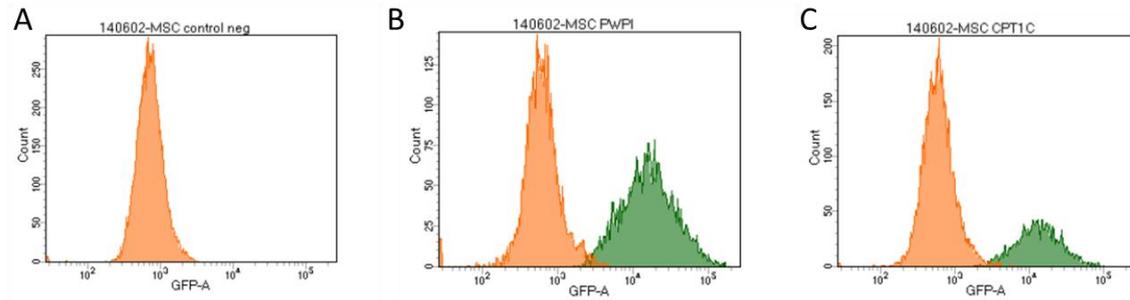


Figura 24. Diagrama de distribución de MSC analizadas por citometría de fluorescencia de separación celular. A) MSC sin infectar. B) MSC infectadas con plásmido vacío. C) MSC infectadas con plásmido de sobre-expresión de CPT1C. En naranja se muestran las células GFP negativas y en verde se muestran las células GFP positivas, que fueron seleccionadas.

MSC con la CPT1C silenciada:

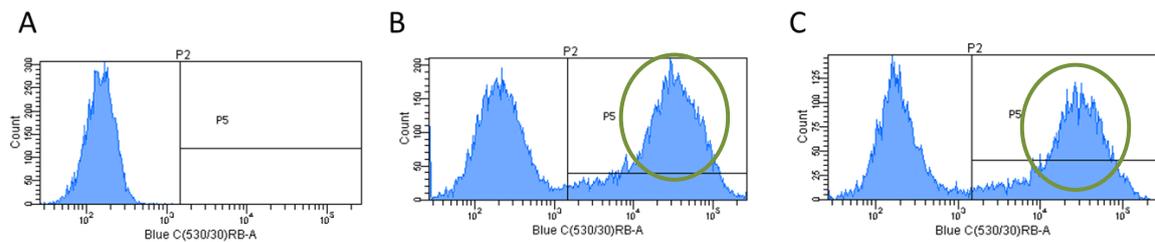


Figura 25. Diagrama de distribución de MSC analizadas por citometría de fluorescencia de separación celular. A) MSC sin infectar. B) MSC infectadas con un plásmido que contiene una secuencia de silenciamiento de una proteína aleatoria. C) MSC infectadas con un plásmido que contiene la secuencia de silenciamiento de CPT1C humana. Se muestran con un círculo verde las células GFP positivas, que fueron seleccionadas.

BM-MSc con la CPT1C sobre-expresada:

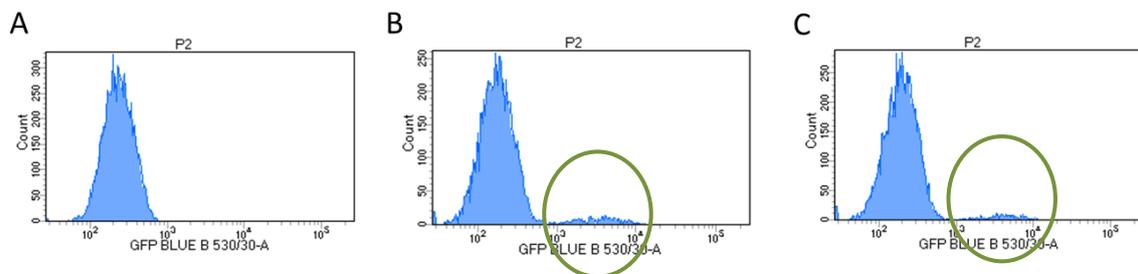


Figura 26. Diagrama de distribución de BM-MSc analizadas por citometría de fluorescencia de separación celular. A) BM-MSc sin infectar. B) BM-MSc infectadas con plásmido vacío. C) BM-MSc infectadas con plásmido de sobre-expresión de CPT1C. Se muestran con un círculo verde las células GFP positivas, que fueron seleccionadas.

Cabe destacar que en este último caso, el número de células infectadas fue muy bajo (alrededor de un 4%). Sin embargo, se aislaron y se consiguieron crecer de forma adecuada.

2.3 MANTENIMIENTO DE LÍNEAS CELULARES

En este apartado se detallan las condiciones de crecimiento de los distintos tipos celulares que han sido utilizados en este trabajo así como los procedimientos básicos de cultivo celular empleados.

En todos los casos, las células han sido mantenidas a 37°C y 5% CO₂ y cultivadas en medio de crecimiento DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) con alto contenido de glucosa (4.5 g/L) (D5671 Sigma-Aldrich) suplementado con 10% de suero inactivado (FBS), 2mM Glutamax (35050 Life Technologies) y 100 U/mL penicilina, 100 µg/mL estreptomicina.

1. **HEK293T**: Medio DMEM suplementado. Estas células se expandieron dos veces por semana mediante diluciones 1:10 mientras que se realizaban cambios de medio cada 2-3 días.
2. **MSC**: Medio DMEM suplementado. Estas células se expandieron cuando llegaron al 80% de confluencia mientras que se realizaban cambios de medio cada 3-4 días.
3. **BM-MSC**: Medio DMEM suplementado. Estas células se expandieron cuando llegaron al 80% de confluencia mientras que se realizaban cambios de medio cada 2-3 días.

Todos los reactivos usados en cultivos celulares fueron esterilizados, autoclavándolos durante 30 minutos a 121°C o bien filtrándolos con filtros de 0,22 µm (#SLGP33R3 Millipore).

2.3.1 CONTAJE DE LA CONCENTRACIÓN DE CÉLULAS

El conteo celular se realizó con la ayuda de un hematocitómetro o cámara de Neubauer. Ésta se trata de una gruesa placa de cristal con forma de portaobjetos, la cual está dividida en 9 cuadrantes de 1 mm². 10 µL de células en suspensión se colocan entre la cámara y un cubreobjetos, la media de células contadas en cuatro cuadrantes de las esquinas multiplicada por 10000 nos indicará el número de células por mL.

2.3.2 CRIOPRESERVACIÓN DE CÉLULAS

En función del tipo celular se aplicaron procedimientos distintos.

1) HEK293T: Las células cultivadas en una placa de 10 mL a una confluencia de entre el 60-70% fueron tripsinizadas (T3924 Sigma-Aldrich), suspendidas en 10 mL de medio de cultivo y centrifugadas durante 5 minutos a 300 g. El pellet de células se resuspendió con 1.5 mL de medio y 10% DMSO en un criotubo. Debido a la citotoxicidad del DMSO a 37°C, las células se depositaron inmediatamente en un contenedor con isopropanol a -80°C durante 48 horas. Transcurrido este tiempo se almacenaron en N₂ líquido.

2) MSC: A partir de un frasco de 175 cm² de MSC (GFP positivas) obtenido tras el aislamiento de las células a través del citómetro, una vez llegaron a una confluencia del 70-80% se procedió a congelarlas según el protocolo siguiente:

1. Añadir 4 mL de tripsina y dejar el frasco 5 minutos a 37°C.
2. Añadir DMEM suplementado y centrifugar 15 minutos a 1800 rpm.
3. Eliminar el SN y resuspender el pellet en 5 mL de medio 1.
4. Añadir 5 mL de medio 2 gota a gota.
5. Homogeneizar adecuadamente e introducir el contenido en criotubos.

Medio 1

90% medio habitual

Medio 2

70% medio habitual

10% FBS

10% FBS

20% DMSO

Debido a la citotoxicidad del DMSO a 37°C, las células se depositaron inmediatamente en un contenedor con isopropanol a -80°C durante 48 horas, transcurrido este tiempo se almacenaron en N₂ líquido.

Así pues, se obtuvo un “stock” denominado “master”. Se descongeló un vial, se cultivó y se volvió a congelar para tener un “stock” llamado “working”. De esta manera, siempre se ha utilizado el “stock working” para mantener en todo momento las mismas condiciones en todos los experimentos.

3) **BM-MSK**: Se hizo exactamente el mismo protocolo que en las MSC.

2.3.3 DESCONGELACIÓN DE CÉLULAS

Al igual que en la criopreservación, en función del tipo celular se aplicaron procedimientos distintos.

1) HEK293T

1. Introducir un vial en el baño a 37°C.
2. Diluir inmediatamente en 8 mL de DMEM atemperado.
3. Centrifugar 5 minutos a 300g y eliminar el sobrenadante (DMSO).
4. Resuspender en el medio deseado y sembrar en un frasco.

2) **MSC**: Igual que las células HEK293T pero el paso 3 son 15 minutos a 1800rpm.

3) **BM-MSK**: Se hizo exactamente el mismo protocolo que en las MSC.

2.4 OBTENCIÓN DE LENTIVIRUS

Para la generación de los distintos lentivirus, se siguió el protocolo descrito por el Laboratorio Trono, con ligeras modificaciones, basado en la transfección por fosfato cálcico de los tres vectores (psPAX2, pMD2.G y pWPI-CPT1C o pLVTHM-shhCPT1C) en células HEK293T. Conviene remarcar que todo el procedimiento se llevó a cabo bajo las medidas de seguridad correspondientes al nivel de bioseguridad 2 (BL2). Las distintas fases del procedimiento, desde la producción hasta la titulación son las siguientes:

2.4.1 PRODUCCIÓN DE LENTIVIRUS

1) Preparación de células para transfección

1. El día anterior a la transfección, sembrar $4 \cdot 10^6$ células/placa p100mm (3 placas por virus).
2. En el día de la transfección las células deben de estar ~ 80% confluencia

2) Transfección por fosfato de calcio

3. 2h antes de la transfección, cambiar el medio y reponer 10mL.
4. Ajustar la concentración de DNA de todos los plásmidos a 1mg/mL en TE buffer pH 8.0.
5. Para 3 placas, en un falcon de 50mL preparar la mezcla en el siguiente orden:
 - 45 μ g de pLVTHM o pWPI
 - 15.9 μ g de pMD2.G
 - 29.1 μ g de psPAX2
 - 1.3mL de TE 0.1X (final 0.03X) y 727ul de “buffered water”
 - 223uL de CaCl₂ 2.5M (final 124mM) y mezclar bien por pipeteo.
 - 2.25mL de 2x HeBS (final 1x) gota a gota y sobre agitación con vórtex (asegurará la formación de un precipitado óptimo para la transfección) $V_{\text{final}} = 4.5\text{mL}$

6. Dejar el precipitado a temperatura ambiente (por lo menos 5min y no exceder los 30 minutos) 20 minutos.
7. Añadir gota a gota 1.5mL/placa. Mezclar suavemente hasta que el medio tenga un color uniforme. Incubar O/N.
8. En la mañana siguiente, aspirar el medio y añadir lentamente 5mL de medio. Incubar 8h a 37°C.
=> Tomar imágenes de fluorescencia (GFP) en el microscopio.

3) Recogida de sobrenadantes

9. Recoger los sobrenadantes en un *Falcon* de 50mL. Cerrar el tubo, vaporizar con 75% etanol antes de sacarlo de la campana. Almacenar los sobrenadantes a 4°C
10. Añadir otros 5mL de medio e incubar otras 8-12h.
11. Recoger los sobrenadantes a la mañana siguiente, en el *Falcon* de 50mL del día anterior y añadir otros 5mL de medio e incubar otras 8-12h.
12. Recoger los últimos sobrenadantes. Mantenerlos a 4°C

4) Concentración de sobrenadantes

13. Filtrar los sobrenadantes con filtros de 0.45µm, los cuales permiten el paso de virus pero no el de restos celulares
14. Lentamente, pipetear los sobrenadantes para los tubos de 30mL de ultracentrífuga Beckman (~28mL – dejar 1cm de margen). Usar los tubos del rotor SW 28 (Beckman).
15. Ultracentrifugar 2h, 20.000rpm a 16°C.
16. Suavemente, descartar el sobrenadante por inversión.
17. Dejar secar el tubo en posición invertida (no dejar secar el pellet demasiado, cerca de 2-3 min es suficiente).
18. Resuspender el pellet (no siempre visible) con 150µl de PBS 1X, pipeteando 10-15 veces alrededor del pellet, y después subir y bajar 15 veces (el medio que queda tiene algunas proteínas importantes para la estabilización de partículas virales. Evitar la formación de burbujas cuando se resuspende el pellet).
19. Hacer alícuotas de 10ul y almacenar a -80°C.

Tampón TE 1x pH 8: 10 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM EDTA pH 8

Agua tamponada: 50 mL agua mQ + 125 µL de 1 M HEPES pH 7.3 (2.5 mM final).

Esterilizar con filtro de 0,22 µm y almacenar hasta 6 meses a 4°C.

CaCl₂ 2.5M: 9.18g CaCl₂·2H₂O en 25 mL de H₂O. Esterilizar con filtro de 0.22µm
Almacenar a 4°C.

2x HeBS (*HEPES Buffered saline*): Disolver en 800 mL de agua: 16.36g NaCl (280 mM final), 11.9g HEPES (50mM final), 267 mg Na₂HPO₄·2H₂O (1.5mM final). Ajustar el pH a 7.00 con 5M NaOH y enrasar con agua a 1L y comprobar el pH final a 7.00 (el pH es crítico porque debajo de 6.95 el precipitado no se forma; por encima de 7.05 el precipitado será grande y la eficiencia de transfección baja). Esterilizar con filtro de 0.22µm. Almacenar hasta 2 años en alícuotas de 50mL a -70°C. Una vez descongelada, la solución de HeBS se puede mantener a 4°C durante varias semanas.

2.4.2 TITULACIÓN DE LENTIVIRUS

El título es un valor que expresa la concentración de virus en un determinado volumen.

Para conocer este valor se lleva a cabo la titulación, en la cual se emplean una serie de diluciones para obtener información cuantitativa aproximada de un procedimiento analítico en el que se evalúa si las células infectadas emiten fluorescencia. El título corresponde al factor de dilución más alto que todavía produce una lectura positiva. A continuación se detalla el procedimiento y el análisis de la titulación mediante citometría de flujo.

1) Titulación en células HEK293T

1. Primer día (9-12h): Sembrar 70.000 células/pocillo en placas de 24 pocillos

2. Segundo día (16-18h):

- I. Contar las células de 2 pocillos y hacer la media.
- II. Quitar la mitad del volumen de cada pocillo (250µL)
- III. Transducir las células con 8 diluciones 1:2, añadiendo 1 µL de cada dilución

IV. Dejar un pocillo sin virus como control negativo.

3. Tercer día (9-12h): Añadir 1 mL de medio de cultivo

4. Quinto día: Recoger las células para analizarlas por citometría de flujo.

I. Lavar con PBS 1x, añadir 200 μ L de tripsina (5 minutos a 37°C)

II. Añadir 600 μ L de medio, centrifugar en *ependorfs* durante 10 minutos a 1500rpm, aspirar el medio y hacer 2 lavados con PBS 1x.

III. Resuspender el sedimento de células en 500 μ L de PBS 1x.

2) Análisis de la titulación por citometría de flujo (FACS)

El análisis de las muestras por citometría de flujo se basa en pasar las células suspendidas en un fluido (PBS en este caso) por un finísimo tubo transparente sobre el que incide un haz de luz láser. La luz transmitida y dispersada por el pasaje de células a través del tubo se recoge por medio de unos dispositivos de detección, permitiendo hacer inferencias en cuanto al tamaño y la complejidad de las células. La técnica de clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS: *Fluorescence-Activated Cell Sorting*) es un tipo especializado de citometría que, como ya se ha comentado previamente, provee un método para la identificación de células según las características particulares de dispersión y fluorescencia de cada célula.

Primeramente, con la ayuda de otros miembros del laboratorio, fue identificada la población de células HEK293T. Seguidamente, a partir de células transfectadas con GFP y de células sin transfectar como control negativo, se marcaron los parámetros en el citómetro (BD FACSaliburTM) de modo que permitía discriminar las células en función de la señal de fluorescencia. Los datos proporcionados por el citómetro fueron analizados con el programa *WinMDI* de modo que para cada muestra se pudo calcular el porcentaje de células GFP positivas y negativas. A partir de estos valores se generó la curva de diluciones (figura 27) y se calculó la concentración de virus (TU/mL: Unidades de transducción por mL) mediante la siguiente fórmula:

$$\text{TU/mL} = \frac{\% \text{ células GFP positivas} \times \text{número de células Día 2}}{\mu\text{L de virus}}$$

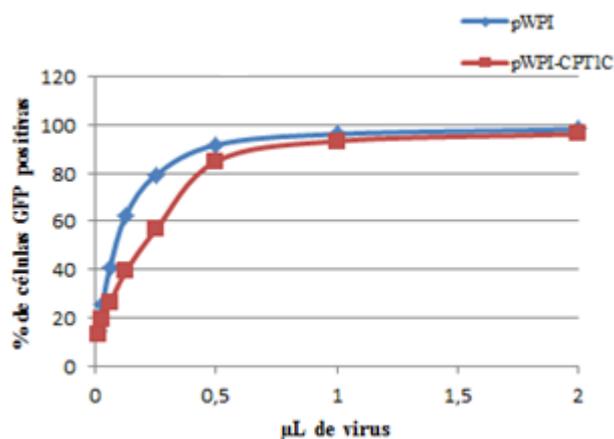


Figura 27. Representación aproximada de cómo ha sido generada la curva de diluciones

2.5 ANÁLISIS DE LA SUPERVIVENCIA CELULAR MEDIANTE MTT

El MTT (bromuro de 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) es un compuesto que puede ser reducido a formazan como se indica en la figura 28. Esta reducción se lleva a cabo cuando las enzimas de tipo reductasa de las células están activas, por la cual cosa la conversión se utiliza como una medida de viabilidad celular.

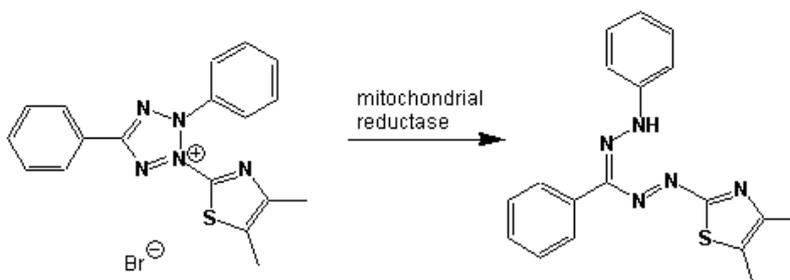


Figura 28. Reacción de reducción del MTT a formazan

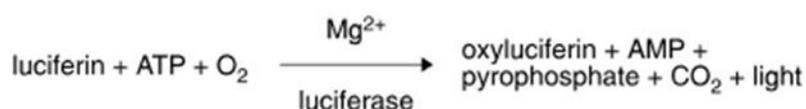
1. Sembrar 40000 células/pocillo en placas de 48 pocillos y mantener 3 días en el incubador a 37°C.
2. Realizar los tratamientos convenientes.
3. Añadir MTT (Sigma M2128) directamente a las células a una concentración final de 0.2 g/L en cada pocillo. El MTT stock está disuelto en agua a una concentración de 5g/L. Es importante mantener la luz de la campana de extracción apagada ya que este reactivo es fotosensible.
4. Incubar la placa 40-60 minutos (preferiblemente 60) en el incubador a 37°C.

5. Aspirar el medio con MTT de los pocillos y disolver los cristales de formazan que se han formado mediante la adición de DMSO (250 μ L en cada pocillo de placa de 48). Añadir DMSO a un pocillo sin células para realizar el blanco de la reacción.
6. Realizar una agitación de 3 segundos en el lector de microplacas de multi-detección Synergy HT de Biotek® para la correcta homogeneización de la muestra. Leer la absorbancia a 570 nm inmediatamente ya que el producto final es inestable.

2.6 ENSAYO DE PRODUCCIÓN DE ADENOSINA TRIFOSFATO (ATP)

Para poder evaluar la cantidad de energía en forma de adenosina trifosfato (ATP) que producen las células madre mesenquimales en diferentes condiciones se optó por utilizar uno de los kits más ampliamente utilizados para la determinación de ATP (A22066 *Life Technologies*).

Dicho método se basa en un ensayo de bioluminiscencia para la determinación cuantitativa de ATP. Más precisamente, se produce una reacción en que la luciferasa consume/oxida el pigmento luciferina con gasto de ATP, de manera que esta reacción de oxidación emite luz y nos permite averiguar la cantidad de luz emitida que será proporcional a la cantidad de ATP consumido



Primeramente, se deben preparar las muestras para que el pH sea lo más próximo a 7.8. Una vez obtenido, ya se puede proceder al uso del kit.

A continuación, se detalla el procedimiento que se ha llevado a cabo:

1. Sembrar a 40000 células/mL en placas de 60mm (p60) utilizando 4 placas por condición.
2. Realizar los tratamientos convenientes.
3. Aspirar el medio de 3 placas (la cuarta será para cuantificar la proteína).

4. Hacer un lavado con PBS frío y recoger las células con la ayuda de un rascador en 600 μL de HClO_4 4% por placa p60.
5. En hielo, sonicar 5s cada muestra e incubar 10 minutos.
6. Centrifugar 10 minutos a 10000g a 4°C.
7. Añadir 300 μL de sobrenadante en un *ependorf* de 1.5 mL.
8. Neutralizar los 300 μL con 22.15 μL de K_2CO_3 5M.
9. Homogeneizar la muestra con el vórtice y medir el pH. Debe estar a pH= 7.8, en caso contrario, neutralizar la muestra hasta dicho pH.

Una vez obtenida la muestra, proceder a realizar el ensayo de ATP.

10. Realizar una recta patrón con muestras desde 1 nM a 500 nM de ATP.
11. Añadir 10 uL de cada muestra de concentración conocida en una placa de 96 pocillos con fondo blanco.
12. Realizar una dilución 1:10 de todas las muestras a analizar.
13. Añadir 10 uL de cada muestra problema en la placa de 96 pocillos.
14. Preparar la solución de Reacción:

Solución de Reacción (2.5mL)

H ₂ O	2.225 mL
20x Tampón de Reacción	125 uL
0'1M DTT	25 uL
10mM Luciferina	125 uL
Luciferasa	0.625 uL

15. Añadir 90 uL de “Solución de Reacción” en cada pocillo de la placa.
16. Llevar a cabo la lectura de luminiscencia a 550 nm en el lector. El lector debe estar a 28°C.
17. Hecha la lectura, recoger las células de la placa restante con ayuda de un rascador en tampón de lisis en un *ependorf* de 1.5 mL.
18. Incubar en hielo 10 minutos.

19. Centrifugar 10 minutos a 10000g a 4°C.
20. Cuantificar mediante la técnica de Bradford y relativizar los valores obtenidos en la lectura.

2.7 ENSAYO DE OXIDACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS

Los distintos ensayos de oxidación realizados en este trabajo se han llevado a cabo en las instalaciones de radioactividad de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Barcelona. Para ello se utilizó el método que describió Roduit y colaboradores (172). La técnica se basa en el principio por el cual la oxidación de palmitato a CO₂ indica la oxidación total de la molécula de ácido graso, de manera que el CO₂ radioactivo producido por las células es proporcional a la oxidación del ácido graso marcado radioactivamente. Como se muestra en la figura 29, el ácido graso es recogido en un papel humedecido con KOH. Seguidamente se detallan las distintas fases de este método.

1) Preparación de las células

Se siembran 650000 células/frasco en frascos de 25 cm². Las distintas condiciones de cada experimento son ensayadas por triplicado. Además, en todos los experimentos hay que añadir un punto extra para la cuantificación de proteína y otro punto extra como control negativo, el cual consiste en realizar exactamente los mismos pasos en un frasco sin células.

2) Reacción de oxidación

1. Primeramente se preparan las siguientes soluciones:

- A. KRB 5x: para 500 mL: NaCl (19.72g), KCl (0.67g), NaH₂PO₄ (0.17g), MgSO₄ (0.25g), CaCl₂ (0.55g), agua hasta 500 mL (el CaCl₂ debe prepararse en primer lugar porque puede precipitar). Almacenar a 4°C.

- B. KRBH: para 100 mL: 20 mL de KRB5x, 2 mL de NaHCO₃ 100 mM (extemporáneo), 1 mL de HEPES 1M pH 7.4, 77 mL de agua. Preparar el mismo día del ensayo.
- C. KRBH + 0.1% BSA: para 45 mL: añadir 150 µL de 30% BSA a 45 mL de KRBH. Filtrar con filtro de 0.45 µm
- D. KRBH + 1% BSA: para 15 mL: añadir 500 µL de 30% BSA a 14.5 mL de KRBH. Filtrar con filtro de 0.45 µm.
- E. 30% BSA: Disolver 15g de BSA desgrasado (A-6003 Sigma-Aldrich) en 50 mL de KRBH. Alicuotar y almacenar a -20°C.
- F. 3mM [1-¹⁴C] palmitato-BSA: Para 5 mL: disolver 4.176 mg de palmitato sódico en 500 µL de 0.1N NaOH durante 5 minutos a 80°C. Añadir 500 µL de [1-¹⁴C] palmitato (CFA243-50 mCiGE Healthcare). Añadir esta solución (1mL) gota a gota a una solución de 1% BSA (disolver 0.5g de BSA desgrasado en 4.5 mL de 0.9% NaCl a 37°C al baño maría) y mantener en agitación durante 5 minutos. Filtrar con un filtro de 0.22 µm, hacer alícuotas de 1 mL y almacenar a -20°C.
2. Seguidamente se añaden 100 µL de KOH 0,1N a recortes de 2x2 cm de papel *Whatman* y se dejan secar. Mientras tanto se procede con los siguientes pasos.
 3. Se lava el frasco para la cuantificación de proteína con 1 mL de PBS 1x y se recogen las células en 500 µL de tampón de lisis.
 4. Se lavan el resto de frasco con 3 mL/frasco de KRBH + 0.1% BSA.
 5. Posteriormente, se incuban con 2 mL/frasco de KRBH + 1% BSA durante 30 minutos a 37°C.
 6. A continuación se vuelven a lavar con 3 mL/frasco de KRBH + 0.1% BSA.
 7. Se añade la mezcla de reacción de oxidación de palmitato a razón de 2 mL/frasco.

Mezcla de Reacción

KRBH	1.6mL
3 mM [1- ¹⁴ C] palmitato-BSA	200 µL
*5 mM glucosa + 8 mM carnitina	200 µL

* Se realizó con 5mM, o bien, en ausencia de glucosa

8. Cerrar los frascos con el montaje del tapón de goma, el tubo de PVC y el papel *whatman* con KOH y sellar con *parafilm*.
9. Incubar durante 3 horas a 37°C en un incubador libre de CO₂.

3) Fijación del CO₂

10. Pasadas las 3 horas, parar la reacción con la adición de 200 µL de 40% HClO₃ mediante una jeringa de 1 mL con aguja. Volver a sellar con *parafilm*.
11. Incubar O/N a temperatura ambiente.

4) Contaje de la radioactividad

12. Desmontar el sistema y transferir el papel Whatman a un vial de centelleo con 5 mL de líquido de centelleo.
13. Añadir un vial de centelleo extra con 50 µL de 3 mM [1-¹⁴C] palmitato-BSA para conocer las cuentas totales.
14. Incubar O/N
15. Contar la radioactividad de los viales.

Los resultados se expresan como:

$\text{nmol de palmitato} \cdot \text{mg}^{-1} \text{prot} \cdot \text{h}^{-1} = (\text{cpm} - \text{cpm blanco}) \times 600 / (\text{cpm totales} \times \text{mg prot} \times \text{h})$,
donde 600 son los nmol totales de palmitato por frasco y cpm totales son las cuentas correspondientes a los 200 µL de palmitato añadidos por frasco.

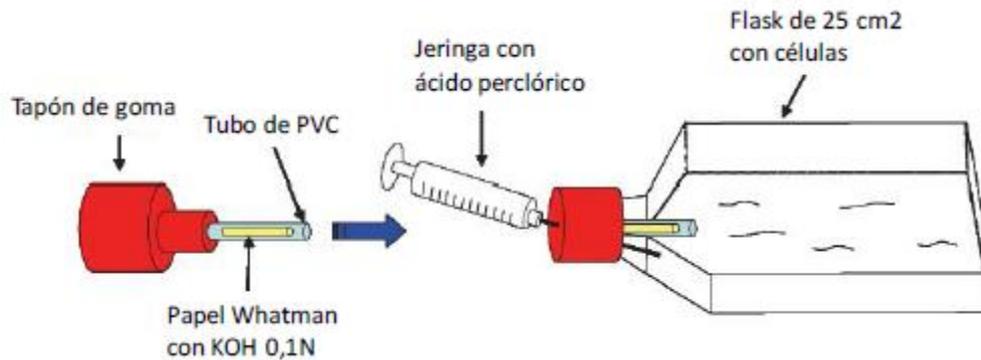


Figura 29. Sistema de oxidación de palmitato en frasco de 25 cm². La mezcla de reacción se añade al frasco y el sistema se cierra herméticamente con un tapón de goma que dispone de un tubo de PVC con un papel *Whatman* con KOH en el interior. Los frascos se incuban durante 3 horas a 37°C (adaptado de la tesis de JM Orellana).

2.8 TINCIÓN DE CUERPOS LIPÍDICOS

NILE RED® es un colorante fluorescente (C₂₀H₁₈N₂O₂) utilizado para la tinción de lípidos neutros y la visualización de cuerpos lipídicos intracelulares. Siguiendo las indicaciones de la casa comercial, el reactivo NILE RED® se preparó a una concentración stock de 0.2 mg/mL en acetona (400x) y el tratamiento de las células se llevó a cabo acorde al procedimiento que se describe con NILE RED®.

1. Sembrar 50000 células/pocillo en placas de 24 pocillos sobre cubreobjetos previamente autoclavados y pre-tratados con poli-L-lisina (añadir 500 µL/pocillo de 0,01% poli-L-lisina y mantener durante 2 horas a 37°C, lavar 2 veces con PBS autoclavado y dejar secar durante 30 minutos a 37°C). Mantener 3 días en el incubador a 37°C
2. Realizar los tratamientos convenientes.
3. Lavar 2 veces con PBS1x.
4. Fijar las células durante 15 minutos a 4°C con 4% paraformaldehído.
5. Lavar 2 veces con PBS 1x (en este punto se pueden guardar las células a 4°C varios días).
6. Diluir el stock en PBS1x a una concentración final de 0.5 µg/mL. Teñir los lípidos neutros con NILE RED® durante 15 minutos a temperatura ambiente.

7. Lavar 2 veces con PBS 1x.
8. Teñir los núcleos celulares con Hoechst durante 5 minutos a temperatura ambiente
Diluir el stock (se encuentra a 1000x) en PBS 1x.
9. Lavar 2 veces con PBS 1x.
10. Montar los cubreobjetos con el medio de montaje acuoso Fluoromount-G® (Southern Biotech) sobre los portaobjetos previamente rotulados.
11. Dejar secar durante varias horas protegidos de la luz. Almacenar a 4°C.
12. Analizar por microscopia de fluorescencia.

3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados se expresan como el promedio \pm SEM. El análisis comparativo de los resultados obtenidos se realizó mediante el programa *GraphPad Prism 5* utilizando el test estadístico de la *t-student*. Cuando se compararon más de dos grupos, se empleó la ANOVA de dos factores con test de Bonferroni *post hoc*. Con valores de p obtenidos inferiores a 0.05 se considera que hay diferencias estadísticamente significativas entre las muestras analizadas y en consecuencia en los gráficos se muestra con el símbolo “*”. Cuando los valores obtenidos son inferiores a 0.01 se muestra como “**” y cuando son inferiores a 0.005 como “***”.

CAPÍTULO 5

RESULTADOS

PARTE I

¿SE EXPRESA CPT1C EN CÉLULAS MADRE?

Con el paso de los años, ha quedado patente que la similitud entre las células tumorales y células madre es realmente elevada.

Una de las más relevantes es que ambos tipos celulares muestran una capacidad de renovación ilimitada y esto las hace prácticamente inmortales.

Otra característica común es que ambos tipos de células se dividen de manera que aseguran su auto-renovación. También es destacable que una célula tumoral puede mantenerse en estado de quiescencia igual que una célula madre, lo cual sugiere que ésta puede ser la causa de una recidiva cinco o diez años después del tratamiento inicial.

Así pues, el primer objetivo ha sido averiguar si CPT1C se expresa en células madre de la misma manera que lo hace en células tumorales.

1. CPT1C SE EXPRESA EN CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES

Para averiguar si las células madre son capaces de expresar (o no) CPT1C, se realizaron experimentos de PCR cuantitativa (o PCR en tiempo real). Los tipos celulares analizados fueron:

- 1) Células MCF-7 (línea tumoral humana de cáncer de pecho), que ya se conoce que expresan CPT1C (35).
- 2) Células madre mesenquimales procedentes de la pulpa dental.
- 3) Células madre pluripotentes también procedentes de la pulpa dental, también conocidas como DPPSC (60).
- 4) Células madre pluripotentes procedentes de la pulpa dental (DPPSC) diferenciadas a osteoblasto. La diferenciación se llevó a cabo durante 3 semanas.

Éstas últimas se utilizaron para verificar si se observaba una disminución en la expresión de CPT1C durante la diferenciación ya que su expresión no está descrita en hueso. Los tres tipos de células madre fueron amablemente cedidos por el grupo dirigido por el Dr. Atari.

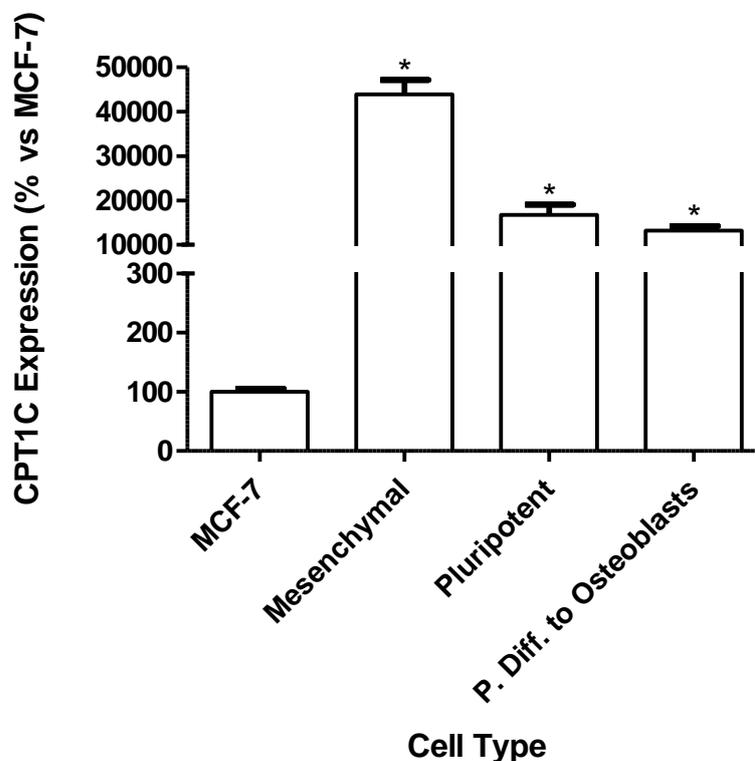


Figura 30. Niveles de mRNA de CPT1C en distintos tipos celulares mediante experimentos de PCR cuantitativa. Los tipos celulares son la línea tumoral MCF-7, células madre mesenquimales, pluripotentes y pluripotentes diferenciadas a osteoblastos. GAPDH: Control de carga. *: $p < 0.05$ vs MCF-7. $n=2$

Los datos obtenidos muestran que CPT1C se expresa (al menos a nivel de RNA) en células madre mesenquimales (figura 30). También se expresa pero en mucha menor proporción en células pluripotentes y ligeramente menos en pluripotentes diferenciadas a hueso. A las tres semanas de cultivo en medio de diferenciación se realizó una tinción con *Alizarina*, que es un marcador de depósitos de calcio y se observaron dichos depósitos pero dado que CPT1C está expresada, posiblemente la diferenciación a osteoblastos no haya sido total y, en consecuencia, siguen expresando dicha proteína.

Es interesante indicar que la expresión de CPT1C es mucho mayor en células madre que en la línea tumoral MCF-7. Aun así, más adelante, se publicó que aunque en

MCF-7 los niveles de CPT1C son considerables, no lo son tanto como en sarcomas o en enfermedades relacionadas con el sistema nervioso central (48).

Debido a que las mesenquimales expresan el triple de CPT1C que las pluripotentes y además son más fáciles de manipular, tanto a nivel logístico como económico, se decidió realizar los experimentos posteriores con células madre mesenquimales.

2. LAS CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES EXPRESAN NIVELES SIMILARES DE CPT1C EN COMPARACIÓN CON CEREBRO HUMANO

Dado que CPT1C se expresa mayoritariamente en cerebro, se quiso analizar los niveles de expresión de CPT1C, tanto a nivel de RNA como de proteína, en células madre mesenquimales y en cerebro.

Casi todos los anticuerpos humanos disponibles en el mercado dan lugar a bandas mayoritarias supuestamente inespecíficas, así que, para resolver este problema, se decidió sobre-expresar la CPT1C humana utilizando el plásmido pIRES2-eGFP (Figura 31, A) y verificar si el anticuerpo de Sigma era capaz de detectarla. Una vez diseñado, se transfectaron células 293T con el plásmido vacío (EV, del inglés **E**mp**T**y **V**ector) y 293T con el plásmido con CPT1C humana y se realizó un Western Blot contra este anticuerpo. El resultado se puede observar en la figura 31, B.

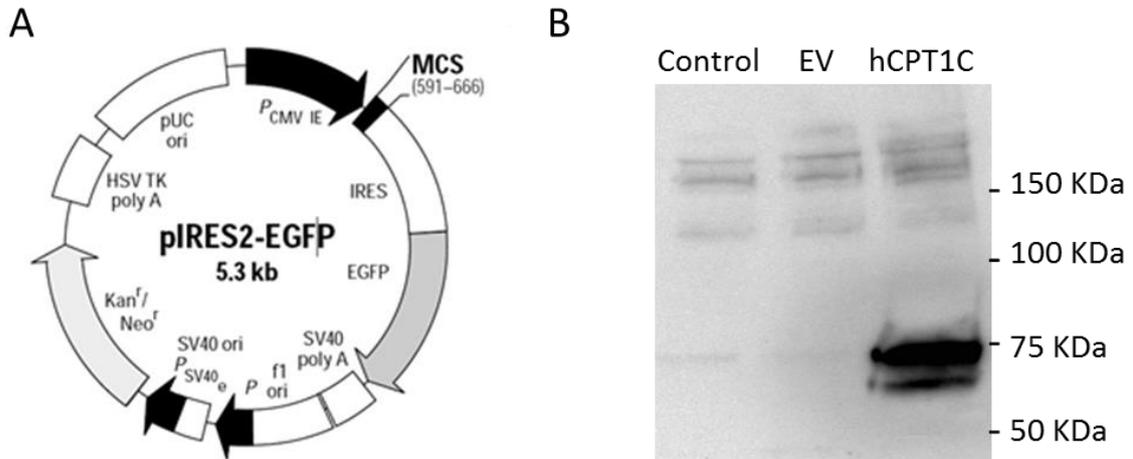


Figura 31. A) Estructura del plásmido pIRES2-eGFP. B) WB de CPT1C humana. Se muestran 293T sin transfectar (control), 293T transfectadas con el plásmido vacío (EV) y 293T transfectadas con el plásmido pIRES-eGFP-hCPT1C (hCPT1C).

Esta imagen demuestra claramente que el anticuerpo de la casa comercial Sigma contra CPT1C humana (SAB2501194) sí detecta la forma humana pero no a 100 KDa como se afirma en el “DataSheet”, sino a 75 KDa. Este resultado no solo demostró que CPT1C humana se desplaza como un fragmento de 75 KDa sino que abrió ampliamente este trabajo ya que permitió poder analizar la expresión de CPT1C por Western Blot.

Tal y como se comentaba al inicio de este apartado, se compararon los niveles de expresión de CPT1C en cerebro humano y en células madre mesenquimales (figura 32, A). Como se puede visualizar, los niveles de mRNA se muestran aumentados unas diez veces en las MSC respecto al cerebro humano. Hay que matizar que solo un 10% del cerebro son neuronas y CPT1C se expresa exclusivamente en neuronas con lo cual probablemente los niveles sean similares. Además, el cerebro fue obtenido unas 24-48h “post-mortem” lo cual también conlleva que se pueda degradar el mRNA.

A nivel de proteína (figura 32, B), se compararon las SH-SY5Y (línea tumoral de neuroblastoma humana) junto con cerebro humano y células madre mesenquimales (de ahora en adelante MSC). Mientras que en MSC se observa una banda nítida de hCPT1C y en las SH-SY5Y también, en el cerebro humano apenas se aprecia señal. Como se discutía anteriormente, puede ser debido a que solo un 10% son neuronas y/o al hecho de ser una muestra “post-mortem”.

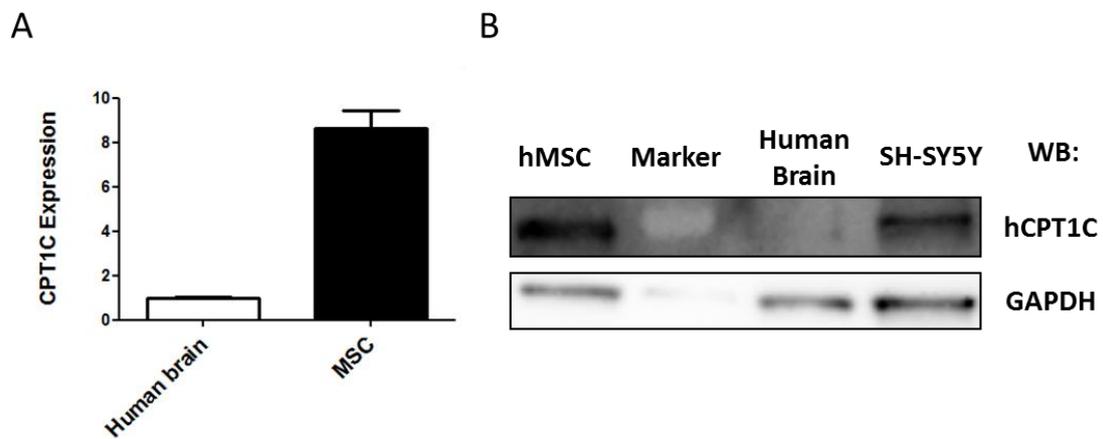


Figura 32. Expresión de CPT1C. A) Comparación a nivel de RNA mediante experimentos de PCR cuantitativa entre cerebro humano y MSC. B) Comparación a nivel de proteína mediante experimentos de WB entre cerebro humano, MSC y la línea tumoral SH-SY5Y. GAPDH: Control de carga. n=2

Estos resultados confirman que CPT1C se expresa en células madre mesenquimales (MSC) adultas derivadas de la pulpa dental.

PARTE II

¿ES CAPAZ CPT1C DE PROTEGER A LAS MSC EN SITUACIONES DE ESTRÉS METABÓLICO?

Una vez se concluyó que CPT1C se expresa en células madre mesenquimales (MSC), el siguiente paso fue analizar si, en situación de estrés metabólico, CPT1C les confiere protección.

Como se ha descrito en el capítulo “Materiales y métodos”, se sobre-expresó CPT1C de ratón en MSC mediante la infección con lentivirus y posterior aislamiento de las células infectadas por fluorescencia con un citómetro de flujo (FACS). Hecho esto, el primer paso fue verificar que CPT1C estaba sobre-expresada (figura 33, A) y que dicha sobre-expresión no afectaba a la viabilidad celular (figura 33, B, curvas roja y azul).

Como muestra la imagen, CPT1C está claramente sobre-expresada en las células seleccionadas por FACS. Conviene recordar que el anticuerpo utilizado es contra la CPT1C de ratón ya que es la forma sobre-expresada, en consecuencia, aparece una banda en las MSC que sobre-expresan CPT1C pero no en las que tienen el plásmido vacío (EV) dado que son MSC humanas y el anticuerpo de ratón no detecta la forma humana.

Por lo que se refiere al crecimiento de las MSC, se contabilizó el número de células a diferentes días. Se probaron dos condiciones, en presencia de niveles normales de FBS (10%) y en condiciones de restricción de FBS al 1 %. Tal y como queda patente en la figura 33, B (curvas verde y lila), no se visualizan variaciones significativas en el crecimiento, lo que sugiere que la sobre-expresión de CPT1C no afecta a la proliferación de las MSC.

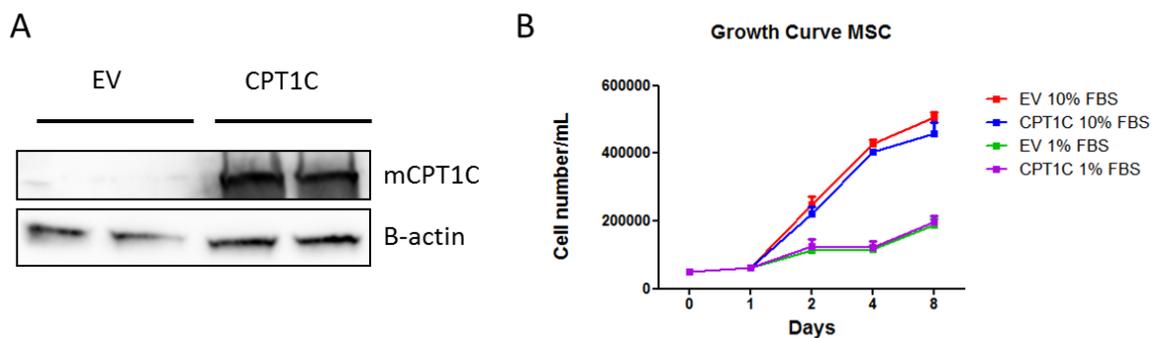


Figura 33. Verificación de la expresión y del crecimiento de las MSC que presentan la CPT1C sobre-expresada. A) WB de MSC transfectadas con el plásmido vacío (EV) y MSC transfectadas con la secuencia que sobre-expresa CPT1C (CPT1C). B-actina: Control de carga B) Curva de crecimiento a lo largo de 8 días de MSC con plásmido vacío (EV) o que sobre-expresan CPT1C (CPT1C) al 10% de suero (FBS) (curvas roja y azul) y al 1% de suero (curvas verde y lila).

3. CPT1C PROTEGE LAS MSC EN AUSENCIA DE GLUCOSA O CUANDO SON TRATADAS CON 2-DESOXI-D-GLUCOSA (2-DG)

Para evaluar si CPT1C confiere (o no) protección a las MSC, se analizaron un total de siete factores de estrés distintos, los cuales son:

1. **Ausencia de glucosa:** Se trata de eliminar del medio el principal sustrato energético de estas células. Además, simula una disminución de los niveles de malonil-CoA, que es el inhibidor fisiológico de las CPT1. Es uno de los dos factores de estrés en los que protege CPT1C en células tumorales (35).
2. **2-desoxi-d-glucosa (2-DG):** Se trata de un inhibidor de la glucólisis. Está ampliamente demostrado que no se activan los mismos mecanismos de estrés intracelulares que en ausencia de glucosa (173).
3. **Hipoxia:** Es uno de los dos factores de estrés en los que protege CPT1C en células tumorales (35).
4. **Privación de oxígeno y glucosa (OGD):** Combinación simultánea de una ausencia de glucosa y de oxígeno.
5. **H₂O₂:** El peróxido de hidrógeno induce estrés oxidativo en las células.
6. **Tapsigargina:** Induce estrés en el retículo endoplasmático, que es el orgánulo donde se localiza la CPT1C.

7. **Palmitato sódico:** Igual que la tapsigargina, induce estrés en el retículo endoplasmático.

Antes de llevar a cabo los experimentos oportunos, se optó por disminuir el suero al 1% en todos ellos con el objetivo de reducir el grado de proliferación celular y evitar el efecto distorsionador de la proliferación sobre la medida de supervivencia celular.

De hecho, en la figura 33,B curvas verde y lila, quedan de manifiesto dos hechos: el primero es que con un 1% de FBS disminuye considerablemente el crecimiento de las MSC en comparación con aquellas que han crecido con un 10%. Esta variación ya resulta significativa a partir de las 24h post- privación de suero. El segundo es que el ligero crecimiento con un 1% de suero no varía entre las MSC con el vector vacío (EV) y aquellas que sobre-expresan CPT1C. Así pues, para reducir al máximo el posible efecto compensatorio del suero, todos los experimentos han sido realizados con solo un 1% de FBS.

En todos los experimentos realizados, para poder visualizar el posible efecto protector de CPT1C, se ha empleado el tiempo necesario y la dosis adecuada para que las MSC control (EV) murieran un 50% aproximadamente como consecuencia del estrés.

En primer lugar, se evaluó cómo afectaba la sobre-expresión de CPT1C a las MSC en un medio privado de glucosa o cuando son sometidas al tratamiento con 2-desoxi-d-glucosa (2-DG).

Para analizar la viabilidad celular en ausencia de glucosa, se dejaron las MSC 72 horas sin glucosa (figura 34, A), mientras que en el caso del inhibidor, se trataron las MSC con 50 mM de 2-DG durante 72 horas (figura 34, B).

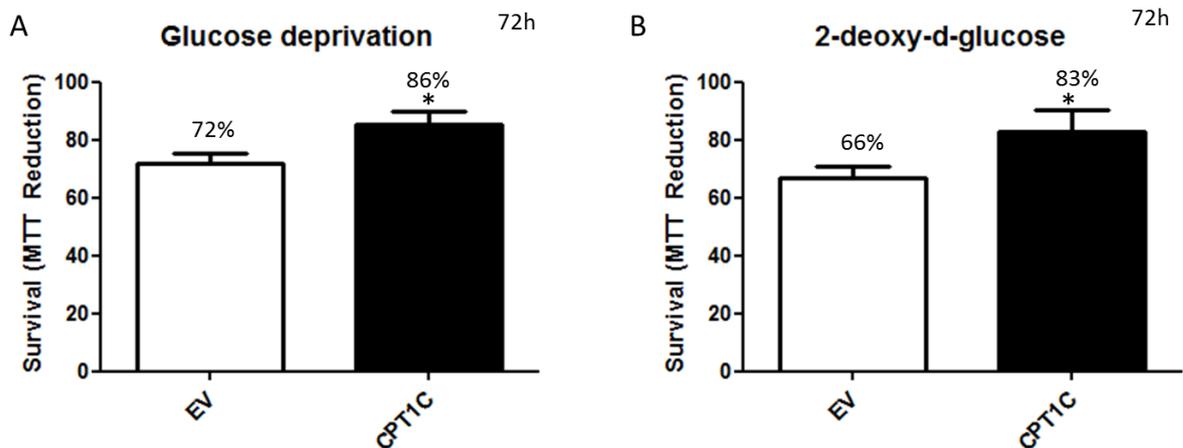


Figura 34. Análisis de la viabilidad celular mediante MTT de las MSC control (EV) y de las MSC que sobre-expresan CPT1C. A) En ausencia de glucosa durante 72h. B) Sometidas a 50 mM 2-DG durante 72h. Encima de las barras de error se indica el porcentaje de supervivencia *: $p < 0.05$. $n=4$

Tanto el gráfico A como el B demuestran que CPT1C ejerce un efecto protector en ambos casos. Más precisamente, cuando son privadas de glucosa o bien se inhibe la glucólisis con 2-DG, las MSC que sobre-expresan CPT1C sobreviven un 20% y un 25% más respectivamente que las células control.

4. CPT1C PROTEGE LAS MSC CUANDO SON PRIVADAS SIMULTÁNEAMENTE DE GLUCOSA Y DE OXÍGENO

Los siguientes factores de estrés evaluados fueron la hipoxia y la privación simultánea de oxígeno y glucosa (OGD, del inglés **Oxygen and Glucose Deprivation**). Estos experimentos fueron realizados en el Instituto de Neurociencias de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Barcelona gracias a la amabilidad del Dr. José Rodríguez.

En el caso de la hipoxia, se analizó la viabilidad celular manteniendo las MSC durante 24h con un 0.6% de O_2 . En el caso de la OGD, las MSC se mantuvieron durante 24h con un 0.6% de O_2 y simultáneamente sin glucosa.

A continuación, se muestran los resultados:

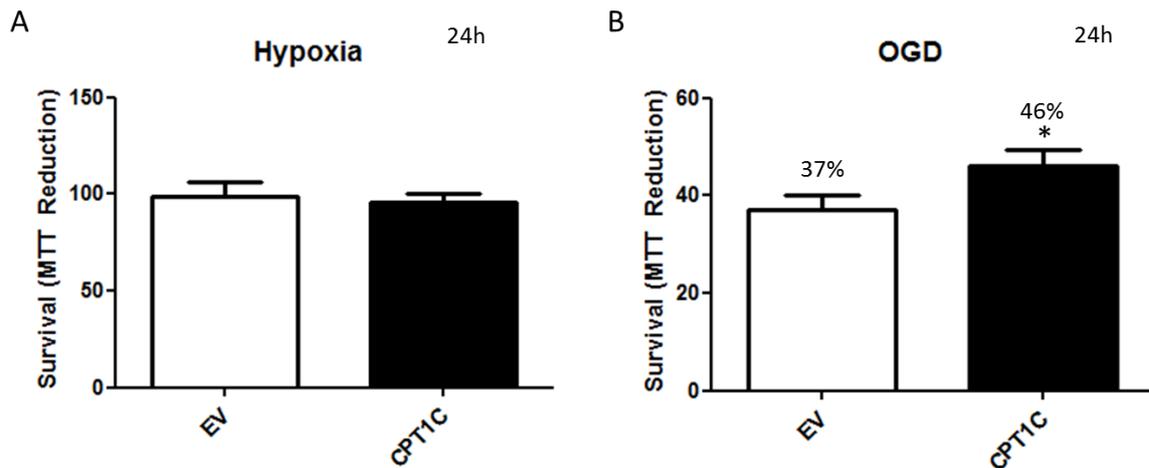


Figura 35. Análisis de la viabilidad celular mediante MTT de las MSC control (EV) y de las MSC que sobre-expresan CPT1C. A) En hipoxia con un 0.6% de O₂ durante 24h B) Privadas de oxígeno y glucosa durante 24h. Encima de las barras de error se indica el porcentaje de supervivencia. *: p< 0.05. n=3

Por un lado, en el caso de la hipoxia, se percibe que tras 24 horas las MSC prácticamente no han muerto, en consecuencia, no podemos extraer conclusiones sobre el posible papel protector de CPT1C. No se ha optado por realizar un tiempo más largo (48h o 72h) debido a la imposibilidad de mantener el incubador de hipoxia activo tanto tiempo. El hecho de no apreciar mortalidad en las MSC demuestra, tal y como está ampliamente descrito en la bibliografía, que son totalmente capaces de vivir en ambientes de hipoxia y altamente resistentes, gracias a la glucólisis anaeróbica. En cambio, se observa que tras 24 horas en OGD, aquellas MSC que tienen la CPT1C sobre-expresada sobreviven un 20% más que las células control.

Teniendo esto en cuenta, la protección que lleva a cabo la CPT1C cuando las MSC son privadas de oxígeno y glucosa (OGD) sugiere que es un efecto debido a la ausencia de glucosa y no a la ausencia de oxígeno, pues 24h sin oxígeno no induce muerte celular en MSC.

5. CPT1C NO PROTEGE LAS MSC CUANDO SON TRATADAS CON H₂O₂ NI CON FACTORES DE ESTRÉS DE RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO

Tras los resultados anteriores, nos propusimos estudiar si era posible que otro factor de estrés oxidativo indujera muerte celular y eso nos permitiera averiguar si CPT1C

desarrollaba un rol protector. Para realizar estos experimentos se utilizó el peróxido de hidrógeno. En concreto, se trataron las MSC con 150 μM de H_2O_2 durante 24h. Como muestra la figura 36, A en esta ocasión sí murieron las MSC y aquellas que sobre-expresaban CPT1C no consiguieron una mayor supervivencia. Estos resultados demuestran que, en MSC, CPT1C no protege en situaciones donde se produce estrés oxidativo.

El siguiente paso fue averiguar si dicha protección se producía cuando las MSC se trataban con un inductor de estrés en retículo endoplasmático. Para ello se utilizaron dos inductores distintos. Por un lado se trataron las MSC con 10 μM de thapsigargina durante 24h y por otro lado con 500 μM de palmitato sódico durante 48h (figura 36, B y C).

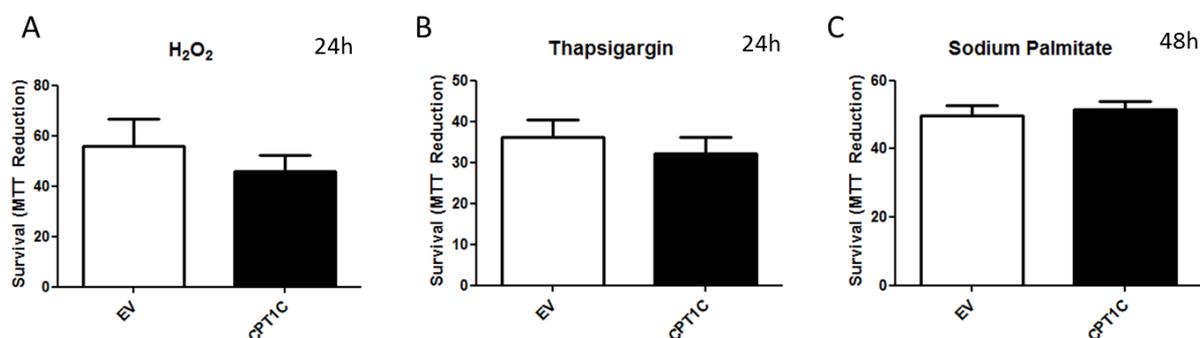


Figura 36. Análisis de la viabilidad celular mediante MTT de las MSC control (EV) y de las MSC que sobre-expresan CPT1C. A) Tratadas con 150 μM de H_2O_2 durante 24h. B) Tratadas con 10 μM de thapsigargina durante 24h. C) Tratadas con 500 μM de palmitato sódico durante 48h. n=3

Estos resultados permiten concluir que aunque se induzca estrés en el retículo endoplasmático, las MSC sobreviven lo mismo esté sobre-expresada o no la CPT1C, lo cual sugiere que CPT1C no es protectora frente a este tipo de estrés.

6. EL SILENCIAMIENTO DE CPT1C INCREMENTA LA MORTALIDAD DE LAS MSC EN AUSENCIA DE GLUCOSA O CUANDO SON TRATADAS CON 2-DESOXI-D-GLUCOSA (2-DG)

OBTENCIÓN DE LAS MSC CON CPT1C SILENCIADA

Una vez realizadas todas las condiciones descritas, llegamos a la conclusión que la CPT1C confería protección a las MSC siempre y cuando el metabolismo de la glucosa estuviera alterado. En caso contrario, no confería protección.

Llegados a este punto, resultó de especial interés explorar si se producía un efecto contrario silenciando la CPT1C, dicho en otras palabras, si disminuía la supervivencia de las MSC.

En primer lugar, se diseñaron dos plásmidos utilizando las dos secuencias inhibitorias de la CPT1C humana a partir de los datos que publicaron Zaugg y colaboradores (35). Una vez diseñados, el primer objetivo fue verificar si realmente eran capaces de silenciar la CPT1C. Para verificarlo, se transfectaron 293T con pIRES2-eGFP-hCPT1C (el mismo plásmido que el utilizado en el “resultado 2”, que sobre-expresa la CPT1C humana), 293T transfectadas con cada una de las secuencias de silenciamiento únicamente y finalmente 293T transfectadas con el plásmido de sobre-expresión y silenciamiento simultáneamente. Se obtuvo el resultado indicado en la figura 37.

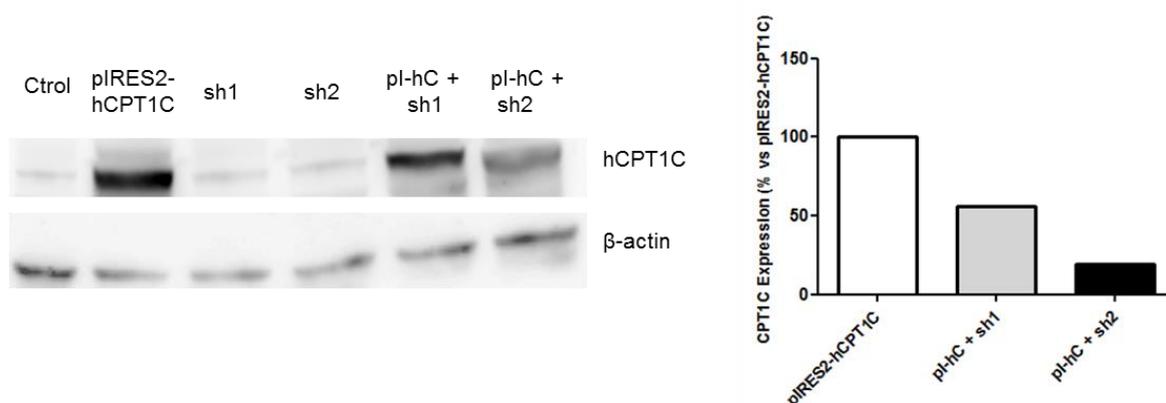


Figura 37. Silenciamiento de la CPT1C humana sobre-expresada en 293T mediante Western Blot. Se muestran seis extractos distintos. El primero son células 293T (ctrl), el segundo son 293T con el plásmido y la secuencia de CPT1C humana insertada (pIRES-hCPT1C), el tercero son 293T infectados con la secuencia de silenciamiento 1 de CPT1C humana (sh1), el cuarto son 293T infectados con la secuencia de silenciamiento 2 de CPT1C humana (sh2), el quinto son 293T con el plásmido y la secuencia de CPT1C humana insertada más el plásmido con la secuencia de silenciamiento 1 de CPT1C humana (pI-hC + sh1) y el sexto son 293T con el plásmido y la secuencia de CPT1C humana insertada más el plásmido con la secuencia de silenciamiento 2 de CPT1C humana (pI-hC + sh2). B-actina: Control de carga. n=2

Analizando la imagen se pueden extraer varias conclusiones. La primera de ellas es que la sobre-expresión ha sido exitosa tal y como muestra el segundo carril; la segunda es que los plásmidos silencian correctamente la CPT1C (quinto y sexto carril), dado que

disminuye la intensidad de banda; y la tercera es que parece que la secuencia 2 silencia mejor la CPT1C en 293T que la secuencia 1.

Así pues, la secuencia 2 es la secuencia que se ha utilizado para silenciar la CPT1C humana.

Para obtener dichas MSC con la CPT1C silenciada, se infectaron las células con el lentivirus que contenía la secuencia 2 de silenciamiento de la CPT1C humana (shCPT1C). Como control, se utilizaron MSC infectadas con una secuencia aleatoria (Random). Todas ellas, al igual que cuando se realizó la sobre-expresión, fueron separadas por fluorescencia mediante un citómetro de flujo (FACS).

En la figura siguiente (figura 38) se muestra el resultado obtenido:

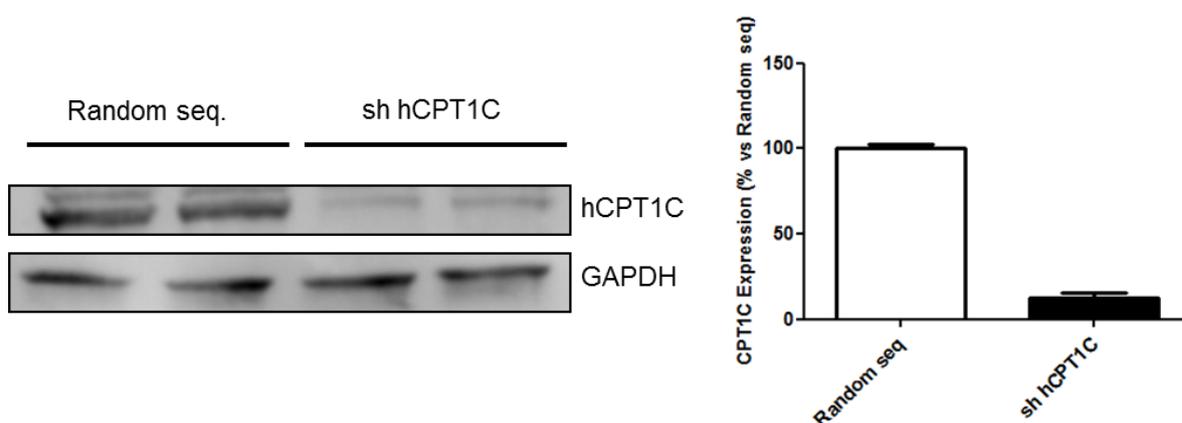


Figura 38. Análisis de la expresión de CPT1C en MSC. Se muestran MSC con secuencia aleatoria (Random seq.) o con secuencia silenciadora de CPT1C (sh hCPT1C). GAPDH: Control de carga. n=2

El resultado muestra que la infección con el sh2 da lugar a un buen silenciamiento, dejando una expresión residual del 12%.

Esta imagen corrobora la complejidad en la identificación de la banda ya que existe una banda inespecífica ligeramente superior a 75KDa. Probablemente, esta sea la imagen más evidente que CPT1C se expresa en células madre humanas adultas, un hecho que no había sido descrito hasta la fecha.

Todos los experimentos llevados a cabo a partir de ese momento con CPT1C silenciada se realizaron con estas MSC.

ESTUDIO DE LA VIABILIDAD DE LAS MSC CON CPT1C SILENCIADA EN SITUACIÓN DE ESTRÉS METABÓLICO

Llegados a este punto, se procedió a realizar el experimento deseado para saber si el silenciamiento de CPT1C disminuía la supervivencia de las MSC en alguna situación de estrés metabólico.

Debido a que la protección se había observado en ausencia de glucosa, cuando eran sometidas a 2-DG y en situación de OGD pero en esta última no parecía influir el oxígeno, únicamente se realizaron ensayos de viabilidad con silenciamiento de CPT1C en los dos primeros casos.

Se mantuvieron las mismas condiciones que la sobre-expresión. Así pues, para analizar la viabilidad celular en ausencia de glucosa, se dejaron las MSC 72 horas sin glucosa (figura 39, A) y por otra parte, se trataron las MSC con 50 mM de 2-DG durante 72 horas (figura 39, B).

Tal y como puede resultar evidente, se mantuvieron las células con un 1% FBS durante los experimentos para poder comparar con la sobre-expresión.

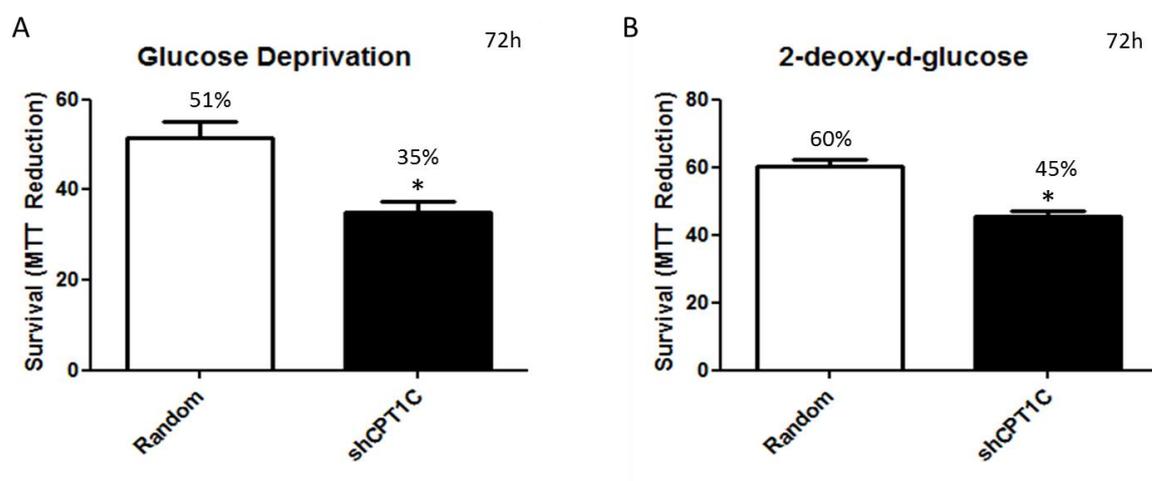


Figura 39. Análisis de la viabilidad celular mediante MTT de las MSC control (Random) o con CPT1C silenciada (shCPT1C). A) En ausencia de glucosa durante 72h. B) Sometidas a 50 mM 2-DG durante 72h. Encima de las barras de error se indica el porcentaje de supervivencia. *: $p < 0.05$. $n=4$

En ambas situaciones se observa el mismo efecto, es decir, tanto en ausencia de glucosa como cuando se inhibe la glucólisis, en las MSC que presentan la CPT1C silenciada incrementa la mortalidad alrededor de un 30%.

7. CPT1C PROTEGE LAS MSC DE LA MÉDULA ÓSEA EN AUSENCIA DE GLUCOSA O CUANDO SON TRATADAS CON 2-DESOXI-D-GLUCOSA (2-DG)

Hasta el momento, se ha visto la importancia de CPT1C en la viabilidad celular de las MSC de la pulpa dental. En este punto quisimos demostrar si CPT1C sería capaz (o no) de proteger MSC de otro origen.

Para averiguarlo, se utilizaron MSC de la médula ósea. De ahora en adelante, para diferenciarlas de las que provienen de la pulpa dental, las denominaremos BM-MSc (del inglés **B**one-**M**arrow **M**esenchymal **S**tem **C**ells). Éstas fueron compradas a la casa comercial ATCC (PCS-500-012) y cedidas amablemente por el Dr. Josep Clotet de la Universitat Internacional de Catalunya. Se trata de células madre mesenquimales adultas extraídas a partir de un cultivo primario de un paciente humano.

De la misma manera que las que proceden de la pulpa dental, se sobre-expresó la CPT1C mediante la infección con lentivirus y posterior aislamiento de éstas por fluorescencia con un citómetro de flujo (FACS)

El primer paso fue asegurar que la CPT1C estaba correctamente sobre-expresada (figura 40).

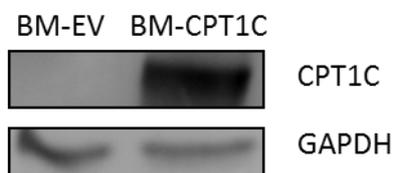


Figura 40. Verificación de la expresión de CPT1C en BM-MSc que presentan la CPT1C sobre-expresada. WB de BM-MSc transfectadas con el plásmido vacío (BM-EV, del inglés Empty Vector) y BM-MSc transfectadas con la secuencia que sobre-expresa CPT1C (BM-CPT1C). GAPDH: Control de carga

Una vez se supo que presentaban la CPT1C sobre-expresada, se realizaron las mismas condiciones que con las MSC de la pulpa dental para analizar, mediante MTT, si

aumentaba la supervivencia. Para ello, por un lado se dejaron las MSC 72 horas sin glucosa (figura 41, A) y se analizó la viabilidad celular. Por otro lado, se trataron las MSC con 50 mM de 2-DG durante 72 horas y se observaron los efectos de la inhibición de la glucólisis (figura 41, B).

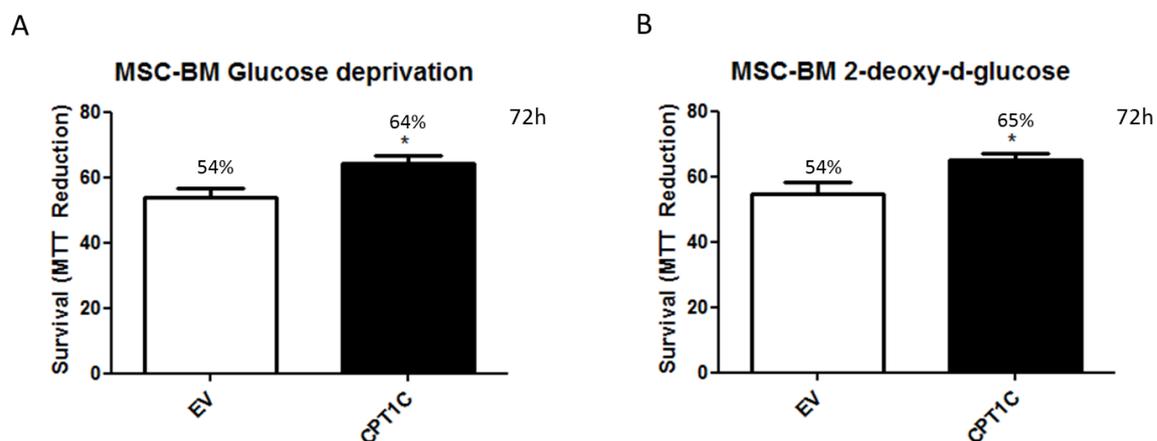


Figura 41. Análisis de la viabilidad celular mediante MTT de las BM-MSc control (EV) y BM-MSc que sobre-expresa la CPT1C. A) En ausencia de glucosa durante 72h. B) Sometidas a 50 mM 2-DG durante 72h. Encima de las barras de error se indica el porcentaje de supervivencia. *: $p < 0.05$. $n=3$

Estos datos demuestran que la CPT1C no solo ejerce un papel protector en MSC procedentes de la pulpa dental sino que también lo desarrolla en MSC procedentes de la médula ósea. Este efecto se produce tanto en ausencia de glucosa como cuando son tratadas con 2-DG.

Conviene remarcar que estos son los únicos experimentos en los cuales se han utilizado las BM-MSc, así pues, todo el trabajo desarrollado en esta tesis se ha llevado a cabo con MSC procedentes de la pulpa dental.

8. LA AUSENCIA DE GLUCOSA INCREMENTA LA EXPRESIÓN DE CPT1C ENDÓGENA EN MSC

Una vez se concluyó que CPT1C ejercía un rol protector y que su silenciamiento promovía mortalidad celular, quisimos averiguar si había variaciones en la expresión de la CPT1C endógena en MSC en ausencia de glucosa o tratadas con 2-DG.

En primer lugar, se dejaron las MSC al 1% de suero sin glucosa durante 24h y 48h utilizando como control MSC al 1% de suero con 25 mM glucosa, que es la concentración habitual. Mediante WB se observa un ligero aumento de la expresión de CPT1C a 24h, que resulta más evidente a 48h post-privación tal y como muestra la figura 42, A.

A partir de este resultado, se quiso saber si tratando las MSC con 2-DG también se obtenía un resultado similar pero no se observó ningún cambio. Se dejaron las MSC al 1% de suero con 2-DG 50mM durante 24h utilizando como control MSC al 1% suero sin tratar. No aumentó la expresión de CPT1C (figura 42, B) y tras 48h tampoco hubo variación.

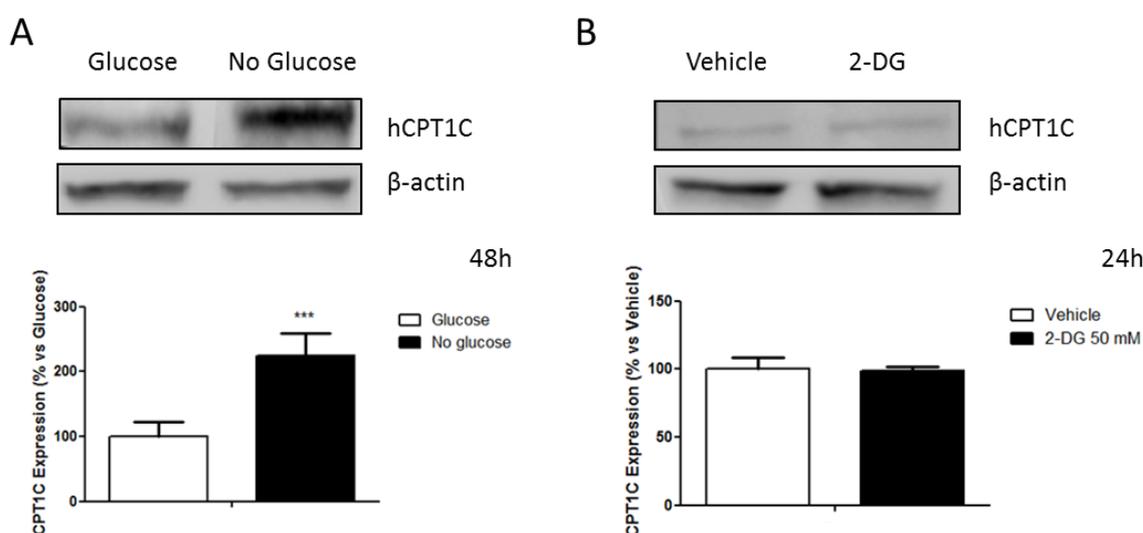


Figura 42. Expresión de CPT1C en MSC en situación de estrés metabólico. A) En ausencia de glucosa durante 48h. B) Sometidas a 50 mM 2-DG durante 24h. ***: $p < 0.005$. β -actina: Control de carga. $n=4$

Este resultado demuestra que los niveles de glucosa modulan la expresión de CPT1C de forma que se duplica la cantidad de esta proteína en ausencia de glucosa. En cambio, la inhibición de la glucólisis con 2-DG no altera la expresión de CPT1C.

A partir de este punto y de cara a experimentos posteriores, se decidió utilizar únicamente la glucosa como factor de estrés metabólico ya que es el único que controla la expresión endógena de CPT1C.

PARTE III

IDENTIFICACIÓN DEL MECANISMO A TRAVÉS DEL CUAL CPT1C PROTEGE A LAS CÉLULAS MADRE Y, EN CONSECUENCIA, PROMUEVE LA SUPERVIVENCIA CELULAR

En esta tercera parte, se describirá con detalle todos los experimentos llevados a cabo para dilucidar el mecanismo a través del cual CPT1C protege las células madre, dando lugar al aumento ya mencionado de la supervivencia celular.

9. LA PROTECCIÓN QUE CONFIERE CPT1C NO ÉSTA INDUCIDA POR AMPK

El primer experimento que se elaboró fue analizar si era AMPK quién inducía este efecto protector a través de CPT1C. La razón es la siguiente:

Es sabido que durante el ayuno se producen muchos cambios metabólicos, entre ellos la activación de AMPK, la cual se fosforila a sí misma y, a continuación, fosforila e inhibe a ACC (del inglés Acetyl-CoA Carboxylase), de manera que disminuyen los niveles intracelulares de malonil-CoA, aliviando la inhibición que ejerce éste sobre CPT1 y permitiendo de este modo la β -oxidación mitocondrial de ácidos grasos (figura 43).

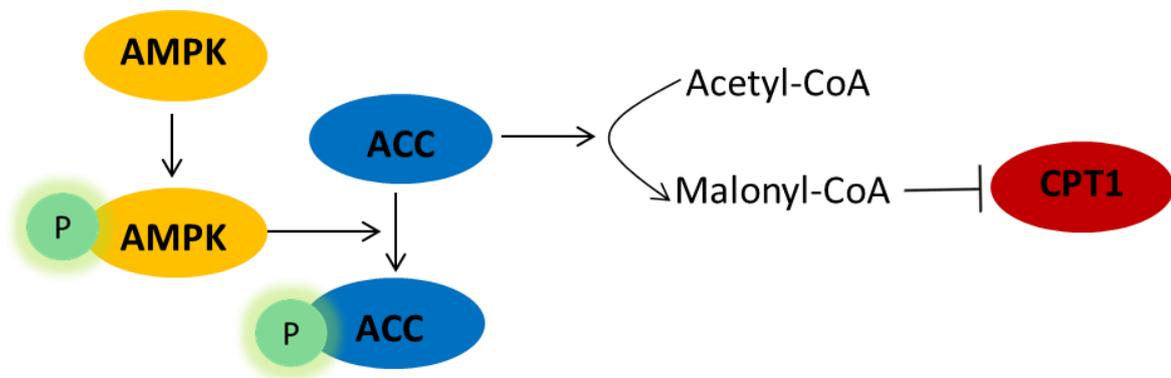


Figura 43. Descripción de la ruta metabólica AMPK-ACC-Malonil-CoA-CPT1

Dado que en ausencia de glucosa, se activa AMPK y siguiendo la ruta metabólica descrita se activa CPT1C, creímos que el efecto protector podía ser inducido vía AMPK. Curiosamente, cuando comparamos en condiciones fisiológicas, MSC control y MSC que presentaban CPT1C sobre-expresada todo parecía indicar que esta hipótesis tenía sentido dado que, tal y como muestra la figura 44, las células que presentan la CPT1C sobre-expresada tienen mayor expresión de pAMPK y pACC. Por lo que se refiere a CPT1A no hay variaciones. Este hecho no debe sorprender ya que es posible que pAMPK comporte un aumento de pACC, disminuyan los niveles de malonil-CoA y podría aumentar la actividad CPT1 pero no tiene por qué variar la expresión de CPT1A.

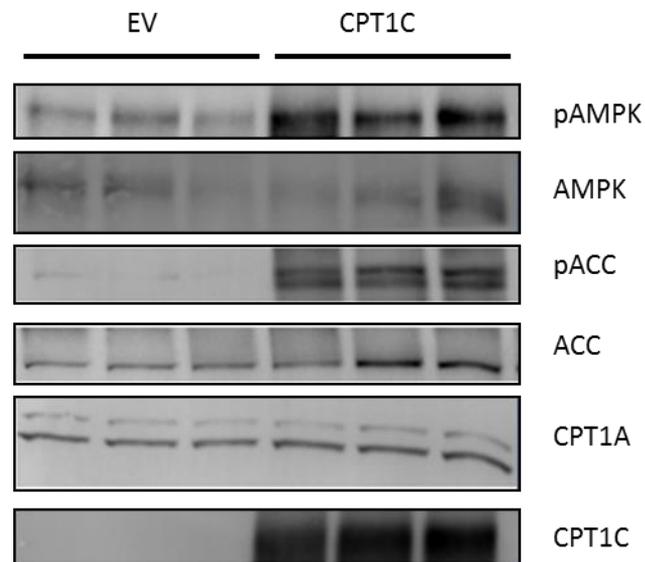


Figura 44. Expresión de proteínas involucradas en la ruta AMPK-ACC-CPT1 en MSC. WB de pAMPK, AMPK, pACC, ACC, CPT1A y CPT1C en MSC transfectadas con el plásmido vacío (EV) y MSC transfectadas con la secuencia que sobre-expresa CPT1C (CPT1C). n=3

Este resultado fue sorprendente e inesperado ya que en condiciones fisiológicas, únicamente sobre-expresando CPT1C, ya se observa un aumento de pAMPK y pACC sugiriendo que hay un “feedback positivo” en el cual, no solo un aumento de pAMPK, a través de la ruta anteriormente descrita, incrementa la actividad de CPT1C sino que el simple hecho de sobre-expresar CPT1C estaría incrementando pAMPK.

Analizando esta imagen, parecería evidente que AMPK es la responsable del efecto protector de la sobre-expresión de CPT1C. Teniendo en cuenta que AMPK es una quinasa que fosforila diversas proteínas y activa diferentes rutas de señalización, se decidió

verificar esta hipótesis con un inhibidor de la activación de AMPK y observar si se suprimía esta protección. El inhibidor utilizado fue dorsomofina, también llamado Compuesto C.

La idea inicial fue tratar las MSC con Compuesto C, mantenerlas durante 72h sin glucosa y analizar si desaparecía el efecto protector de CPT1C. Como tras hacer un seguimiento a las 24, 48 y 72h, se observó que el Compuesto C era capaz de inhibir la fosforilación de AMPK hasta las 48h y, a las 72h se producía un “efecto rebote”, se optó por tratar las MSC cada 24h.

Así pues para saber la dosis adecuada de Compuesto C, a continuación, se muestran MSC con CPT1C sobre-expresada tratadas con diferentes dosis de inhibidor cada 24h hasta las 72h.

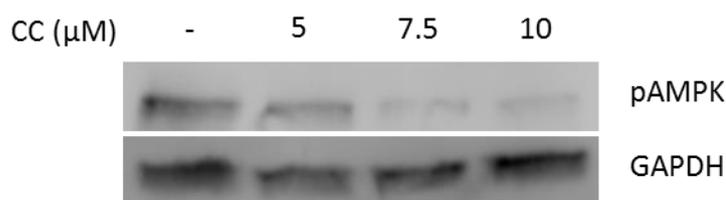


Figura 45. Expresión de pAMPK en MSC que presentan CPT1C sobre-expresada en presencia de Compuesto C (CC). Se han tratado MSC con diferentes dosis de Compuesto C (5, 7.5 y 10 μM) cada 24h. GAPDH: Control de carga. n=2

Como se puede apreciar, tratando con 10 μM Compuesto C cada 24h hasta las 72h se consigue una casi total inactivación de AMPK.

Hecho esto se procedió a realizar el experimento deseado consistente en tratar MSC control y MSC que sobre-expresan CPT1C con 10 μM Compuesto C añadido cada 24h hasta las 72h. Durante estas 72h, las células estuvieron sin glucosa y al 1% de suero. El resultado es el siguiente (figura 46):

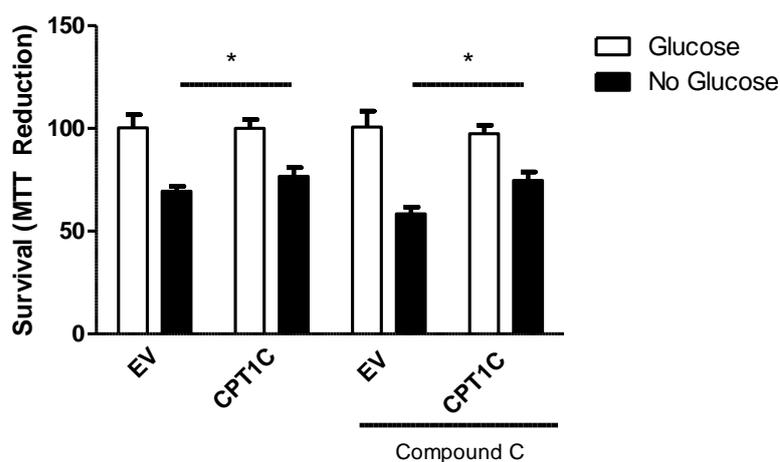


Figura 46. Análisis de la viabilidad celular mediante MTT de las MSC control (EV) y MSC con CPT1C sobre-expresada en presencia o ausencia de 10 μ M Compuesto C y en presencia (barras blancas) o ausencia (barras negras) de glucosa durante 72h. Se ha añadido 10 μ M Compuesto C cada 24h hasta las 72h. Todas ellas se han mantenido al 1% FBS. *: $p < 0.05$ $n=3$

Estos resultados nos llevaron a concluir que las MSC con CPT1C sobre-expresada no sobreviven más debido a la inducción de la activación de AMPK ya que aunque AMPK esté inhibida (con Compuesto C en este caso), CPT1C sigue ejerciendo su rol protector.

10. CPT1C NO CONFIERE MAYOR CAPACIDAD OXIDATIVA DE ÁCIDOS GRASOS A LAS MSC

Dado que en esta protección no interviene la vía AMPK-ACC-CPT1 se procedió a analizar el estado energético de las MSC.

En primer lugar, se optó por analizar si la sobre-expresión de CPT1C aumentaba la capacidad de oxidación de los ácidos grasos de las MSC. La razón principal para proceder a este tipo de ensayo es que las enzimas CPT1A y CPT1B tienen como función principal oxidar ácidos grasos. Y aunque es cierto que está descrito que CPT1C tiene poca actividad catalítica, merecía la pena estudiar que ocurría cuando estaba sobre-expresada.

La segunda razón por la que consideramos oportuno esta prueba fue que Zaugg y colaboradores habían demostrado que las células tumorales que sobre-expresaban CPT1C

sobrevivían más gracias a una mayor capacidad oxidativa de ácidos grasos (35). En consecuencia, resultaba plausible que las células madre, al tener tanta similitud con las células tumorales, usaran un mecanismo parecido.

Los ensayos de oxidación de ácidos grasos fueron realizados en la sala de radioactividad de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Barcelona en colaboración con Joan Mir y la Dra. Dolors Serra.

En primer lugar, se llevó a cabo el ensayo de oxidación de ácidos grasos con palmitato sódico marcado con carbono 14 de la manera habitual cuando se realizan este tipo de experimentos, es decir, manteniendo las células con 5mM glucosa. Esta concentración es la más utilizada y consiste en reducir un 80% la glucosa del medio fomentando así la oxidación.

Se analizó la capacidad oxidativa en MSC con el plásmido vacío y en MSC con la CPT1C sobre-expresada y el resultado se muestra en la figura 47, A. Se muestra la conversión del palmitato radioactivo a CO₂ y a cuerpos ácidos solubles (ASP, del inglés Acid-Soluble Products) (cuerpos cetónicos). Este gráfico muestra que las MSC que presentan la CPT1C sobre-expresada no solo no oxidan más ácidos grasos sino que incluso se observa una disminución significativa de los niveles de CO₂ radioactivo, en consecuencia, ni oxidan más ácidos grasos tal y como hipotetizábamos ni producen más ATP por esta vía.

Resultó tan sorprendente este dato que consideramos que tal vez como las MSC obtienen más del 90% de energía a partir de la glucólisis, estarían utilizando esa pequeña cantidad de glucosa (5mM) para sobrevivir ya que los valores de oxidación de ácidos grasos son extremadamente bajos.

Entonces procedimos a realizar el mismo experimento en ausencia total de glucosa y así no dar otra alternativa a las MSC que no fuera oxidar ácidos grasos. Como muestra la figura 47, B se sigue observando una pequeña disminución de la capacidad oxidativa en las MSC con CPT1C sobre-expresada aunque en este caso no resulta significativa, posiblemente porque el tamaño de la muestra no es suficientemente grande.

Independientemente del tamaño de la muestra, queda patente que la sobre-expresión de CPT1C no conlleva un aumento de la capacidad oxidativa de ácidos grasos.

Conviene comentar que la figura muestra un resultado coherente entre sí ya que al pasar de 5mM de glucosa a ausencia total de glucosa, las MSC aumentan considerablemente la oxidación de las grasas (unas 50 veces).

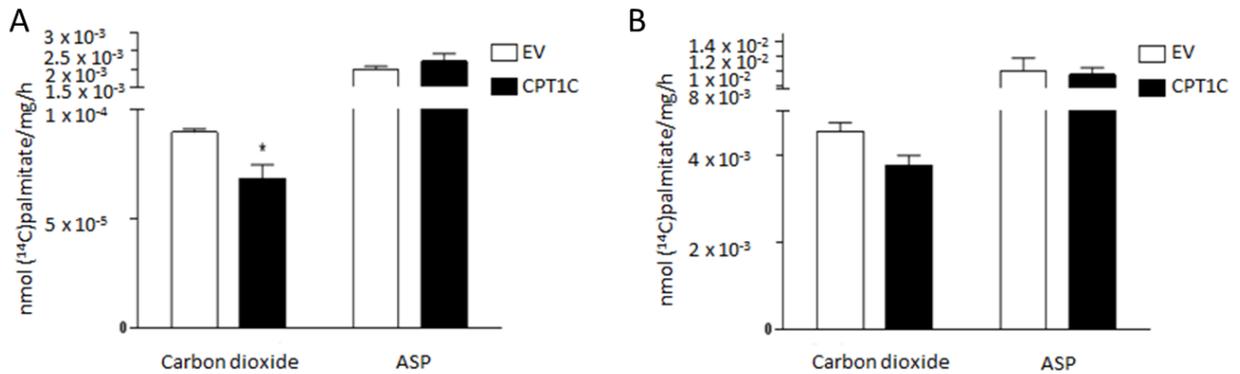


Figura 47. Análisis de la capacidad oxidativa de ácidos grasos de las MSC con plásmido vacío (EV) o con plásmido que sobre-expresa la CPT1C en A) presencia o B) ausencia de glucosa. En la figura A la concentración empleada de glucosa ha sido 5mM. *: $p < 0.05$. $n=2$

Aun así, si comparamos los valores de oxidación de estos ensayos con los valores de células que usan los ácidos grasos como sustrato energético principal, como los adipocitos (1nmol/ [mg x h]) (174), resulta evidente que estos valores son irrisorios, demostrando que las MSC oxidan pocas grasas, tal y como está ampliamente descrito por la comunidad científica.

Lo que resulta evidente con estos ensayos es que, a diferencia de las células tumorales, la sobre-expresión de CPT1C no conlleva mayor capacidad oxidativa de ácidos grasos por parte de las mitocondrias en MSC.

Este resultado, sorprendente a la vez que interesante, rechazaba la segunda hipótesis que se había planteado al inicio de este manuscrito.

A pesar que no hubo variaciones en los ensayos de oxidación de ácidos grasos, se quiso analizar si estaban alterados los niveles de expresión de CPT1A, ya que es la enzima encargada de introducir los ácidos grasos en el interior de las mitocondrias para su posterior β -oxidación. Asimismo, se analizó por WB la expresión de CPT1A tras 4 y 24 horas sin glucosa y en ningún caso se observó un aumento de expresión como se muestra en la figura 48.

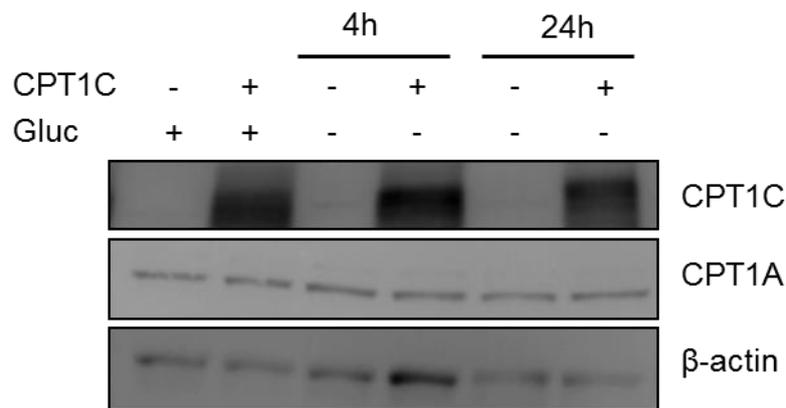


Figura 48. Expresión de CPT1A en MSC control y en MSC que sobre-expresan la CPT1C en presencia o ausencia (de 4 y de 24h) de glucosa. β-actina: Control de carga

Es cierto que podría variar la actividad CPT1 pero no tiene por qué aumentar la expresión. Así pues, estos resultados concuerdan con los ensayos de β-oxidación de ácidos grasos.

Llegados a este inesperado punto, surgieron nuevas ideas para intentar averiguar el mecanismo tal y como se desarrolla seguidamente.

11. EN AUSENCIA DE GLUCOSA, LAS MSC QUE PRESENTAN CPT1C SOBRESOBRE-EXPRESADA PRODUCEN MÁS ATP QUE LAS MSC CONTROL

A partir del resultado anterior, resultó interesante averiguar la cantidad ATP que producían las MSC en situación basal y cuando sobre-expresaban la CPT1C ya que la producción de ATP podría informarnos de la cantidad de energía que generan.

Estos ensayos de medición de ATP mediante luminiscencia se realizaron simultáneamente en presencia y en ausencia de glucosa y así poder comparar entre ellos.

Como ya es habitual, se analizaron MSC control y MSC con CPT1C sobre-expresada. Las células se mantuvieron durante 36h con o sin glucosa y, como siempre, con 1% de suero durante el tratamiento.

Los resultados se resumen en la figura siguiente:

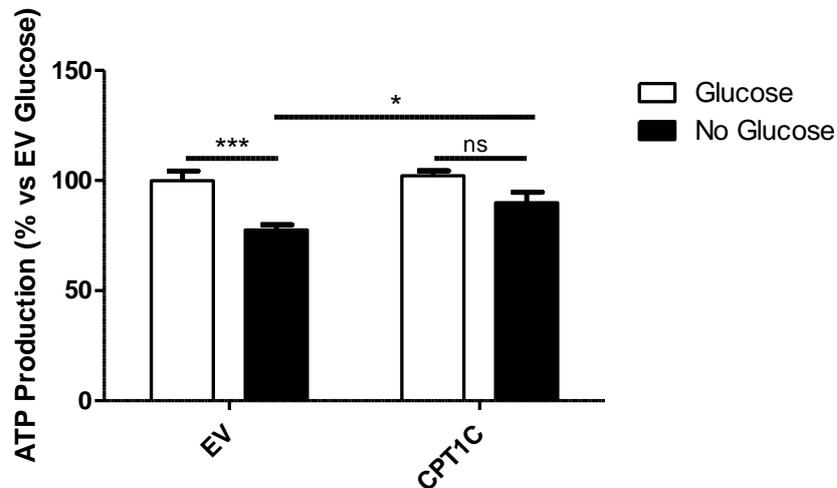


Figura 49. Análisis de la producción de ATP de las MSC control (EV) o con CPT1C sobre-expresada en presencia (barras blancas) o ausencia (barras negras) de glucosa. *: $p < 0.05$, *: $p < 0.005$ $n=3$.**

A partir de este resultado, se pueden extraer varias conclusiones. La primera de ellas y, la más importante, es que en ausencia de glucosa, las MSC con CPT1C sobre-expresada producen un 16% más de ATP que aquellas que tienen niveles basales de la proteína.

La segunda es que este resultado concuerda con el hecho que estas MSC que sobre-expresan CPT1C, en las mismas condiciones, tienen una viabilidad superior y además el porcentaje de ATP que producen de más está en la misma línea que el porcentaje de supervivencia adicional (alrededor de un 15%).

Y la tercera idea a tener en cuenta es que estos datos coinciden con los de Zaugg y colaboradores en cuanto a la producción de ATP (las células tumorales con CPT1C sobre-expresada producen un 20% más de ATP) (35) aunque, como ya se ha detallado anteriormente, en MSC no es debido a una mayor capacidad de las mitocondrias para la oxidación de ácidos grasos.

12. EN AUSENCIA DE GLUCOSA, CPT1C AUMENTA LA SÍNTESIS DE AUTOFAGOSOMAS

De cara a intentar averiguar por qué CPT1C confiere protección a las MSC y sabiendo que no hay glucosa en el medio y que no es mediada por la oxidación de ácidos grasos, surgió la posibilidad de que hubiera variaciones en la autofagia.

Estos experimentos se hicieron en presencia y en ausencia de glucosa comparando las MSC control (EV) con aquellas que presentan la CPT1C sobre-expresada.

En la figura siguiente (figura 50) se muestra el resultado obtenido a través de Western Blot. En ella también se muestra la cuantificación de la conversión de LC3I a LC3II mediante el ratio LC3II / LC3I, que es una forma de cuantificar la cantidad de autofagosomas.

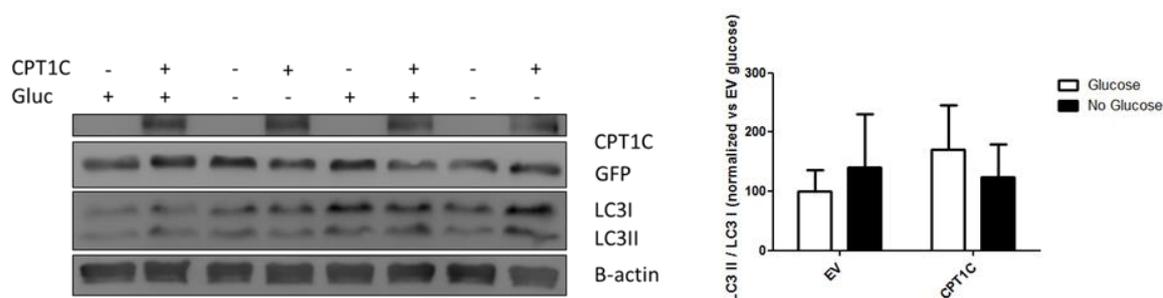


Figura 50. Expresión y cuantificación de LC3II / LC3I en MSC en presencia de o ausencia de glucosa. WB de LC3II, LC3I y CPT1C en MSC control (EV) y en MSC que sobre-expresan CPT1C. β -actina: Control de carga, GFP: Control de infección. Cuantificación del ratio LC3II / LC3I. n=4

Tal y como muestran los datos, no se aprecian variaciones en el ratio LC3II / LC3I. Aunque no se observen variaciones, este experimento no nos informa de si el ciclo autofágico (desde que se produce el fagóforo y capta los orgánulos hasta que éstos son disgregados y expulsados por el autolisosoma) está más aumentado o menos dado que se analiza el ratio LC3II / LC3I en un momento puntual.

Partiendo de este resultado, de cara a analizar si el ciclo transcurre más rápido, igual o más lento en comparación con las MSC con CPT1C basal, se optó por usar un inhibidor lisosomal, la cloroquina. Esto permite cuantificar la formación total de autofagosomas en respuesta a un estímulo (la privación de nutrientes en nuestro caso) ya

que se impide su degradación por parte del lisosoma debido a un aumento del pH. Más precisamente, el pH del lisosoma es ácido y la cloroquina lo aumenta inactivando así las enzimas lisosomales.

Así pues, se trataron todas las células con 100 μ M cloroquina y se realizó el mismo tipo de ensayo. En la figura 51 se muestra el resultado:

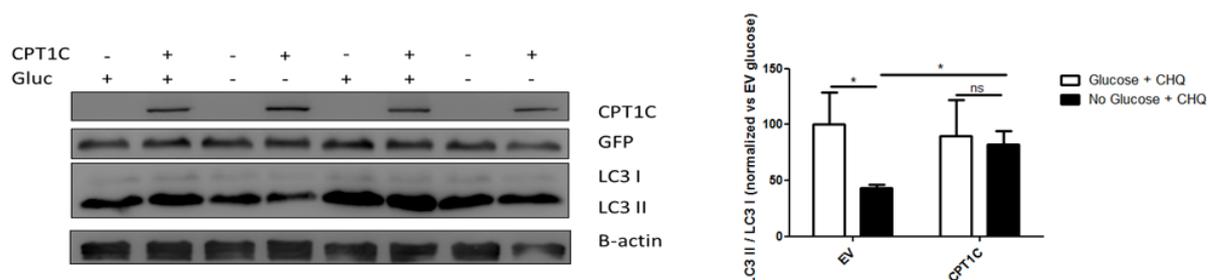


Figura 51. Expresión y cuantificación de LC3II / LC3I en MSC en presencia de o ausencia de glucosa y tratadas con 100 μ M cloroquina. WB de LC3II, LC3I y CPT1C en MSC control (EV) y en MSC que sobre-expresan CPT1C. β -actina: Control de carga, GFP: Control de infección. Cuantificación del ratio LC3II / LC3I. *: $p < 0.05$. $n = 4$

Estos resultados son altamente interesantes porque demuestran que, en presencia de cloroquina y combinado con la ausencia de glucosa, las MSC con CPT1C sobre-expresada presentan un mayor ratio LC3II / LC3I en comparación con las MSC control (EV). Tal y como se ha detallado anteriormente, se analiza la conversión de LC3I a LC3II y en esta imagen queda de manifiesto que la sobre-expresión de CPT1C conlleva un aumento del ratio LC3II / LC3I y, en consecuencia, una mayor síntesis de autofagosomas.

Estos ensayos sugieren que la sobre-expresión de CPT1C comporta un aumento del ciclo autofágico.

13. CPT1C NO PROTEGE LAS MSC CUANDO SE PARALIZA EL CICLO AUTOFÁGICO EN AUSENCIA DE GLUCOSA

Posiblemente, a partir del resultado anterior surja la pregunta siguiente: ¿Tratando con cloroquina las MSC que sobre-expresan CPT1C en ausencia de glucosa, siguen sobreviviendo más que si no se tratan con el inhibidor?

Esta es la pregunta que nos surgió una vez hechos los experimentos de autofagia y decidimos realizar ensayos de viabilidad tras el interés que despertaba esta nueva hipótesis. Tal y como se ha realizado en todo momento, comparamos la supervivencia de las MSC control con las MSC que presentan CPT1C sobre-expresada. En este caso, el experimento se realizó en presencia y en ausencia de glucosa y además, en cada caso, se mantuvieron MSC tratadas con cloroquina y MSC sin tratar.

Antes de detallar el resultado, conviene comentar que los datos sobre si CPT1C confería protección o no en presencia de cloroquina, debían obtenerse tras 72h en ausencia de glucosa, ya que era el tiempo en el cual se había visto previamente un 20% aproximadamente de supervivencia adicional.

El problema que emergió fue que tras 72h en ausencia de glucosa y tratadas con cloroquina apenas quedaban células vivas. Así pues, la estrategia fue realizar 48h sin glucosa seguidas de 24h adicionales sin glucosa y con cloroquina añadida.

La figura 52 muestra los resultados obtenidos.

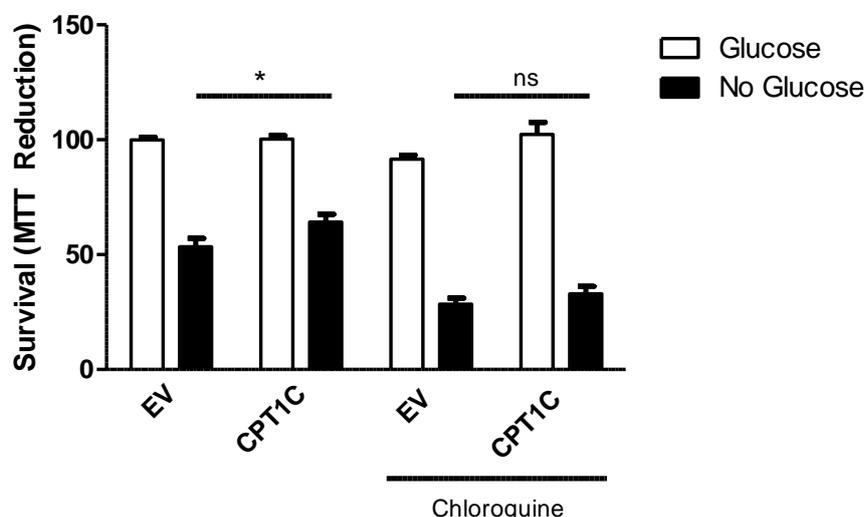


Figura 52. Análisis de la viabilidad celular mediante MTT de las MSC con plásmido vacío (EV) o con plásmido que sobre-expresa la CPT1C en presencia o ausencia de 100 μ M cloroquina y en presencia (barras blancas) o ausencia (barras negras) de glucosa durante 72h. Se ha añadido 100 μ M cloroquina a las 48h. Todas ellas se han mantenido al 1% FBS. *: $p < 0.05$. n=4

Si analizamos con detalle este gráfico, podemos extraer las siguientes conclusiones:

La primera es que, en presencia de glucosa, la cloroquina no ha afectado a la viabilidad celular tal y como debía suceder.

La segunda es que, en ausencia de glucosa, las MSC con CPT1C sobre-expresada sobrevivieron más tal y como se había demostrado anteriormente.

Y la tercera observación y más importante es que en ausencia de glucosa la CPT1C deja de conferir protección cuando se paraliza el ciclo autofágico con cloroquina.

Estos resultados demuestran que CPT1C confiere protección a través de la autofagia y ésta es clave para la supervivencia celular.

14. CPT1C NO INCREMENTA LA PRODUCCIÓN DE ATP CUANDO SE PARALIZA EL CICLO AUTOFÁGICO EN AUSENCIA DE GLUCOSA

Teniendo en cuenta los últimos ensayos de supervivencia comentados, cuando se paralizaba el ciclo autofágico aquellas MSC que sobre-expresaban CPT1C dejaron de sobrevivir más respecto las MSC control. Estos datos nos hicieron suponer que si sobrevivían menos, muy probablemente producirían menor cantidad de ATP.

Para verificar estas hipótesis realizamos ensayos de luminiscencia para analizar la producción de ATP en ambos casos.

En primer lugar, se quiso evaluar cómo afectaba la cloroquina (inhibidor de la degradación de autofagosomas) a la producción de ATP.

Este experimento se llevó a cabo en ausencia de glucosa y al 1% FBS en todos los casos y se analizaron MSC control (EV) y MSC con CPT1C sobre-expresada. De cara a simular las condiciones utilizadas en los ensayos anteriores de ATP en los cuales las células se mantuvieron durante 36h con o sin glucosa, esta vez se realizaron 12h sin glucosa seguidas de 24h sin glucosa con 100 μ M cloroquina añadida.

En la figura siguiente se pueden observar los resultados obtenidos:

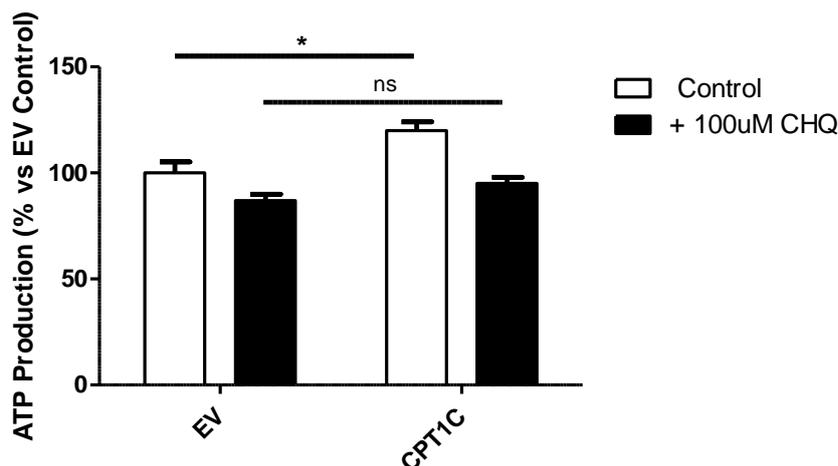


Figura 53. Análisis de la producción de ATP de las MSC control (EV) y de las MSC que sobre-expresan CPT1C en presencia (barras negras) o en ausencia (barras blancas) de cloroquina. El ensayo se llevó a cabo en ausencia total de glucosa *: $p < 0.05$. $n=2$.

Por un lado, tal y como ya era de esperar, en ausencia de glucosa, aquellas que sobre-expresan CPT1C produjeron más ATP. Por otro lado y aquí radica el dato más interesante, cuando las células son tratadas con cloroquina, a pesar de sobre-expresar CPT1C, no se produce este aumento en la producción de ATP, lo cual corrobora la idea que se ha demostrado anteriormente. Más precisamente, parece ser que el ciclo autofágico es necesario para que CPT1C aumente la producción de ATP. Dicho en otras palabras, al estar parado el ciclo autofágico, las MSC que presentan CPT1C sobre-expresada no pueden producir mayor cantidad de ATP y en consecuencia, no son capaces de sobrevivir más en situación de estrés ya que CPT1C no es capaz de ejercer un efecto protector.

15. EN AUSENCIA DE GLUCOSA, CPT1C PROMUEVE LA FORMACIÓN DE CUERPOS LIPÍDICOS

En paralelo a los resultados anteriores sobre el ciclo autofágico, se analizó la formación de cuerpos lipídicos. La razón de dichos ensayos es que previamente en nuestro laboratorio habíamos observado que neuronas hipocampales de cultivos primarios de ratones deficientes de CPT1C, generaban menos cuerpos lipídicos una vez tratadas con ácidos grasos. En la misma dirección, vimos que neuronas hipotalámicas de ratón

procedentes de una línea celular de (GT1-7) con CPT1C silenciada generaban menos cuerpos lipídicos cuando se les suministraba ácidos grasos (tesis Macarena Pozo).

La segunda razón por la que quisimos analizar los cuerpos lipídicos era porque está descrito que en privación de nutrientes se activa la autofagia lo que conlleva un aumento transitorio de la formación de cuerpos lipídicos (175). Quisimos analizar si la ausencia de glucosa (que también forma cuerpos lipídicos pero muchos menos que con el tratamiento con ácidos grasos) producía más o menos cuerpos lipídicos en función de los niveles de CPT1C.

Para ello, se dejaron MSC control y MSC con CPT1C sobre-expresada en presencia y/o ausencia de glucosa durante 6h y se analizó la formación de cuerpos lipídicos. A continuación (figura 54), se muestran las imágenes:

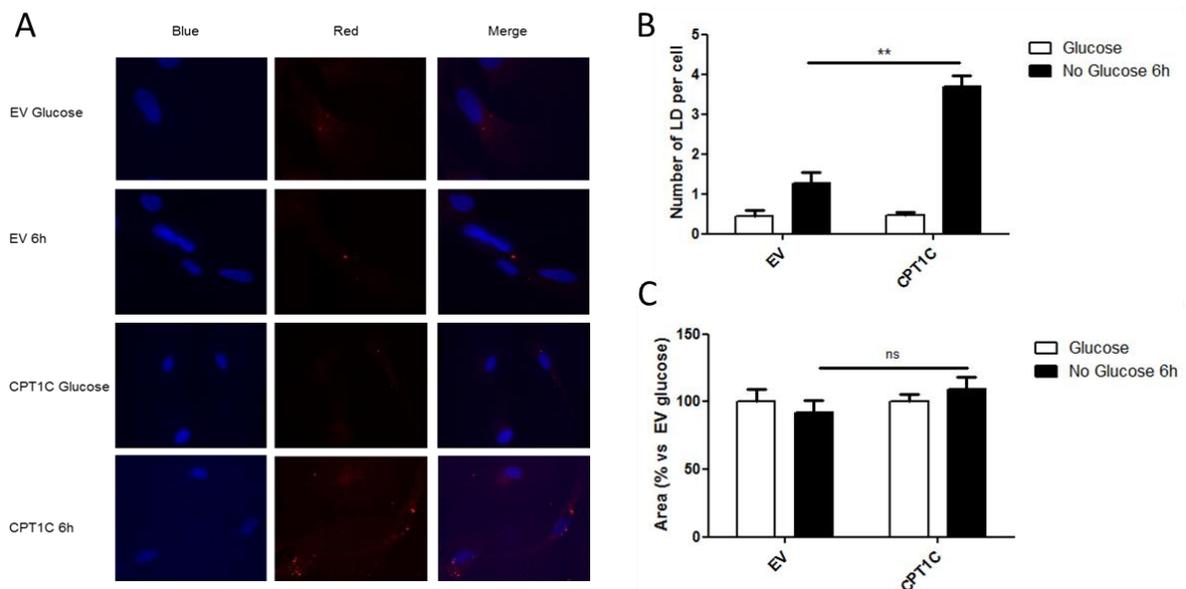


Figura 54. Análisis de la formación de cuerpos lipídicos (LD) en MSC control (EV) y en MSC que sobre-expresan la CPT1C en presencia (barras blancas) o ausencia (barras negras) de glucosa durante 6h. A) Imágenes teñidas con Hoechst (Blue), Nile Red (Red) y su superposición (Merge). B) Número de cuerpos lipídicos por célula en presencia o ausencia de glucosa durante 6h. C) Área de los cuerpos lipídicos en presencia o ausencia de glucosa durante 6h. Todas ellas se han mantenido al 1% FBS. **: $p < 0.01$. $n = 3$

Los resultados muestran, en primer lugar, que las MSC cultivadas en medio con suero al 1% ya presentan pequeños cuerpos lipídicos (LD). En segundo lugar, queda patente que el área de los LD formados tras 6h sin glucosa es la misma en las MSC control (EV) que en aquellas que sobre-expresan la CPT1C. Y la tercera y más importante es que, en ausencia de glucosa, las MSC que sobre-expresan CPT1C producen más LD que

aquellas que tienen CPT1C en estado basal, más concretamente, se trata de un ratio 3:1 aproximadamente.

Este aumento de cuerpos lipídicos en las MSC que sobre-expresan CPT1C, a las 6h sin glucosa, podía ser debido al aumento del ciclo autofágico analizado por WB (ratio LC3II / LC3I) que se ha detallado anteriormente o, bien al contrario, podía ser que un aumento de cuerpos lipídicos estuviera promoviendo la autofagia (176) o simplemente ser procesos independientes. Para averiguarlo se realizó el ensayo que se describe seguidamente.

16. LA AUTOFAGIA ES UN PASO PREVIO A LA FORMACIÓN DE CUERPOS LIPÍDICOS PARA QUE CPT1C CONFIERA PROTECCIÓN A LAS MSC

Dado el gran interés que nos suscitaron estos últimos resultados, nos preguntamos: ¿Las MSC fagocitan sus propios orgánulos para liberar, entre otras moléculas, ácidos grasos generando cuerpos lipídicos que serán posteriormente oxidados (175,177)?

Para resolver el enigma se utilizó un experimento sencillo consistente en tratar las células con cloroquina (inhibidor del lisosoma) y analizar la formación de cuerpos lipídicos tiñéndolos con “Nile Red” tal y como se ha realizado anteriormente.

Se trataron las MSC control y MSC que sobre-expresaban la CPT1C y se mantuvieron durante 6h sin glucosa, o bien durante, 6h sin glucosa y con cloroquina añadida.

El resultado es el siguiente (figura 55):

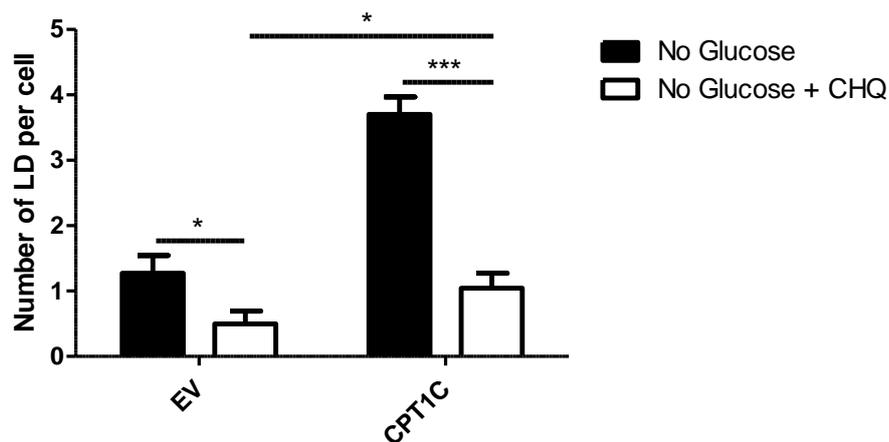


Figura 55. Análisis de la formación de cuerpos lipídicos (LD) en MSC control (EV) y en MSC que sobre-expresan la CPT1C en ausencia de glucosa durante 6h y en presencia (barras blancas) o ausencia (barras negras (fig.54, B)) de cloroquina 100 μ M. Número de cuerpos lipídicos por célula. Todas ellas se han mantenido al 1% FBS. *= $p < 0.05$. *= $p < 0.005$. $n = 3$**

Analizando esta gráfica queda de manifiesto que el tratamiento con cloroquina ha reducido considerablemente la formación de cuerpos lipídicos. Esta reducción se ha producido tanto en las que MSC control (EV) como en las MSC que sobre-expresan CPT1C, siendo además una disminución proporcional en ambos casos.

Este resultado demuestra que el ciclo autofágico es un paso previo a la formación de cuerpos lipídicos sugiriendo que las MSC fagocitan sus propios orgánulos para liberar, entre otras moléculas, ácidos grasos generando cuerpos lipídicos que serán posteriormente oxidados mediante la β -oxidación mitocondrial. Esta misma teoría fue observada recientemente por Gruia y colaboradores en MSC de la médula ósea cuando se diferenciaban a adipocitos (177), en la cual la autofagia también resultaba ser un paso previo a la generación de cuerpos lipídicos.

Hay que tener en cuenta que, incluso en presencia de cloroquina, las células que sobre-expresan CPT1C, tienen un 20% más de cuerpos lipídicos que las MSC control. Ello significa que la mayoría de cuerpos lipídicos formados en las MSC con CPT1C sobre-expresada provienen de la autofagia, aunque una pequeña parte es independiente de este proceso.

Conviene destacar que el área de los LD no variaba entre las que tienen plásmido vacío (EV) y las que tienen CPT1C sobre-expresada.

17. CPT1C NO PROTEGE LAS MSC CUANDO SE INHIBE LA DEGRADACIÓN DE CUERPOS LIPÍDICOS

Anteriormente, se ha demostrado que la autofagia es un proceso clave y esencial para la supervivencia celular. Además, se ha demostrado que la CPT1C promueve la formación de cuerpos lipídicos en situación de ayuno. Dados estos resultados, parecía probable que si se inhibía la degradación de los cuerpos lipídicos, CPT1C no podría conferir supervivencia a las MSC en situación de estrés. Con esta idea en mente, se procuró diseñar un experimento que permitiese verificar si dicha hipótesis era cierta o no.

El experimento consistió en inhibir farmacológicamente la ATGL, que es la enzima encargada de hidrolizar los triglicéridos (TAG) de los cuerpos lipídicos (LD) en diacilglicéridos (DAG), primer paso de la lipólisis. El inhibidor farmacológico utilizado fue DEUP.

Antes de realizar este ensayo con DEUP, para asegurar que la dosis de DEUP era adecuada y que estábamos inhibiendo considerablemente la ATGL, se decidió tratar las células con DEUP y analizar la formación de cuerpos lipídicos tiñéndolos con “Nile Red”. Si se observaba un aumento de LD, significaría que la dosis utilizada sería la adecuada. Se probó con 100 μ M tal y como se hizo en el artículo de Rambold y colaboradores (175).

Se trataron MSC con plásmido vacío y MSC que sobre-expresaban la CPT1C y se mantuvieron durante 6h sin glucosa, o bien durante 6h sin glucosa y con DEUP añadido, simulando las mismas condiciones que en los experimentos ensayados con cloroquina.

Seguidamente (figura 56), se observa que la dosis empleada fue la adecuada.

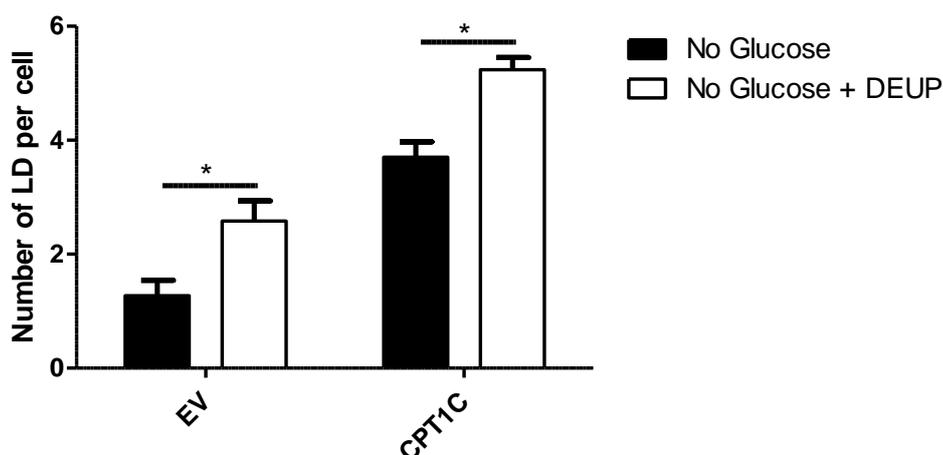


Figura 56. Análisis de la formación de cuerpos lipídicos (LD) en MSC control (EV) y en MSC que sobre-expresan la CPT1C en ausencia de glucosa durante 6h y en presencia (barras blancas) o ausencia (barras negras (fig.54, B)) de DEUP 100 μ M. Número de cuerpos lipídicos por célula. Todas ellas se han mantenido al 1% FBS. *= $p < 0.05$. n=3

Consideramos que la dosis empleada es la adecuada ya que si comparamos las células tratadas con DEUP respecto las no tratadas, queda patente que tanto en las MSC control (EV) como en las MSC que mantienen CPT1C sobre-expresada se han acumulado más LD al ser tratadas con DEUP, sugiriendo que la enzima ATGL ha sido correctamente inhibida y los TAG contenidos en los LD no se han podido hidrolizar. Curiosamente, este acúmulo también es proporcional si comparamos por separado las que tienen plásmido vacío (EV) con las que sobre-expresan CPT1C.

Igual que en el tratamiento con cloroquina, el área de los LD no variaba entre ambos grupos de células.

Llegados a este punto, ya sabemos la dosis de DEUP adecuada para verificar si, como se ha dicho al inicio de este punto, tratando con el inhibidor se produce un acúmulo de LD, éstos no se pueden degradar y, en consecuencia, CPT1C no es capaz de conferir supervivencia a las MSC.

Siguiendo con el mismo método empleado en el experimento de supervivencia con cloroquina, el ensayo de viabilidad celular se realizó manteniendo las MSC durante 48h sin glucosa seguidas de 24h adicionales sin glucosa con DEUP añadido.

El resultado obtenido se muestra en la figura siguiente:

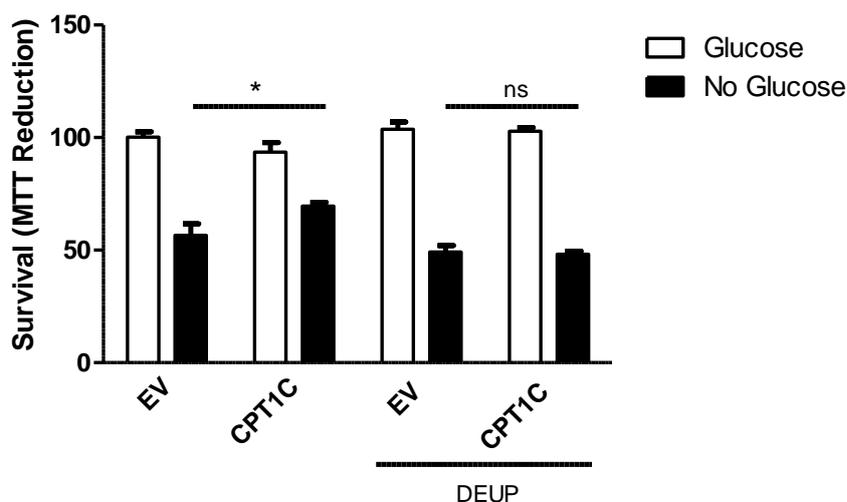


Figura 57. Análisis de la viabilidad celular mediante MTT de las MSC con plásmido vacío (EV) o con plásmido que sobre-expresa la CPT1C en presencia o ausencia de 100 μ M DEUP y en presencia (barras blancas) o ausencia (barras negras) de glucosa durante 72h. Se ha añadido 100 μ M DEUP a las 48h. Todas ellas se han mantenido al 1% FBS. *: $p < 0.05$. $n=4$

A partir de estos ensayos de supervivencia se concluyó en primer lugar que, en presencia de glucosa, el DEUP no altera la viabilidad celular tal y como era de esperar para dar el experimento por válido. En segundo lugar, en ausencia de glucosa, las MSC con CPT1C sobre-expresada sobreviven más tal y como se ha demostrado anteriormente.

Y en tercer lugar y lo más relevante, es que en ausencia de glucosa, la CPT1C deja de conferir protección cuando se inhibe la degradación de los cuerpos lipídicos con DEUP, lo cual pone de manifiesto que la lipólisis, y la posterior liberación de ácidos grasos a partir de los cuerpos lipídicos, es imprescindible para su supervivencia.

18. EN AUSENCIA DE GLUCOSA, CUANDO SE INHIBE LA DEGRADACIÓN DE CUERPOS LIPÍDICOS, LAS MSC QUE PRESENTAN CPT1C SOBRE-EXPRESADA PRODUCEN MENOS ATP

De la misma manera que se analizó la producción de ATP cuando se paralizaba el ciclo autofágico, se procedió a realizar el mismo tipo de experimento pero esta vez inhibiendo la lipólisis. También se realizó en ausencia de glucosa y al 1% FBS.

De la misma forma que se hizo con el ensayo de viabilidad celular (MTT), el inhibidor farmacológico utilizado fue DEUP.

Imitando al experimento anterior de generación de ATP, se utilizaron MSC control y MSC con CPT1C sobre-expresada y el tratamiento fue de 12h sin glucosa seguidas de 24h sin glucosa con 100 μ M DEUP añadido, sumando así las 36h totales. Seguidamente (figura 58), se muestra el resultado:

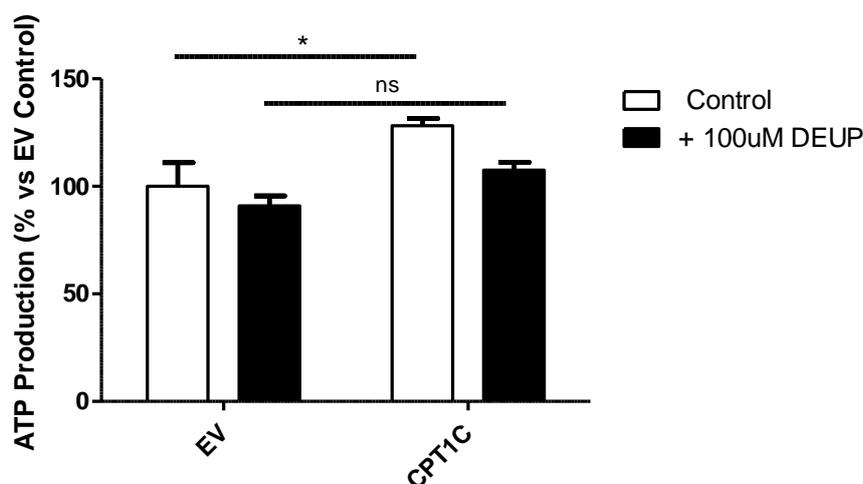


Figura 58. Análisis de la producción de ATP de las MSC control (EV) y de las MSC que sobre-expresan CPT1C en presencia (barras negras) o en ausencia (barras blancas) de DEUP. El ensayo se llevó a cabo en ausencia total de glucosa *: $p < 0.05$. $n=2$.

Nuevamente se puede visualizar que, tal y como se demostró anteriormente (resultado 11), en ausencia de glucosa, las MSC que presentan CPT1C sobre-expresada producen más ATP.

Sí resulta de especial interés que cuando además de quitar la glucosa del medio, se tratan las MSC con DEUP para inhibir la degradación de los cuerpos lipídicos, éstas producen la misma cantidad de ATP independientemente de los niveles que CPT1C que dispongan.

Este resultado sugiere que para que las MSC con CPT1C sobre-expresada puedan sobrevivir más, resulta imprescindible que los ácidos grasos que almacenan en forma de cuerpos lipídicos, sean metabolizados mediante el proceso de lipólisis para ser posteriormente oxidados en la mitocondria y puedan generar ATP. De lo contrario, si se

trunca este proceso en algún punto, las células, por mucho que aumenten los niveles de la proteína CPT1C no son capaces de aumentar su supervivencia en ausencia de glucosa.

CAPÍTULO 6

DISCUSIÓN

¿Son las células madre la cura para cualquier enfermedad? ¿Es real que el potencial de las células madre es ilimitado? ¿Seremos capaces de probar todo tipo de fármacos con células madre para averiguar si son viables o no? A día de hoy, surge una gran cantidad de preguntas acerca de las células madre dados los grandes avances en este campo en el siglo XXI. Si bien es cierto que las células madre han abierto un camino muy amplio para explorar y que tiene grandes perspectivas, no podemos concluir que todo es posible, sino que también presentan adversidades. Asimismo, es un campo con grandes perspectivas pero aún quedan muchos obstáculos que superar.

Las células madre nos ayudan a comprender los procesos de diferenciación celular, cómo se forman los tejidos y cómo se desarrolla un nuevo organismo desde el momento en que un óvulo es fecundado. En consecuencia, identificar los mecanismos que determinan si la célula sigue replicándose o bien opta por diferenciarse a una célula especializada nos ayudará a comprender qué controla su adecuado desarrollo.

Algunas enfermedades graves, como el cáncer o los defectos congénitos, se deben a una diferenciación y una división anómala de las células. Conocer las causas genéticas y moleculares de estos procesos puede aportar información sobre cómo surgen estas enfermedades y qué estrategias diseñar para realizar el tratamiento más idóneo. Así pues, ésta es una de las aportaciones más importantes de las células madre: la obtención de nueva información acerca de estas causas.

Actualmente gracias a que las células madre son aplicables en medicina regenerativa, ya es posible utilizarlas para tratar quemaduras considerables o para restaurar el sistema sanguíneo en personas que padecen leucemia, entre otros usos. Además, también son útiles para reemplazar células que se pierden en determinados tejidos en algunas enfermedades que no siempre tienen tratamiento. A día de hoy, es frecuente utilizar órganos donados a la ciencia para reemplazar órganos dañados pero es tal la necesidad de dichos órganos que no hay suficiente suministro. Si pudiéramos dirigir las células madre para que se diferenciaron al tipo celular deseado, esto supondría una fuente de células renovables casi ilimitada y se podrían tratar enfermedades cardíacas, ictus, diabetes o Parkinson, entre otras. Este hecho resulta fascinante pero todavía hay muchos obstáculos técnicos que requieren esfuerzo y muchos años de investigación necesaria para que esta idea utópica sea una realidad.

Otra de las grandes aplicaciones de las células madre es el estudio de enfermedades. A menudo, es complejo aislar aquellas células del organismo dañadas durante una enfermedad para ser estudiadas. En cambio, con el uso de células madre, ya lleven el gen de la enfermedad o sean manipuladas en el laboratorio para que lo contengan, se consigue una alternativa viable. Esto permitiría estudiar en cada enfermedad qué ha dejado de funcionar y cómo enfocar una posible solución.

Y por otra parte, las células madre permiten reducir la experimentación animal dado que se pueden generar células especializadas a partir de células madre para el posterior estudio de fármacos.

Todas estas aplicaciones en el terreno de la medicina regenerativa hacen que el descubrimiento de una nueva proteína en células madre adultas, la CPT1C, pueda despertar curiosidad entre la comunidad científica.

Con todo lo descrito hasta la fecha, queda de manifiesto que CPT1C posee una función muy distinta a las otras dos isoformas conocidas, CPT1A y CPT1B. Básicamente, hay dos motivos que apoyan este hecho: el primero es que CPT1C se localiza en la membrana del retículo endoplasmático y no en la membrana mitocondrial externa tal y como sí sucede con las otras dos isoformas. El segundo es que a pesar de que la secuencia de CPT1C es muy similar respecto las otras dos y hay un elevado porcentaje de afinidad y potencialmente podría catalizar la misma reacción con una cinética parecida, los resultados publicados por nuestro grupo (33), y los datos ahora presentes en esta tesis, demuestran que CPT1C no participa en la oxidación de palmitato, al menos en células PC12 ni en HEK 293T ni en MSC.

Dado que, a diferencia de las isoformas A y B, no está involucrada en la obtención de energía a partir de la oxidación de ácidos grasos, todo indica que debe tener un rol más relacionado con funciones específicas del retículo endoplasmático.

Además, los escasos estudios realizados en células madre para las isoformas A y B son poco profundos, dado que no se sabe con precisión si podrían tener un rol relevante. Esto conlleva que este trabajo sea muy novedoso ya que no solo demuestra con claridad la expresión de CPT1C en células madre sino que muestra una posible función altamente interesante, como es que la supervivencia de las células madre, en ausencia de glucosa,

está mediada por CPT1C y lo realiza a través de la autofagia. Asimismo, es la primera vez que CPT1C se relaciona con la formación de autofagosomas.

A nivel metabólico, en 2015, dos publicaciones similares (178,179), una de las cuales perteneciente a nuestro grupo, revelaron que CPT1C participaba en el tráfico intracelular de los receptores del neurotransmisor glutamato (GluA1). La modulación del tráfico de membrana de estos receptores es fundamental para la correcta actividad sináptica y plasticidad neuronal, lo cual sugiere que CPT1C podría tener un papel destacado en aprendizaje (46). A nivel fisiológico, CPT1C participa en otros procesos tales como el control de la homeostasis energética (32,37) o la función motora.

A pesar de que la función de CPT1C no es totalmente conocida, ya es sabido que está ligada a la disponibilidad de nutrientes y al estrés metabólico (38,180). Curiosamente, en las células tumorales, les confiere resistencia en situación de hipoglucemia y de hipoxia.

Adicionalmente, el descubrimiento de CPT1C en células madre adultas que se muestra en este trabajo resulta realmente atractivo, pues comprender el mecanismo a través del cual ejerce su acción en estas células, puede aportar información sobre cómo interviene en células tumorales (35).

Así pues, discutiré los resultados de este estudio secuencialmente: en primer lugar discutiré la expresión de CPT1C en células madre, a continuación, explicaré en qué situaciones de estrés metabólico CPT1C confiere protección a las células madre mesenquimales, donde se destacará la ausencia de glucosa. Y para finalizar, trataré como CPT1C promueve la supervivencia celular y qué similitud podría tener con el tejido prioritario en el cual se expresa: el cerebro.

1. UN NUEVO TIPO CELULAR PARA CPT1C: LAS CÉLULAS MADRE

Hasta la fecha, los expertos en CPT1 siempre han considerado a la isoforma C como la isoforma cerebral. Razón no les falta, pues desde que Price y colaboradores la descubrieron en 2002 (12), ha sido ampliamente descrita en neuronas y está especialmente enriquecida en el hipotálamo e hipocampo. Nuestro grupo también corroboró en 2008 que se expresaba en neuronas y que no estaba presente en astrocitos, incluso demostró que se

localizaba en el retículo endoplasmático (33) pero en todo momento se mantuvo la idea que era claramente cerebral. Resulta llamativo que CPT1C se encuentre, únicamente, en las neuronas de organismos mamíferos ya que esto sugiere que debe desarrollar alguna función superior en el cerebro como podría ser el aprendizaje y la memoria.

A diferencia las isoformas A y B, a las que se les atribuye una gran variedad de órganos, especialmente a la A, en el caso de la C únicamente se ha demostrado en cerebro y ligeramente en testículos, en sus inicios (12).

Esta percepción se ha mantenido siempre y no fue hasta 9 años más tarde, en 2011, cuando se le atribuyó un nuevo tejido: el tejido tumoral. Esta aportación de Zaugg y Reilly, unida al hecho que no solo mostraban resultados murinos sino tumores humanos, generó gran expectación. Ya no solo era una proteína cerebral (sin menospreciar todo lo publicado hasta la fecha en este órgano) sino que también se expresaba en células tumorales.

En 2012-2013 (cuando se inició este trabajo) surgió la hipótesis que CPT1C podría estar en células madre dado que poseen un fenotipo similar a las tumorales y nuestros resultados así lo demuestran.

Resulta complicado responder a la clásica pregunta que siempre ha estado en el aire: ¿Hasta qué punto expresan CPT1C las células madre si lo comparamos con un cerebro humano? Se han hecho muchas pruebas para responder esta cuestión y aunque parezca sencilla, no hay nada más lejos de la realidad. En primer lugar, porque una célula madre dispone de muchos estadios antes de entrar en un proceso de senescencia o bien de diferenciación. Si bien nuestros resultados demuestran que claramente se expresa en células madre adultas mesenquimales (y por lo tanto, multipotentes) también vimos que se expresa en pluripotentes.

En segundo lugar, la comparativa resulta complicada porque el análisis en cerebro, como es evidente, siempre será post-mortem. Desde el momento en el que fallece la persona hasta que el cerebro es extraído transcurre una serie de horas considerable a pesar que se intentan mantener íntegras las estructuras, esto conlleva que por muy minucioso que sea el ensayo posterior, éste nunca será totalmente exacto. En modelos animales el proceso es mucho más rápido, en cuestión de minutos, el animal es sacrificado, el cerebro es extraído y ya se puede realizar el experimento deseado.

Y el tercer motivo que dificulta la respuesta es que CPT1C se encuentra en neuronas y éstas solo representan un 10% del cerebro. De nuevo, surge un problema similar al anterior ya que no se puede (evidentemente no es ético) tener un cultivo primario de neuronas humanas mientras que esto sería realmente sencillo en cultivos de neuronas murinas. Sí que se podría utilizar una línea celular de neuronas humanas pero para su manejo y manipulación, éstas deben haber sido inmortalizadas. Este hecho hace que las neuronas en cultivo se dividan, algo totalmente alejado de la realidad porque las neuronas no se dividen sino que en todo caso se generan neuronas a partir de células madre que se hayan diferenciado, proceso conocido como neurogénesis.

Teniendo en cuentas todas estas consideraciones importantes, nuestros resultados sugieren que la expresión de CPT1C en células madre mesenquimales es similar a la expresión de CPT1C en las neuronas del tejido cerebral adulto.

Para finalizar, quisiera remarcar que es la primera vez que se muestra la expresión de CPT1C en células madre adultas.

2. CPT1C CONFIERE PROTECCIÓN A LAS CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES

Los experimentos realizados a lo largo de este manuscrito ponen de manifiesto que en determinadas situaciones de estrés metabólico, la CPT1C confiere protección a las MSC y, en consecuencia, promueve la supervivencia de éstas.

Estos ensayos de protección surgen a partir de los datos obtenidos en células cancerígenas por Zaugg y colaboradores en 2011 (35), sin embargo, nosotros quisimos profundizar más en el tema. Dada la expresión de CPT1C en MSC, resultaban prioritarios estos ensayos ya que permitirían saber si el efecto era el mismo (o no) en ambos tipos celulares.

Tal y como se ha demostrado anteriormente, en ausencia de glucosa, se produce el ya conocido efecto protector por parte de CPT1C.

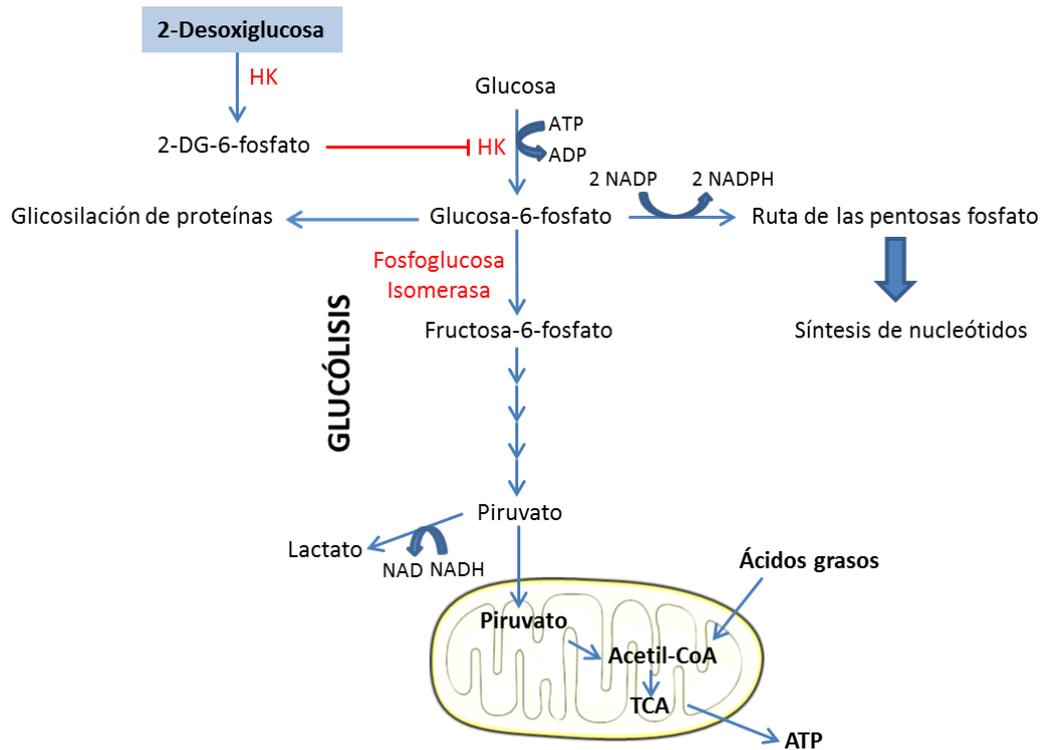


Figura 59. Vías metabólicas implicadas en el metabolismo de la glucosa

Tanto en ausencia de glucosa como en presencia de 2-DG, se inhiben principalmente tres grandes rutas: la glucólisis, que permite generar energía en forma de ATP, la ruta de las pentosas fosfato, que permite generar poder reductor y sintetizar nucleótidos y la glicosilación de proteínas (figura 59).

No solo observamos que CPT1C protegía cuando la glucólisis quedaba inhibida mediante la sustracción de glucosa, sino que a través del tratamiento con 2-DG (figura 59) (181) también se producía una mayor supervivencia en aquellas MSC que sobre-expresaban CPT1C. A pesar que pueda parecer evidente que si en ausencia de glucosa hay una mayor supervivencia, cuando se tratan con 2-DG, también debería haberla, no tiene por qué. En realidad, con el paso del tiempo, han ido surgiendo mayor número de publicaciones que demuestran que, el efecto de sustraer la glucosa del medio de las células o, de tratarlas con 2-DG, son totalmente distintos (173). Prueba de ello es que en nuestros experimentos, únicamente cuando se quita la glucosa aumenta la expresión de CPT1C endógena, un hecho que no sucede cuando se tratan con 2-DG.

Es interesante remarcar que la protección que confiere CPT1C no se produce únicamente en células madre procedentes de la pulpa dental sino que también se produce en las que proceden de la médula ósea.

Tal y como muestra la figura 59, es sabido que el metabolito derivado de la 2-DG, la 2-desoxiglucosa-6-fosfato (2-DG-6-P), inhibe la hexoquinasa, la cual no permite que se metabolice la glucosa a través de la glucólisis. Además, la 2-DG-6-P se acumula en exceso en la célula ya que no puede ser metabolizada por la fosfoglucoisomerasa, que es la enzima encargada de convertir la glucosa-6-fosfato en fructosa-6-fosfato. En consecuencia, resulta imposible la obtención de ATP a través de la glucólisis.

Nuestros resultados demuestran que CPT1C confiere supervivencia celular en situaciones donde la glucólisis no es funcional y decrecen los niveles de ATP.

Podríamos pensar que tanto la ausencia de glucosa como el tratamiento con 2-desoxi-d-glucosa inducen estrés reticular de manera que CPT1C podría intervenir en alguna de estas rutas. Es conocido que cuando no hay glucosa o cuando hay 2-DG en el medio, se ve disminuida la glicosilación de proteínas y aumenta el estrés del RE (181). Aun así, cuando tratamos directamente con moléculas de estrés reticular como la taspigargina o el palmitato sódico, CPT1C deja de conferir protección a las MSC, lo cual sugiere que CPT1C, a pesar de ser una proteína localizada en el RE, no induce protección a través de esta vía.

Por otro lado, también cabría la posibilidad de creer que, en ausencia de glucosa, como no se puede obtener glucosa-6-fosfato, no es posible activar la ruta de las pentosas fosfato, lo cual estaría alterando el equilibrio NADP/NADPH (figura 59). Por lo que se refiere a la 2-DG, hay varias teorías acerca de su intervención en esta ruta. Hay quien considera que bloquea la ruta de las pentosas fosfato; quien, al contrario, considera que es metabolizada a lo largo de esta vía y quien cree que la 2-DG actúa como sustrato principal de la glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa, que es la enzima que, en condiciones normales metaboliza la glucosa-6-fosfato y, en consecuencia, es la que regula la vía de las pentosas fosfato. Considerando que en células tumorales se ha descrito que bloquea la ruta de las pentosas fosfato, podríamos suponer que en una célula madre, dada su similitud con una célula tumoral, la 2-DG, también la bloquearía. Así pues, tendría sentido que CPT1C pudiera proteger actuando en la ruta de las pentosas fosfato. Sin embargo, nosotros hemos

observado que cuando se altera el balance NADP/NADPH con H_2O_2 , CPT1C no protege, sugiriendo que CPT1C tampoco interviene en la ruta de las pentosas fosfato.

Por lo que se refiere a la hipoxia, no somos capaces de dar un veredicto concluyente sobre si CPT1C confiere protección (o no) cuando disminuyen los niveles de oxígeno ya que no conseguimos inducir muerte celular en las condiciones ensayadas. No debe sorprender que tras 24h no hayan muerto más del 5% de las MSC, pues ya son numerosas las publicaciones que demuestran que la hipoxia no solo no resulta problemática para su viabilidad sino que incluso, en ocasiones, es beneficiosa. (13,14).

En referencia a la protección ejercida por CPT1C en ausencia simultánea de oxígeno y glucosa (OGD) y teniendo en cuenta que la hipoxia no induce la muerte de estas células, nuestros resultados sugieren que esta supervivencia adicional es debida a la ausencia de glucosa y no de oxígeno, tal y como sucede cuando únicamente se quita la glucosa del medio.

Todos estos ensayos sugieren que de alguna forma debe verse alterado el metabolismo de la glucosa para que CPT1C se encuentre en la necesidad de actuar. Estos datos podrían tener relación con el hecho que en ausencia de glucosa, los niveles de malonil-CoA están disminuidos, lo cual permitiría un aumento de la función de CPT1 libre de malonil-CoA, aunque ésta, a día de hoy, no es bien conocida.

Si detallamos más este proceso, en ausencia de glucosa, se activa la fosforilación de AMPK lo cual conlleva la activación de la fosforilación de ACC y esto permite que aumenten los niveles de acetyl-CoA, disminuyendo pues los niveles intracelulares de malonil-CoA.

Tendría sentido entonces que siendo malonil-CoA el inhibidor fisiológico de la enzima CPT1, al no haber glucosa, bajan los niveles de malonil-CoA de manera que CPT1C puede ejercer su función, que en este caso sería promover la supervivencia de las células madre mesenquimales.

Acerca del aumento de la expresión de CPT1C endógena en ausencia de glucosa pero no cuando se tratan las MSC con 2-DG, podría ser causado a través de la ruta recién descrita, es decir, aumentaría su expresión cuando no hay glucosa ya que se activa la cascada de señalización pAMPK-pACC. En cambio, está descrito que la 2-DG no induce

la fosforilación de AMPK, posiblemente esta sea la razón por la cual no aumenta la expresión de CPT1C (181).

Así pues, podemos concluir que CPT1C confiere protección cuando hay un déficit energético básico, como es la parada de la glucólisis, mientras que no confiere protección cuando se producen otros tipos de estrés, como podría ser el oxidativo o el reticular.

3. ¿MEDIANTE QUÉ MECANISMO PROMUEVE CPT1C LA SUPERVIVENCIA CELULAR EN AUSENCIA DE GLUCOSA?

Esta cuestión ha centrado gran parte de este trabajo ya que nuestra hipótesis inicial resultó ser falsa.

Nuestros resultados muestran que CPT1C no promueve supervivencia celular a través de la oxidación de ácidos grasos. ¿Es éste un dato sorprendente? Por un lado, no lo es dado que está ampliamente descrito que, hasta la fecha ningún grupo, a excepción de Zaugg y colaboradores (35), ha demostrado que CPT1C tenga una acción catalítica, es decir, que CPT1C sea capaz de preparar los ácidos grasos de cadena larga para entrar en la mitocondria y producirse la β -oxidación. Más precisamente, nadie ha demostrado que CPT1C tenga capacidad suficiente como para catalizar el paso de aciles-CoA a aciles-carnitina, que es la función principal de CPT1A y CPT1B. Si queremos ser puristas, nuestro grupo observó en 2008 que, en condiciones óptimas, la CPT1C sí tenía actividad catalítica pero ésta era unas 200 veces inferior a la de CPT1A.

Por otro lado sí sorprende dado que Zaugg y colaboradores demostraron que las células tumorales sobrevivían más gracias a una mayor oxidación de las grasas. Es remarcable que aunque afirman este hecho no demuestran que CPT1C esté localizada en las mitocondrias ni analizan si se encuentra alterada la actividad de CPT1.

En nuestro caso, una vez se hicieron los experimentos pertinentes, se observó que la capacidad oxidativa de ácidos grasos por parte de las MSC era la misma independientemente de los niveles presentes de CPT1C, lo cual demuestra que en MSC, CPT1C no tiene actividad catalítica y que no está involucrada con el proceso de β -oxidación.

El principal sustrato energético de las MSC es la glucosa, no los ácidos grasos. En 2015, un artículo que dejó muy claro este concepto fue el de Fillmore y colaboradores (183) donde revelaron, nada más y nada menos, que el 97.5% del ATP que producen las MSC procede de la glucólisis. Un número muy elevado al que además hay que sumarle un 2.2% que procede de la oxidación del piruvato a CO₂. Así pues, demostraron que en presencia de glucosa solo un 0.2 % del ATP obtenido, procede de la oxidación de ácidos grasos.

Sin querer profundizar en la ruta metabólica de la glucosa, no debe sorprender que el 97.5% sea de la glucólisis y el 2.2% de la oxidación de piruvato a CO₂ porque las células madre que tienen HIF1 α (del inglés **H**ypoxia **I**nducible **F**actor 1 α) aumentado, prácticamente no transportan el acetil-CoA a la mitocondria para entrar en el ciclo de Krebs sino que lo oxidan a lactato (184). Y precisamente, las células madre mesenquimales humanas son uno de esos tipos de células madre que tienen HIF1 α aumentado (147).

Según nuestros resultados y coincidiendo con la bibliografía mencionada, la oxidación de ácidos grasos por parte de las MSC es muy baja pero conviene comentar que, en ausencia de glucosa, aumenta unas 50 veces, tanto en las células que tienen niveles basales de CPT1C como en las que la sobre-expresan, lo que significa que, en situaciones de emergencia energética, la oxidación de ácidos grasos se activa.

Siguiendo con la capacidad oxidativa, nuestros resultados demuestran que, a diferencia de lo que propone Zaugg y colaboradores, las mitocondrias tienen la misma capacidad oxidativa de ácidos grasos independientemente de los niveles de CPT1C.

Ya para finalizar el análisis de los ensayos de oxidación de ácidos grasos, destacar que el CO₂ mostrado es el generado a partir del palmitato radioactivo y, por consiguiente, este ensayo no nos informa de la cantidad real de ácidos grasos oxidados procedentes de la degradación de los cuerpos lipídicos. Con lo cual este ensayo nos demuestra que CPT1C no aumenta la capacidad oxidativa de ácidos grasos de la mitocondria y sugiere que CPT1C no se moviliza a la mitocondria para oxidar más ácidos grasos sino que permanece en el RE y es CPT1A quien realiza dicha acción. Nuestra interpretación de los resultados es que CPT1C favorece la disponibilidad de ácidos grasos para su oxidación en la mitocondria gracias a la activación de la autofagia, pero no promueve una mayor capacidad oxidativa, tal y como sugirió Zaugg.

Siguiendo con la discusión, quisiera comentar a continuación los niveles de producción de ATP en ausencia de glucosa.

Los resultados reflejados en este manuscrito muestran claramente que mientras en las MSC con niveles basales de CPT1C disminuye significativamente la producción de ATP cuando son privadas de glucosa, las MSC con CPT1C sobre-expresada no padecen esta disminución tan drástica, en realidad, apenas bajan los niveles de ATP generados. Este hecho potencia el resultado obtenido durante los ensayos de viabilidad celular sugiriendo así que este 15% adicional en la generación de ATP es proporcional al 15-20% extra de supervivencia celular.

Las aportaciones expuestas en este trabajo ofrecen una visión más completa del papel de CPT1C y de su mecanismo para inducir protección celular.

Nuestros datos demuestran que aquellas MSC que presentan CPT1C sobre-expresada, en ausencia de glucosa y cuando se paraliza el ciclo autofágico, se produce una mayor acumulación de autofagosomas, lo cual indica que la autofagia es imprescindible para una mayor supervivencia celular mediada por CPT1C.

En este trabajo, se relaciona por primera vez la proteína CPT1C con autofagia. Este hecho es de gran importancia ya que gracias a que CPT1C aumenta la síntesis de autofagosomas, las MSC, en último término, son capaces de generar una mayor cantidad de ATP y, en consecuencia, de sobrevivir más. Asimismo, sería interesante verificar el mecanismo por el cual CPT1C aumenta la síntesis de autofagosomas.

Por lo que a formación de cuerpos lipídicos se refiere, nuestros resultados demuestran que CPT1C promueve la formación de éstos en ausencia de glucosa. Además, cuando se inhibe su degradación de manera farmacológica con el inhibidor DEUP se observa que se pierde la conocida protección que confiere CPT1C lo cual nos hace razonar que, junto con la autofagia, la síntesis de cuerpos lipídicos es un proceso clave.

Si resumimos las aportaciones realizadas en este trabajo en referencia al mecanismo de protección que induce la sobre-expresión de CPT1C, obtenemos el esquema de la figura 60. En ausencia de glucosa y con suero al 1%, cuando las MSC presentan niveles basales de CPT1C (figura 60, A), se generan una serie de cuerpos lipídicos. Mediante la lipólisis, se obtienen, entre otras moléculas, ácidos grasos, lo cuales con la ayuda de CPT1A, entran en la mitocondria para ser oxidados y se genere energía en forma de ATP.

En cambio, cuando CPT1C está sobre-expresada (figura 60, B), se produce un aumento considerable en la formación de autofagosomas. Este aumento, conlleva que se generen una gran cantidad de cuerpos lipídicos (LD), los cuales junto con el aumento de LD que se producen debido a la sobre-expresión de CPT1C, proporcionan una gran cantidad de ácidos grasos, los cuales a través de su oxidación mitocondrial generan mayor cantidad de ATP.

No se trata, en ningún caso, de una mayor actividad de CPT1A. Simplemente, al tener una mayor cantidad de sustrato cuando CPT1C está sobre-expresada, las mitocondrias están más tiempo oxidando ácidos grasos y esta es la razón por la cual se genera más ATP y, en consecuencia, una mayor supervivencia celular.

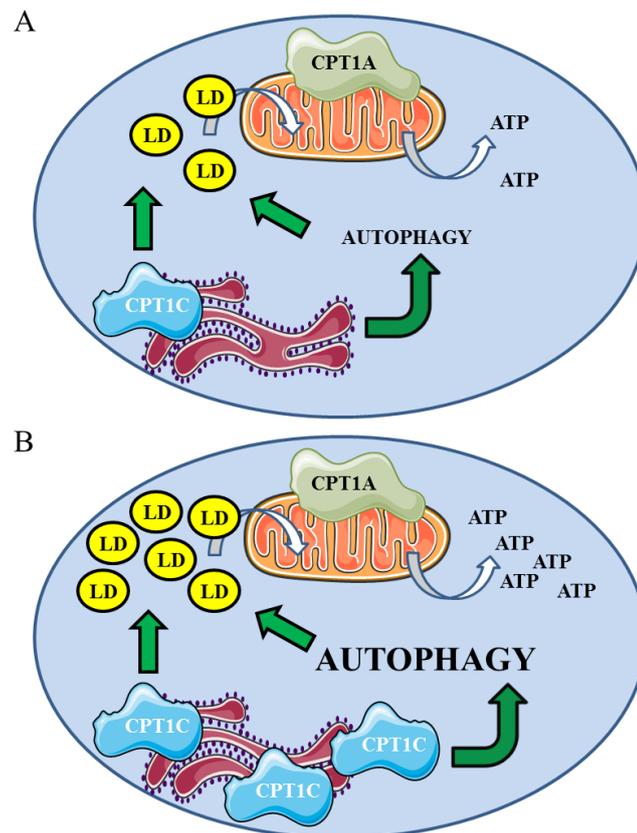


Figura 60. Mecanismo de obtención de energía en forma de ATP en ausencia de glucosa y con suero al 1% en A) MSC con niveles basales de CPT1C y en B) MSC con CPT1C sobre-expresada. LD: Lipid Droplets

4. PERSPECTIVAS FUTURAS

Ya para finalizar, expongo a continuación cuatro posibles formas en las cuales se podría continuar este proyecto a partir de estos resultados.

La primera sería averiguar el mecanismo a través del cual CPT1C aumenta la autofagia. A lo largo de este trabajo se ha expuesto que la sobre-expresión de CPT1C conlleva un aumento del ciclo autofágico, el cual, en último término, implica un aumento de la supervivencia celular. Así pues, sería realmente interesante identificar el mecanismo.

A partir de los resultados que hemos obtenido recientemente de un estudio del interactoma de CPT1C, utilizando como muestra cerebros de ratones WT y de ratones deficientes de CPT1C, hay una proteína que suscita interés de cara a su posible relación con la autofagia: Sac1. Sac1 es una fosfatasa integral de membrana encargada, entre otras funciones, de degradar los fosfatidilinositoles (PIP) (185). Uno de estos PIP es el fosfatidilinositol-3-fosfato (PI3P), un fosfolípido que ha sido ampliamente relacionado con autofagia, incluso algunos autores afirman que el inicio de la autofagia es directamente proporcional a la síntesis de PI3P (186). Dado que Sac1, en el estudio de proteómica, únicamente apareció en las muestras cerebrales procedentes de ratones WT y no en las muestras procedentes de ratones deficientes de CPT1C, podría ser esta proteína un posible interactor de CPT1C.

Una segunda vía sería centrarse más en el papel ya conocido de CPT1C en situación de estrés metabólico en células tumorales. Aunque los resultados publicados hasta la fecha en células tumorales, demuestran que CPT1C promueve supervivencia debido a una mayor capacidad oxidativa, y sugieren que CPT1C se moviliza hacia la mitocondria para favorecer dicha oxidación de ácidos grasos (35), creo que sería altamente interesante evaluar si está aumentada la autofagia, si se sintetiza un mayor número de cuerpos lipídicos, cómo varían los niveles de ATP, etc. Esto se podría afrontar utilizando las líneas tumorales ya empleadas para el estudio de CPT1C, como MCF-7, HCT116 o PC3 (35) o bien empleando una línea celular que simultáneamente sea tumoral y de cerebro humano, ya que es el tejido mayoritario en el que se expresa CPT1C, como podrían ser las células SH-SY5Y.

La tercera forma sería diferenciar estas células madre mesenquimales a células de su linaje, es decir, a osteocitos (hueso), a adipocitos (grasa) y a condrocitos (cartílago) y evaluar si se mantiene la expresión de CPT1C en todos (o en algún) tipo de tejido, si confiere protección celular y mediante qué ruta metabólica. Partiendo de la base que estas células madre procedentes de la pulpa dental ya han sido diferenciadas en otros laboratorios, sería una opción viable que permitiría profundizar más acerca del rol de CPT1C en células madre mesenquimales.

Y finalmente como cuarta vía, aunque pueda parecer utópica por su dificultad y su coste, considero que sería altamente interesante un estudio *in vivo* en ratones. Aquí se abre un amplio abanico de opciones como podría ser estudiar el papel de CPT1C en la regeneración de tejidos, así como la supervivencia de las células madre manteniendo a los animales en ayuno (simularía la ausencia de glucosa) o averiguar si las células madre juegan algún papel en los fenómenos de aprendizaje y memoria, en la función motora, en el control de la ingesta alimentaria o en funciones fisiológicas relacionadas con el rol de CPT1C en cerebro.

En cualquier caso, bajo mi punto de vista, considero que este trabajo amplía un campo de CPT1C poco explorado como es la protección que confiere en células humanas. Se trata de un paso más acerca de la comprensión de las distintas funciones de CPT1C.

CAPÍTULO 7

CONCLUSIONES

1. CPT1C se expresa en células madre mesenquimales humanas procedentes de la pulpa dental.
2. La proteína CPT1C humana presenta un tamaño aparente de 75 KDa en la técnica de Western Blot.
3. CPT1C mejora la supervivencia de las MSC en aquellas situaciones de estrés metabólico en que se ve alterado el metabolismo de la glucosa.
4. CPT1C no mejora la supervivencia cuando las MSC son tratadas con H₂O₂ ni con factores de estrés del retículo endoplasmático.
5. La ausencia de CPT1C disminuye la supervivencia de las MSC cuando se ve alterado el metabolismo de la glucosa.
6. En ausencia de glucosa, incrementa la expresión de CPT1C endógena en MSC.
7. CPT1C no confiere una mayor capacidad oxidativa de ácidos grasos por parte de la mitocondria a las MSC.
8. En ausencia de glucosa, la sobre-expresión de CPT1C en MSC conlleva un aumento en la producción de ATP en comparación con las MSC control.
9. En ausencia de glucosa, CPT1C aumenta la síntesis de autofagosomas y la síntesis de cuerpos lipídicos.
10. En ausencia de glucosa, cuando se paraliza el ciclo autofágico o bien se inhibe la lipólisis de los triacilglicéridos, CPT1C no es capaz de aumentar la producción de ATP ni de conferir protección a las MSC.
11. La mayor parte de cuerpos lipídicos que se forman en las MSC, en ausencia de glucosa, provienen de la autofagia.

CAPÍTULO 8
BIBLIOGRAFÍA

1. McGarry JD, Woeltje KF, Kuwajima M, Foster DW. Regulation of ketogenesis and the renaissance of carnitine palmitoyltransferase. *Diabetes Metab Rev* [Internet]. 1989 May [cited 2016 Jan 5];5(3):271–84. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2656156>
2. Bieber LL. Carnitine. *Annu Rev Biochem* [Internet]. 1988 Jan [cited 2016 Jan 7];57:261–83. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3052273>
3. Ferdinandusse S, Mulders J, IJlst L, Denis S, Dacremont G, Waterham HR, et al. Molecular cloning and expression of human carnitine octanoyltransferase: evidence for its role in the peroxisomal beta-oxidation of branched-chain fatty acids. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. 1999 Sep 16 [cited 2016 Jan 7];263(1):213–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10486279>
4. Casals N, Zammit V, Herrero L, Fadó R, Rodríguez-Rodríguez R, Serra D. Carnitine palmitoyltransferase 1C: From cognition to cancer. *Prog Lipid Res* [Internet]. 2015 Dec 18 [cited 2016 Jan 4]; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26708865>
5. McGarry JD, Foster DW. Regulation of hepatic fatty acid oxidation and ketone body production. *Annu Rev Biochem* [Internet]. 1980 Jan [cited 2016 Jan 7];49:395–420. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6157353>
6. Esser V, Britton CH, Weis BC, Foster DW, McGarry JD. Cloning, sequencing, and expression of a cDNA encoding rat liver carnitine palmitoyltransferase I. Direct evidence that a single polypeptide is involved in inhibitor interaction and catalytic function. *J Biol Chem* [Internet]. 1993 Mar 15 [cited 2016 Jan 7];268(8):5817–22. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8449948>
7. Britton CH, Schultz RA, Zhang B, Esser V, Foster DW, McGarry JD. Human liver mitochondrial carnitine palmitoyltransferase I: characterization of its cDNA and chromosomal localization and partial analysis of the gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 1995 Mar 14 [cited 2016 Jan 7];92(6):1984–8. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=42407&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
8. McGarry JD, Brown NF. The mitochondrial carnitine palmitoyltransferase system.

- From concept to molecular analysis. *Eur J Biochem* [Internet]. 1997 Feb 15 [cited 2015 Jun 23];244(1):1–14. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9063439>
9. Yamazaki N, Shinohara Y, Shima A, Terada H. High expression of a novel carnitine palmitoyltransferase I like protein in rat brown adipose tissue and heart: isolation and characterization of its cDNA clone. *FEBS Lett* [Internet]. 1995 Apr 17 [cited 2016 Jan 7];363(1-2):41–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7729550>
 10. Esser V, Brown NF, Cowan AT, Foster DW, McGarry JD. Expression of a cDNA isolated from rat brown adipose tissue and heart identifies the product as the muscle isoform of carnitine palmitoyltransferase I (M-CPT I). M-CPT I is the predominant CPT I isoform expressed in both white (epididymal) and brown adipo. *J Biol Chem* [Internet]. 1996 Mar 22 [cited 2016 Jan 7];271(12):6972–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8636126>
 11. Ka S, Markljung E, Ring H, Albert FW, Harun-Or-Rashid M, Wahlberg P, et al. Expression of carnitine palmitoyl-CoA transferase-1B is influenced by a cis-acting eQTL in two chicken lines selected for high and low body weight. *Physiol Genomics* [Internet]. 2013 May 1 [cited 2015 Jun 2];45(9):367–76. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23512741>
 12. Price N, van der Leij F, Jackson V, Corstorphine C, Thomson R, Sorensen A, et al. A novel brain-expressed protein related to carnitine palmitoyltransferase I. *Genomics* [Internet]. 2002 Oct [cited 2016 Jan 7];80(4):433–42. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12376098>
 13. McGarry JD. Travels with carnitine palmitoyltransferase I: from liver to germ cell with stops in between. *Biochem Soc Trans* [Internet]. 2001 May [cited 2016 Jan 7];29(Pt 2):241–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11356162>
 14. Fraser F, Corstorphine CG, Zammit VA. Topology of carnitine palmitoyltransferase I in the mitochondrial outer membrane. *Biochem J* [Internet]. 1997 May 1 [cited 2016 Jan 7];323 (Pt 3:711–8. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1218374&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

15. Morillas M, Gómez-Puertas P, Roca R, Serra D, Asins G, Valencia A, et al. Structural model of the catalytic core of carnitine palmitoyltransferase I and carnitine octanoyltransferase (COT): mutation of CPT I histidine 473 and alanine 381 and COT alanine 238 impairs the catalytic activity. *J Biol Chem* [Internet]. 2001 Nov 30 [cited 2016 Jan 7];276(48):45001–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11553629>
16. Morillas M, López-Viñas E, Valencia A, Serra D, Gómez-Puertas P, Hegardt FG, et al. Structural model of carnitine palmitoyltransferase I based on the carnitine acetyltransferase crystal. *Biochem J* [Internet]. 2004 May 1 [cited 2016 Jan 7];379(Pt 3):777–84. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1224103&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
17. Cohen I, Kohl C, McGarry JD, Girard J, Prip-Buus C. The N-terminal domain of rat liver carnitine palmitoyltransferase 1 mediates import into the outer mitochondrial membrane and is essential for activity and malonyl-CoA sensitivity. *J Biol Chem* [Internet]. 1998 Nov 6 [cited 2016 Jan 7];273(45):29896–904. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9792707>
18. Jackson VN, Zammit VA, Price NT. Identification of positive and negative determinants of malonyl-CoA sensitivity and carnitine affinity within the amino termini of rat liver- and muscle-type carnitine palmitoyltransferase I. *J Biol Chem* [Internet]. 2000 Dec 8 [cited 2016 Jan 7];275(49):38410–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10969089>
19. Shi J, Zhu H, Arvidson DN, Woldegiorgis G. A single amino acid change (substitution of glutamate 3 with alanine) in the N-terminal region of rat liver carnitine palmitoyltransferase I abolishes malonyl-CoA inhibition and high affinity binding. *J Biol Chem* [Internet]. 1999 Apr 2 [cited 2016 Jan 7];274(14):9421–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10092622>
20. Jackson VN, Price NT, Zammit VA. Specificity of the interactions between Glu-3, Ser-24, and Gln-30 within the N-terminal segment of rat liver mitochondrial overt carnitine palmitoyltransferase (L-CPT I) in determining the malonyl-CoA sensitivity of the enzyme. *Biochemistry* [Internet]. 2001 Dec 4 [cited 2016 Jan

- 7];40(48):14629–34. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11724576>
21. Swanson ST, Foster DW, McGarry JD, Brown NF. Roles of the N- and C-terminal domains of carnitine palmitoyltransferase I isoforms in malonyl-CoA sensitivity of the enzymes: insights from expression of chimaeric proteins and mutation of conserved histidine residues. *Biochem J* [Internet]. 1998 Nov 1 [cited 2016 Jan 7];335 (Pt 3:513–9. Available from:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1219810&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 22. Pan Y, Cohen I, Guillerault F, Fève B, Girard J, Prip-Buus C. The extreme C terminus of rat liver carnitine palmitoyltransferase I is not involved in malonyl-CoA sensitivity but in initial protein folding. *J Biol Chem* [Internet]. 2002 Dec 6 [cited 2016 Jan 7];277(49):47184–9. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12351641>
 23. Faye A, Borthwick K, Esnous C, Price NT, Gobin S, Jackson VN, et al. Demonstration of N- and C-terminal domain intramolecular interactions in rat liver carnitine palmitoyltransferase 1 that determine its degree of malonyl-CoA sensitivity. *Biochem J* [Internet]. 2005 Apr 1 [cited 2016 Jan 7];387(Pt 1):67–76. Available from:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1134933&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 24. Rao JN, Warren GZL, Estolt-Povedano S, Zammit VA, Ulmer TS. An environment-dependent structural switch underlies the regulation of carnitine palmitoyltransferase 1A. *J Biol Chem* [Internet]. 2011 Dec 9 [cited 2016 Jan 7];286(49):42545–54. Available from:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3234983&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 25. Faye A, Esnous C, Price NT, Onfray MA, Girard J, Prip-Buus C. Rat liver carnitine palmitoyltransferase 1 forms an oligomeric complex within the outer mitochondrial membrane. *J Biol Chem* [Internet]. 2007 Sep 14 [cited 2016 Jan 7];282(37):26908–16. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17650509>

26. Jenei ZA, Warren GZL, Hasan M, Zammit VA, Dixon AM. Packing of transmembrane domain 2 of carnitine palmitoyltransferase-1A affects oligomerization and malonyl-CoA sensitivity of the mitochondrial outer membrane protein. *FASEB J* [Internet]. 2011 Dec [cited 2015 Dec 22];25(12):4522–30. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21917985>
27. Brdiczka D. Contact sites between mitochondrial envelope membranes. Structure and function in energy- and protein-transfer. *Biochim Biophys Acta* [Internet]. 1991 Nov 13 [cited 2016 Jan 7];1071(3):291–312. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1958691>
28. Zammit VA. Carnitine palmitoyltransferase 1: central to cell function. *IUBMB Life* [Internet]. 2008 May [cited 2016 Jan 7];60(5):347–54. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18421775>
29. Zammit VA. Hepatic triacylglycerol synthesis and secretion: DGAT2 as the link between glycaemia and triglyceridaemia. *Biochem J* [Internet]. 2013 Apr 1 [cited 2016 Jan 7];451(1):1–12. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23489367>
30. Zammit VA, Corstorphine CG, Kolodziej MP, Fraser F. Lipid molecular order in liver mitochondrial outer membranes, and sensitivity of carnitine palmitoyltransferase I to malonyl-CoA. *Lipids* [Internet]. 1998 Apr [cited 2016 Jan 7];33(4):371–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9590624>
31. Zammit VA, Price NT, Fraser F, Jackson VN. Structure-function relationships of the liver and muscle isoforms of carnitine palmitoyltransferase I. *Biochem Soc Trans* [Internet]. 2001 May [cited 2016 Jan 7];29(Pt 2):287–92. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11356169>
32. Wolfgang MJ, Kurama T, Dai Y, Suwa A, Asami M, Matsumoto S-I, et al. The brain-specific carnitine palmitoyltransferase-1c regulates energy homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2006 May 9 [cited 2015 Jun 2];103(19):7282–7. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1564279&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

33. Sierra AY, Gratacós E, Carrasco P, Clotet J, Ureña J, Serra D, et al. CPT1c is localized in endoplasmic reticulum of neurons and has carnitine palmitoyltransferase activity. *J Biol Chem* [Internet]. 2008 Mar 14 [cited 2015 Jun 2];283(11):6878–85. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18192268>
34. Gao XF, Chen W, Kong XP, Xu AM, Wang ZG, Sweeney G, et al. Enhanced susceptibility of Cpt1c knockout mice to glucose intolerance induced by a high-fat diet involves elevated hepatic gluconeogenesis and decreased skeletal muscle glucose uptake. *Diabetologia* [Internet]. 2009 May [cited 2015 Jun 2];52(5):912–20. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19224198>
35. Zaugg K, Yao Y, Reilly PT, Kannan K, Kiarash R, Mason J, et al. Carnitine palmitoyltransferase 1C promotes cell survival and tumor growth under conditions of metabolic stress. *Genes Dev* [Internet]. 2011 May 15 [cited 2015 May 4];25(10):1041–51. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3093120&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
36. Dai Y, Wolfgang MJ, Cha SH, Lane MD. Localization and effect of ectopic expression of CPT1c in CNS feeding centers. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. 2007 Aug 3 [cited 2015 Jun 2];359(3):469–74. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17559810>
37. Wolfgang MJ, Cha SH, Millington DS, Cline G, Shulman GI, Suwa A, et al. Brain-specific carnitine palmitoyl-transferase-1c: role in CNS fatty acid metabolism, food intake, and body weight. *J Neurochem* [Internet]. 2008 May [cited 2015 Jun 2];105(4):1550–9. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3888516&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
38. Samanta S, Situ AJ, Ulmer TS. Structural characterization of the regulatory domain of brain carnitine palmitoyltransferase 1. *Biopolymers* [Internet]. 2014 Apr [cited 2015 Jun 2];101(4):398–405. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3907070&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

39. Gao S, Kinzig KP, Aja S, Scott KA, Keung W, Kelly S, et al. Leptin activates hypothalamic acetyl-CoA carboxylase to inhibit food intake. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2007 Oct 30 [cited 2016 Jan 8];104(44):17358–63. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2077261&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
40. Gao S, Keung W, Serra D, Wang W, Carrasco P, Casals N, et al. Malonyl-CoA mediates leptin hypothalamic control of feeding independent of inhibition of CPT-1a. *AJP Regul Integr Comp Physiol* [Internet]. 2011 Apr 20 [cited 2016 Jan 8];301(1):R209–17. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21508288>
41. Gao S, Zhu G, Gao X, Wu D, Carrasco P, Casals N, et al. Important roles of brain-specific carnitine palmitoyltransferase and ceramide metabolism in leptin hypothalamic control of feeding. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2011 Jun 7 [cited 2016 Jan 8];108(23):9691–6. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3111271&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
42. Ramírez S, Martins L, Jacas J, Carrasco P, Pozo M, Clotet J, et al. Hypothalamic ceramide levels regulated by CPT1C mediate the orexigenic effect of ghrelin. *Diabetes* [Internet]. 2013 Jul [cited 2015 Jun 2];62(7):2329–37. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3712075&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
43. Carrasco P, Jacas J, Sahún I, Muley H, Ramírez S, Puisac B, et al. Carnitine palmitoyltransferase 1C deficiency causes motor impairment and hypoactivity. *Behav Brain Res* [Internet]. 2013 Nov 1 [cited 2015 Jun 2];256:291–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23973755>
44. Rinaldi C, Schmidt T, Situ AJ, Johnson JO, Lee PR, Chen K-L, et al. Mutation in CPT1C Associated With Pure Autosomal Dominant Spastic Paraplegia. *JAMA Neurol* [Internet]. 2015 May 1 [cited 2015 Jun 2];72(5):561–70. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25751282>
45. Zhao X, Alvarado D, Rainier S, Lemons R, Hedera P, Weber CH, et al. Mutations in a newly identified GTPase gene cause autosomal dominant hereditary spastic

- paraplegia. *Nat Genet* [Internet]. 2001 Nov [cited 2016 Jan 11];29(3):326–31. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11685207>
46. Carrasco P, Sahún I, McDonald J, Ramírez S, Jacas J, Gratacós E, et al. Ceramide levels regulated by carnitine palmitoyltransferase 1C control dendritic spine maturation and cognition. *J Biol Chem* [Internet]. 2012 Jun 15 [cited 2015 Jun 2];287(25):21224–32. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3375544&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 47. Roomets E, Kivelä T, Tyni T. Carnitine palmitoyltransferase I and Acyl-CoA dehydrogenase 9 in retina: insights of retinopathy in mitochondrial trifunctional protein defects. *Invest Ophthalmol Vis Sci* [Internet]. 2008 Apr [cited 2015 Jun 2];49(4):1660–4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18385088>
 48. Reilly PT, Mak TW. Molecular pathways: tumor cells Co-opt the brain-specific metabolism gene CPT1C to promote survival. *Clin Cancer Res* [Internet]. 2012 Nov 1 [cited 2015 May 18];18(21):5850–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22952346>
 49. Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* [Internet]. 1981 Jul 9 [cited 2014 Dec 18];292(5819):154–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7242681>
 50. Martin GR. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 1981 Dec [cited 2014 Nov 10];78(12):7634–8. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=349323&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 51. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* [Internet]. 1998 Nov 6 [cited 2014 Oct 17];282(5391):1145–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9804556>
 52. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors.

- Cell [Internet]. 2007 Nov 30 [cited 2014 Jul 9];131(5):861–72. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18035408>
53. Hall PA, Watt FM. Stem cells: the generation and maintenance of cellular diversity. *Development* [Internet]. 1989 Aug [cited 2016 Jan 7];106(4):619–33. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2562658>
54. Morrison SJ, Shah NM, Anderson DJ. Regulatory mechanisms in stem cell biology. *Cell* [Internet]. 1997 Feb 7 [cited 2015 Dec 5];88(3):287–98. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9039255>
55. Kirstetter P, Anderson K, Porse BT, Jacobsen SEW, Nerlov C. Activation of the canonical Wnt pathway leads to loss of hematopoietic stem cell repopulation and multilineage differentiation block. *Nat Immunol* [Internet]. 2006 Oct [cited 2015 Dec 30];7(10):1048–56. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16951689>
56. Rock JR, Gao X, Xue Y, Randell SH, Kong Y-Y, Hogan BLM. Notch-dependent differentiation of adult airway basal stem cells. *Cell Stem Cell* [Internet]. 2011 Jun 3 [cited 2016 Jan 12];8(6):639–48. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3778678&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
57. Ingham PW, McMahon AP. Hedgehog signaling in animal development: paradigms and principles. *Genes Dev* [Internet]. 2001 Dec 1 [cited 2015 Dec 10];15(23):3059–87. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11731473>
58. Ilic D, Polak JM. Stem cells in regenerative medicine: introduction. *Br Med Bull* [Internet]. 2011 Jan [cited 2016 Jan 12];98:117–26. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21565803>
59. Ji H, Ehrlich LIR, Seita J, Murakami P, Doi A, Lindau P, et al. Comprehensive methylome map of lineage commitment from haematopoietic progenitors. *Nature* [Internet]. 2010 Aug 15 [cited 2015 Oct 15];467(7313):338–42. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2956609&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
60. Atari M, Gil-Recio C, Fabregat M, García-Fernández D, Barajas M, Carrasco MA,

- et al. Dental pulp of the third molar: a new source of pluripotent-like stem cells. *J Cell Sci* [Internet]. 2012 Jul 15 [cited 2015 Dec 4];125(Pt 14):3343–56. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22467856>
61. Kucia M, Reca R, Campbell FR, Zuba-Surma E, Majka M, Ratajczak J, et al. A population of very small embryonic-like (VSEL) CXCR4(+)SSEA-1(+)Oct-4+ stem cells identified in adult bone marrow. *Leukemia* [Internet]. 2006 May [cited 2016 Jan 13];20(5):857–69. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16498386>
 62. Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-Gonzalez XR, et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* [Internet]. 2002 Jul 4 [cited 2015 May 30];418(6893):41–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12077603>
 63. Bai J, Wang Y, Liu L, Chen J, Yang W, Gao L, et al. Human amniotic fluid-derived c-kit(+) and c-kit (-) stem cells: growth characteristics and some differentiation potential capacities comparison. *Cytotechnology* [Internet]. 2012 Oct [cited 2015 Dec 11];64(5):577–89. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3432531&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 64. Chen L, Wang D, Wu Z, Ma L, Daley GQ. Molecular basis of the first cell fate determination in mouse embryogenesis. *Cell Res* [Internet]. 2010 Sep [cited 2016 Jan 12];20(9):982–93. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20628366>
 65. Nichols J, Smith A. The origin and identity of embryonic stem cells. *Development* [Internet]. 2011 Jan [cited 2015 Dec 27];138(1):3–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21138972>
 66. Mimeault M, Batra SK. Concise Review: Recent Advances on the Significance of Stem Cells in Tissue Regeneration and Cancer Therapies. *Stem Cells* [Internet]. 2006 Nov [cited 2016 Jan 12];24(11):2319–45. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16794264>
 67. Menendez P, Bueno C, Wang L. Human embryonic stem cells: A journey beyond

- cell replacement therapies. *Cytherapy* [Internet]. 2006 Jan [cited 2016 Jan 12];8(6):530–41. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17148029>
68. Lee EJ, Kang H-J, Lee H-N, Kang SK, Kim K-H, Lee S-W, et al. New culture system for human embryonic stem cells: autologous mesenchymal stem cell feeder without exogenous fibroblast growth factor 2. *Differentiation* [Internet]. 2012 Jan [cited 2016 Jan 13];83(1):92–100. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22099180>
 69. Wang Q, Fang ZF, Jin F, Lu Y, Gai H, Sheng HZ. Derivation and growing human embryonic stem cells on feeders derived from themselves. *Stem Cells* [Internet]. 2005 Oct [cited 2016 Jan 13];23(9):1221–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15955827>
 70. Richards M, Fong C-Y, Chan W-K, Wong P-C, Bongso A. Human feeders support prolonged undifferentiated growth of human inner cell masses and embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* [Internet]. 2002 Sep [cited 2016 Jan 13];20(9):933–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12161760>
 71. Gerecht S, Burdick JA, Ferreira LS, Townsend SA, Langer R, Vunjak-Novakovic G. Hyaluronic acid hydrogel for controlled self-renewal and differentiation of human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2007 Jul 3 [cited 2015 Nov 30];104(27):11298–303. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2040893&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 72. Swistowski A, Peng J, Han Y, Swistowska AM, Rao MS, Zeng X. Xeno-free defined conditions for culture of human embryonic stem cells, neural stem cells and dopaminergic neurons derived from them. *PLoS One* [Internet]. 2009 Jan [cited 2016 Jan 13];4(7):e6233. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2705186&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 73. Van Hoof D, Braam SR, Dormeyer W, Ward-van Oostwaard D, Heck AJR, Krijgsveld J, et al. Feeder-free monolayer cultures of human embryonic stem cells express an epithelial plasma membrane protein profile. *Stem Cells* [Internet]. 2008 Nov [cited 2016 Jan 13];26(11):2777–81. Available from:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18703662>

74. Sriram G, Tan JY, Islam I, Rufaihah AJ, Cao T. Efficient differentiation of human embryonic stem cells to arterial and venous endothelial cells under feeder- and serum-free conditions. *Stem Cell Res Ther* [Internet]. 2015 Dec 30 [cited 2016 Jan 12];6(1):261. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4697311&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
75. Li L, Clevers H. Coexistence of quiescent and active adult stem cells in mammals. *Science* [Internet]. 2010 Jan 29 [cited 2015 May 22];327(5965):542–5. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4105182&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
76. Friedenstein AJ, Petrakova K V, Kurolesova AI, Frolova GP. Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation* [Internet]. 1968 Mar [cited 2015 Nov 26];6(2):230–47. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5654088>
77. Mezey E. The therapeutic potential of bone marrow-derived stromal cells. *J Cell Biochem* [Internet]. 2011 Oct [cited 2016 Jan 13];112(10):2683–7. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4601607&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
78. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng* [Internet]. 2001 Apr [cited 2015 Feb 19];7(2):211–28. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11304456>
79. Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell* [Internet]. 2002 Dec [cited 2015 Jan 12];13(12):4279–95. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=138633&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
80. Strioga M, Viswanathan S, Darinkas A, Slaby O, Michalek J. Same or not the

- same? Comparison of adipose tissue-derived versus bone marrow-derived mesenchymal stem and stromal cells. *Stem Cells Dev* [Internet]. 2012 Sep 20 [cited 2016 Jan 13];21(14):2724–52. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22468918>
81. Behr B, Ko SH, Wong VW, Gurtner GC, Longaker MT. Stem cells. *Plast Reconstr Surg* [Internet]. 2010 Oct [cited 2016 Jan 13];126(4):1163–71. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20555302>
 82. Mimeault M, Hauke R, Batra SK. Stem cells: a revolution in therapeutics-recent advances in stem cell biology and their therapeutic applications in regenerative medicine and cancer therapies. *Clin Pharmacol Ther* [Internet]. 2007 Sep [cited 2016 Jan 13];82(3):252–64. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17671448>
 83. Jones DL, Wagers AJ. No place like home: anatomy and function of the stem cell niche. *Nat Rev Mol Cell Biol* [Internet]. 2008 Jan [cited 2015 Nov 5];9(1):11–21. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18097443>
 84. Moore KA. Stem Cells and Their Niches. *Science* (80-) [Internet]. 2006 Mar 31 [cited 2015 Oct 11];311(5769):1880–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16574858>
 85. Ebben JD, Zorniak M, Clark PA, Kuo JS. Introduction to induced pluripotent stem cells: advancing the potential for personalized medicine. *World Neurosurg* [Internet]. Jan [cited 2016 Jan 13];76(3-4):270–5. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3278994&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 86. Boland MJ, Hazen JL, Nazor KL, Rodriguez AR, Gifford W, Martin G, et al. Adult mice generated from induced pluripotent stem cells. *Nature* [Internet]. 2009 Sep 3 [cited 2016 Jan 13];461(7260):91–4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19672243>
 87. Zhao X, Li W, Lv Z, Liu L, Tong M, Hai T, et al. iPS cells produce viable mice through tetraploid complementation. *Nature* [Internet]. 2009 Sep 3 [cited 2016 Jan 13];461(7260):86–90. Available from:

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19672241>
88. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* [Internet]. 2006 Aug 25 [cited 2014 Jul 9];126(4):663–76. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16904174>
 89. Park I-H, Zhao R, West JA, Yabuuchi A, Huo H, Ince TA, et al. Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors. *Nature* [Internet]. 2008 Jan 10 [cited 2014 Jul 12];451(7175):141–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18157115>
 90. Nakagawa M, Koyanagi M, Tanabe K, Takahashi K, Ichisaka T, Aoi T, et al. Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. *Nat Biotechnol* [Internet]. 2008 Jan [cited 2014 Jul 10];26(1):101–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18059259>
 91. Giorgetti A, Montserrat N, Aasen T, Gonzalez F, Rodríguez-Pizà I, Vassena R, et al. Generation of induced pluripotent stem cells from human cord blood using OCT4 and SOX2. *Cell Stem Cell* [Internet]. 2009 Oct 2 [cited 2015 Nov 1];5(4):353–7. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2779776&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 92. Kim JB, Greber B, Araúzo-Bravo MJ, Meyer J, Park KI, Zaehres H, et al. Direct reprogramming of human neural stem cells by OCT4. *Nature* [Internet]. 2009 Oct 1 [cited 2016 Jan 13];461(7264):649–3. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19718018>
 93. Zhao T, Zhang Z-N, Rong Z, Xu Y. Immunogenicity of induced pluripotent stem cells. *Nature* [Internet]. 2011 Jun 9 [cited 2015 Jul 20];474(7350):212–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21572395>
 94. Brunt KR, Weisel RD, Li R-K. Stem cells and regenerative medicine - future perspectives. *Can J Physiol Pharmacol* [Internet]. 2012 Mar [cited 2016 Jan 13];90(3):327–35. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22401558>
 95. Takashima Y, Era T, Nakao K, Kondo S, Kasuga M, Smith AG, et al.

- Neuroepithelial cells supply an initial transient wave of MSC differentiation. *Cell* [Internet]. 2007 Jun 29 [cited 2016 Mar 14];129(7):1377–88. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17604725>
96. Gronthos S, Mankani M, Brahim J, Robey PG, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2000 Dec 5 [cited 2015 Sep 19];97(25):13625–30. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=17626&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 97. Miura M, Gronthos S, Zhao M, Lu B, Fisher LW, Robey PG, et al. SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2003 May 13 [cited 2015 Aug 18];100(10):5807–12. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=156282&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 98. Sonoyama W, Liu Y, Yamaza T, Tuan RS, Wang S, Shi S, et al. Characterization of the apical papilla and its residing stem cells from human immature permanent teeth: a pilot study. *J Endod* [Internet]. 2008 Feb [cited 2015 Dec 9];34(2):166–71. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2714367&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 99. Seo B-M, Miura M, Gronthos S, Bartold PM, Batouli S, Brahim J, et al. Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet (London, England)* [Internet]. Jan [cited 2016 Jan 7];364(9429):149–55. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15246727>
 100. Vollner F, Driemel O, Reichert T, Morscheck C. Isolation and characterization of dental follicle precursor cells (DFPCs). *J Stem Cells Regen Med* [Internet]. 2007 Jan [cited 2016 Jan 13];2(1):130. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24692949>
 101. Sloan AJ, Waddington RJ. Dental pulp stem cells: what, where, how? *Int J Paediatr Dent* [Internet]. 2009 Jan [cited 2016 Jan 13];19(1):61–70. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19120509>

102. D'Ippolito G, Diabira S, Howard GA, Menei P, Roos BA, Schiller PC. Marrow-isolated adult multilineage inducible (MIAMI) cells, a unique population of postnatal young and old human cells with extensive expansion and differentiation potential. *J Cell Sci* [Internet]. 2004 Jun 15 [cited 2016 Jan 13];117(Pt 14):2971–81. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15173316>
103. Petrini M, Pacini S, Trombi L, Fazzi R, Montali M, Ikehara S, et al. Identification and purification of mesodermal progenitor cells from human adult bone marrow. *Stem Cells Dev* [Internet]. Jan [cited 2016 Jan 13];18(6):857–66. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3085824&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
104. Atari M, Barajas M, Hernández-Alfaro F, Gil C, Fabregat M, Ferrés Padró E, et al. Isolation of pluripotent stem cells from human third molar dental pulp. *Histol Histopathol* [Internet]. 2011 Aug [cited 2016 Jan 14];26(8):1057–70. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21692038>
105. Atari M, Caballé-Serrano J, Gil-Recio C, Giner-Delgado C, Martínez-Sarrà E, García-Fernández DA, et al. The enhancement of osteogenesis through the use of dental pulp pluripotent stem cells in 3D. *Bone* [Internet]. 2012 Apr [cited 2015 Dec 4];50(4):930–41. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22270057>
106. Myhre BA. The first recorded blood transfusions: 1656 to 1668. - *PubMed - NCBI* [Internet]. *Transfusion*, 30 (4). 1990 [cited 2016 Jan 14]. p. 358–62. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2190368>
107. Culme-Seymour EJ, Mason C. “The Little Purple Book”, 2nd edition: Cell therapy and regenerative medicine glossary. *Regen Med* [Internet]. 2012 May [cited 2016 Jan 14];7(3):263–4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22594317>
108. Bell E, Ehrlich HP, Buttle DJ, Nakatsuji T. Living tissue formed in vitro and accepted as skin-equivalent tissue of full thickness. *Science* [Internet]. 1981 Mar 6 [cited 2016 Jan 14];211(4486):1052–4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7008197>
109. Burke JF, Yannas I V, Quinby WC, Bondoc CC, Jung WK. Successful use of a

- physiologically acceptable artificial skin in the treatment of extensive burn injury. *Ann Surg* [Internet]. 1981 Oct [cited 2015 Oct 20];194(4):413–28. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1345315&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
110. Langer R. Tissue engineering. *Mol Ther* [Internet]. 2000 Jan [cited 2015 Dec 14];1(1):12–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10933907>
 111. Mironov V, Visconti RP, Markwald RR. What is regenerative medicine? Emergence of applied stem cell and developmental biology. *Expert Opin Biol Ther* [Internet]. 2004 Jun [cited 2015 Dec 27];4(6):773–81. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15174961>
 112. DAVATCHI F, ABDOLLAHI BS, MOHYEDDIN M, SHAHRAM F, NIKBIN B. Mesenchymal stem cell therapy for knee osteoarthritis. Preliminary report of four patients. *Int J Rheum Dis* [Internet]. 2011 May 4 [cited 2016 Jan 4];14(2):211–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21518322>
 113. Brazzini A, Cantella R, De la Cruz A, Yupanqui J, León C, Jorquiera T, et al. Intraarterial autologous implantation of adult stem cells for patients with Parkinson disease. *J Vasc Interv Radiol* [Internet]. 2010 Apr [cited 2016 Jan 14];21(4):443–51. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20346882>
 114. Ferlay J, Shin H-R, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer* [Internet]. 2010 Dec 15 [cited 2014 Jul 10];127(12):2893–917. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21351269>
 115. Robey RB, Weisz J, Kuemmerle NB, Salzberg AC, Berg A, Brown DG, et al. Metabolic reprogramming and dysregulated metabolism: cause, consequence and/or enabler of environmental carcinogenesis? *Carcinogenesis* [Internet]. 2015 Jun [cited 2016 Jan 14];36 Suppl 1:S203–31. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26106140>
 116. Merlo LMF, Pepper JW, Reid BJ, Maley CC. Cancer as an evolutionary and ecological process. *Nat Rev Cancer* [Internet]. 2006 Dec [cited 2015 Nov 29];6(12):924–35. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17109012>

117. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* [Internet]. 2011 Mar 4 [cited 2014 Jul 9];144(5):646–74. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21376230>
118. Kucia M, Ratajczak MZ. Stem cells as a two edged sword--from regeneration to tumor formation. *J Physiol Pharmacol* [Internet]. 2006 Nov [cited 2016 Jan 15];57 Suppl 7:5–16. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17228093>
119. Lobo NA, Shimono Y, Qian D, Clarke MF. The Biology of Cancer Stem Cells. *Annu Rev Cell Dev Biol* [Internet]. 2007 Nov [cited 2016 Jan 12];23(1):675–99. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17645413>
120. Piscaglia A-C. Stem cells, a two-edged sword: risks and potentials of regenerative medicine. *World J Gastroenterol* [Internet]. 2008 Jul 21 [cited 2016 Jan 15];14(27):4273–9. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2731176&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
121. Verga Falzacappa M V, Ronchini C, Reavie LB, Pelicci PG. Regulation of self-renewal in normal and cancer stem cells. *FEBS J* [Internet]. 2012 Oct [cited 2016 Jan 15];279(19):3559–72. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22846222>
122. Li L, Bhatia R. Stem cell quiescence. *Clin Cancer Res* [Internet]. 2011 Aug 1 [cited 2016 Jan 15];17(15):4936–41. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3410675&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
123. Vaiopoulos AG, Kostakis ID, Koutsilieris M, Papavassiliou AG. Colorectal cancer stem cells. *Stem Cells* [Internet]. 2012 Mar [cited 2015 Dec 7];30(3):363–71. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22232074>
124. Lorico A, Rappa G. Phenotypic heterogeneity of breast cancer stem cells. *J Oncol* [Internet]. 2011 Jan [cited 2016 Jan 15];2011:135039. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3026971&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
125. Lapidot T, Sirard C, Vormoor J, Murdoch B, Hoang T, Caceres-Cortes J, et al. A

- cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature* [Internet]. 1994 Mar 17 [cited 2015 Mar 29];367(6464):645–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7509044>
126. Zabierowski SE, Herlyn M. Melanoma stem cells: the dark seed of melanoma. *J Clin Oncol* [Internet]. 2008 Jun 10 [cited 2016 Jan 15];26(17):2890–4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18539969>
 127. Li C, Lee CJ, Simeone DM. Identification of human pancreatic cancer stem cells. *Methods Mol Biol* [Internet]. 2009 Jan [cited 2015 Nov 23];568:161–73. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19582426>
 128. Hurt EM, Kawasaki BT, Klarmann GJ, Thomas SB, Farrar WL. CD44+ CD24(-) prostate cells are early cancer progenitor/stem cells that provide a model for patients with poor prognosis. *Br J Cancer* [Internet]. 2008 Feb 26 [cited 2016 Jan 15];98(4):756–65. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2259168&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 129. Meng E, Long B, Sullivan P, McClellan S, Finan MA, Reed E, et al. CD44+/CD24- ovarian cancer cells demonstrate cancer stem cell properties and correlate to survival. *Clin Exp Metastasis* [Internet]. 2012 Dec [cited 2016 Jan 15];29(8):939–48. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22610780>
 130. Tohyama S, Hattori F, Sano M, Hishiki T, Nagahata Y, Matsuura T, et al. Distinct metabolic flow enables large-scale purification of mouse and human pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *Cell Stem Cell* [Internet]. 2013 Jan 3 [cited 2015 Nov 26];12(1):127–37. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23168164>
 131. Barbehenn EK, Wales RG, Lowry OH. Measurement of metabolites in single preimplantation embryos; a new means to study metabolic control in early embryos. *J Embryol Exp Morphol* [Internet]. 1978 Feb [cited 2016 Jan 18];43:29–46. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/580293>
 132. Shyh-Chang N, Daley GQ, Cantley LC. Stem cell metabolism in tissue development and aging. *Development* [Internet]. 2013 Jun [cited 2015 Jun 22];140(12):2535–47.

- Available from:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3666381&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
133. Leese HJ, Barton AM. Pyruvate and glucose uptake by mouse ova and preimplantation embryos. *J Reprod Fertil* [Internet]. 1984 Sep [cited 2016 Jan 18];72(1):9–13. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6540809>
 134. Quinn P, Wales RG. Adenosine triphosphate content of preimplantation mouse embryos. *J Reprod Fertil* [Internet]. 1971 Apr [cited 2016 Jan 18];25(1):133–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5551710>
 135. Johnson MT, Mahmood S, Patel MS. Intermediary metabolism and energetics during murine early embryogenesis. *J Biol Chem* [Internet]. 2003 Aug 22 [cited 2016 Jan 18];278(34):31457–60. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12788927>
 136. Pantaleon M, Kaye PL. Glucose transporters in preimplantation development. *Rev Reprod* [Internet]. 1998 May [cited 2016 Jan 18];3(2):77–81. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9685185>
 137. Van Blerkom J. Mitochondria in early mammalian development. *Semin Cell Dev Biol* [Internet]. 2009 May [cited 2016 Jan 18];20(3):354–64. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19136067>
 138. Varum S, Rodrigues AS, Moura MB, Momcilovic O, Easley CA, Ramalho-Santos J, et al. Energy metabolism in human pluripotent stem cells and their differentiated counterparts. *PLoS One* [Internet]. 2011 Jan [cited 2016 Jan 18];6(6):e20914. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3117868&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 139. Panopoulos AD, Yanes O, Ruiz S, Kida YS, Diep D, Tautenhahn R, et al. The metabolome of induced pluripotent stem cells reveals metabolic changes occurring in somatic cell reprogramming. *Cell Res* [Internet]. 2012 Jan [cited 2016 Jan 18];22(1):168–77. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3252494&tool=pmcentr>

ez&rendertype=abstract

140. Folmes CDL, Nelson TJ, Martinez-Fernandez A, Arrell DK, Lindor JZ, Dzeja PP, et al. Somatic oxidative bioenergetics transitions into pluripotency-dependent glycolysis to facilitate nuclear reprogramming. *Cell Metab* [Internet]. 2011 Aug 3 [cited 2015 Dec 16];14(2):264–71. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3156138&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
141. Hansson J, Rafiee MR, Reiland S, Polo JM, Gehring J, Okawa S, et al. Highly coordinated proteome dynamics during reprogramming of somatic cells to pluripotency. *Cell Rep* [Internet]. 2012 Dec 27 [cited 2015 Sep 28];2(6):1579–92. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4438680&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
142. Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science* [Internet]. 2009 May 22 [cited 2014 Jul 11];324(5930):1029–33. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2849637&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
143. Wang, J; Alexander, P; Wu, L.; Hammer, R.; Cleaver, O. and McKnight SL. Dependence of mouse embryonic stem cells on threonine catabolism. - PubMed - NCBI [Internet]. *Science*. 2009 [cited 2016 Jan 19]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19589965>
144. Cho, Y.M.; kwon, S.; Pak, Y.K.; Seol HW. Dynamic changes in mitochondrial biogenesis and antioxidant enzymes during the spontaneous differentiation of human embryonic stem cells. - PubMed - NCBI [Internet]. *Biochemical and biophysical research communications*. 2006 [cited 2016 Jan 19]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16920071>
145. Pattappa G, Heywood HK, de Bruijn JD, Lee DA. The metabolism of human mesenchymal stem cells during proliferation and differentiation. *J Cell Physiol* [Internet]. 2011 Oct [cited 2015 Aug 3];226(10):2562–70. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21792913>

146. Pattappa G, Thorpe SD, Jegard NC, Heywood HK, de Bruijn JD, Lee DA. Continuous and uninterrupted oxygen tension influences the colony formation and oxidative metabolism of human mesenchymal stem cells. *Tissue Eng Part C Methods* [Internet]. 2013 Jan [cited 2016 Jan 19];19(1):68–79. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22731854>
147. Palomäki S, Pietilä M, Laitinen S, Pesälä J, Sormunen R, Lehenkari P, et al. HIF-1 α is upregulated in human mesenchymal stem cells. *Stem Cells* [Internet]. 2013 Sep [cited 2015 Jul 18];31(9):1902–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23744828>
148. Wang GL, Jiang BH, Rue EA, Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 1995 Jun 6 [cited 2015 Jan 23];92(12):5510–4. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=41725&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
149. Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1: master regulator of O₂ homeostasis. *Curr Opin Genet Dev* [Internet]. 1998 Oct [cited 2016 Jan 20];8(5):588–94. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9794818>
150. Ke, Qingdong and Costa M. Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1). *Mol Pharmacol* [Internet]. 2006 Nov [cited 2015 Feb 16];70(5):1469–80. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16887934>
151. Tormos K V, Anso E, Hamanaka RB, Eisenbart J, Joseph J, Kalyanaraman B, et al. Mitochondrial complex III ROS regulate adipocyte differentiation. *Cell Metab* [Internet]. 2011 Oct 5 [cited 2015 Dec 28];14(4):537–44. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3190168&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
152. Chen C-T, Shih Y-R V, Kuo TK, Lee OK, Wei Y-H. Coordinated changes of mitochondrial biogenesis and antioxidant enzymes during osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Stem Cells* [Internet]. 2008 Apr [cited 2016 Jan 16];26(4):960–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18218821>

153. Martin S, Parton RG. Lipid droplets: a unified view of a dynamic organelle. *Nat Rev Mol Cell Biol* [Internet]. 2006 May [cited 2015 Nov 29];7(5):373–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16550215>
154. Farese R V, Walther TC. Lipid droplets finally get a little R-E-S-P-E-C-T. *Cell* [Internet]. 2009 Nov 25 [cited 2015 Nov 6];139(5):855–60. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3097139&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
155. Greenberg AS, Coleman RA, Kraemer FB, McManaman JL, Obin MS, Puri V, et al. The role of lipid droplets in metabolic disease in rodents and humans. *J Clin Invest* [Internet]. 2011 Jun [cited 2016 Jan 14];121(6):2102–10. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3104768&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
156. Fujimoto T, Parton RG. Not just fat: the structure and function of the lipid droplet. *Cold Spring Harb Perspect Biol* [Internet]. 2011 Mar [cited 2015 Nov 12];3(3). Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3039932&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
157. Ohsaki Y, Cheng J, Suzuki M, Shinohara Y, Fujita A, Fujimoto T. Biogenesis of cytoplasmic lipid droplets: from the lipid ester globule in the membrane to the visible structure. *Biochim Biophys Acta* [Internet]. 2009 Jun [cited 2016 Jan 21];1791(6):399–407. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18996222>
158. Murphy S, Martin S, Parton RG. Lipid droplet-organelle interactions; sharing the fats. *Biochim Biophys Acta* [Internet]. 2009 Jun [cited 2016 Jan 21];1791(6):441–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18708159>
159. Kassan A, Herms A, Fernández-Vidal A, Bosch M, Schieber NL, Reddy BJN, et al. Acyl-CoA synthetase 3 promotes lipid droplet biogenesis in ER microdomains. *J Cell Biol* [Internet]. 2013 Dec 23 [cited 2016 Jan 21];203(6):985–1001. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3871434&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

160. Lass A, Zimmermann R, Oberer M, Zechner R. Lipolysis - a highly regulated multi-enzyme complex mediates the catabolism of cellular fat stores. *Prog Lipid Res* [Internet]. 2011 Jan [cited 2015 Oct 21];50(1):14–27. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3031774&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
161. Smirnova E, Goldberg EB, Makarova KS, Lin L, Brown WJ, Jackson CL. ATGL has a key role in lipid droplet/adiposome degradation in mammalian cells. *EMBO Rep* [Internet]. 2006 Jan [cited 2016 Feb 1];7(1):106–13. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1369222&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
162. Meléndez A, Levine B. Autophagy in *C. elegans*. *WormBook* [Internet]. 2009 Jan [cited 2016 Jan 21];1–26. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19705512>
163. Jin S, White E. Role of autophagy in cancer: management of metabolic stress. *Autophagy* [Internet]. Jan [cited 2016 Jan 21];3(1):28–31. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2770734&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
164. Lamb CA, Yoshimori T, Tooze SA. The autophagosome: origins unknown, biogenesis complex. *Nat Rev Mol Cell Biol* [Internet]. 2013 Dec [cited 2015 Nov 15];14(12):759–74. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24201109>
165. Singh R, Cuervo AM. Autophagy in the cellular energetic balance. *Cell Metab* [Internet]. 2011 May 4 [cited 2015 May 8];13(5):495–504. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3099265&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
166. Mizushima N, Komatsu M. Autophagy: renovation of cells and tissues. *Cell* [Internet]. 2011 Nov 11 [cited 2014 Jul 14];147(4):728–41. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22078875>
167. Kroemer G. Autophagy: a druggable process that is deregulated in aging and human disease. *J Clin Invest* [Internet]. 2015 Jan [cited 2016 Jan 21];125(1):1–4. Available

- from:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4382251&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
168. Kanki T, Klionsky DJ. The molecular mechanism of mitochondria autophagy in yeast. *Mol Microbiol* [Internet]. 2010 Feb [cited 2016 Jan 22];75(4):795–800. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3628732&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
169. Tanida I. Autophagosome formation and molecular mechanism of autophagy. *Antioxid Redox Signal* [Internet]. 2011 Jun [cited 2016 Jan 2];14(11):2201–14. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20712405>
170. Tanida I. Autophagy basics. *Microbiol Immunol* [Internet]. 2011 Jan [cited 2015 Dec 10];55(1):1–11. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21175768>
171. Mijaljica D, Rosado CJ, Devenish RJ, Prescott M. Biosensors for Monitoring Autophagy [Internet]. Serra PA, editor. *Biosensors - Emerging Materials and Applications*. Melbourne, Australia; 2011. Available from: <http://www.intechopen.com/books/biosensors-emerging-materials-and-applications/biosensors-for-monitoring-autophagy>
172. Roduit R, Nolan C, Alarcon C, Moore P, Barbeau A, Delghingaro-Augusto V, et al. A role for the malonyl-CoA/long-chain acyl-CoA pathway of lipid signaling in the regulation of insulin secretion in response to both fuel and nonfuel stimuli. *Diabetes* [Internet]. 2004 Apr [cited 2016 Jan 19];53(4):1007–19. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15047616>
173. Ramírez-Peinado S, León-Annicchiarico CL, Galindo-Moreno J, Iurlaro R, Caro-Maldonado A, Prehn JHM, et al. Glucose-starved cells do not engage in prosurvival autophagy. *J Biol Chem* [Internet]. 2013 Oct 18 [cited 2016 Jan 27];288(42):30387–98. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3798503&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

174. Malandrino MI, Fucho R, Weber M, Calderon-Dominguez M, Mir JF, Valcarcel L, et al. Enhanced fatty acid oxidation in adipocytes and macrophages reduces lipid-induced triglyceride accumulation and inflammation. *Am J Physiol Endocrinol Metab* [Internet]. 2015 May 1 [cited 2016 Mar 16];308(9):E756–69. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25714670>
175. Rambold AS, Cohen S, Lippincott-Schwartz J. Fatty Acid Trafficking in Starved Cells: Regulation by Lipid Droplet Lipolysis, Autophagy, and Mitochondrial Fusion Dynamics. *Dev Cell* [Internet]. 2015 Mar 23 [cited 2015 Mar 6];32(6):678–92. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25752962>
176. Deretic V. Autophagosomes and lipid droplets: no longer just chewing the fat. *EMBO J* [Internet]. EMBO Press; 2015 Aug 13 [cited 2016 Mar 2];34(16):2111–3. Available from: <http://emboj.embopress.org/content/34/16/2111.abstract>
177. Gruia AT, Suciu M, Barbu-Tudoran L, Azghadi SMR, Cristea MI, Nica D V, et al. Mesenchymal Stromal Cells Differentiating to Adipocytes Accumulate Autophagic Vesicles Instead of Functional Lipid Droplets. *J Cell Physiol* [Internet]. 2015 Sep 1 [cited 2015 Nov 12]; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26332160>
178. Gratacòs-Batlle E, Yefimenko N, Cascos-García H, Soto D. AMPAR interacting protein CPT1C enhances surface expression of GluA1-containing receptors. *Front Cell Neurosci* [Internet]. 2014 Jan [cited 2015 Jun 2];8:469. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4313699&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
179. Fadó R, Soto D, Miñano-Molina AJ, Pozo M, Carrasco P, Yefimenko N, et al. Novel Regulation of the Synthesis of α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic Acid (AMPA) Receptor Subunit GluA1 by Carnitine Palmitoyltransferase 1C (CPT1C) in the Hippocampus. *J Biol Chem* [Internet]. 2015 Oct 16 [cited 2016 Jan 7];290(42):25548–60. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26338711>
180. Lohse I, Reilly P, Zaugg K. The CPT1C 5'UTR contains a repressing upstream open reading frame that is regulated by cellular energy availability and AMPK. *PLoS One* [Internet]. 2011 Jan [cited 2015 May 19];6(9):e21486. Available from:

<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3178533&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

181. Bost F, Decoux-Poullot A-G, Tanti J, Clavel S. Energy disruptors: rising stars in anticancer therapy? *Nat Publ Gr*. 2016;46.
182. Dos Santos F, Andrade PZ, Boura JS, Abecasis MM, da Silva CL, Cabral JMS. Ex vivo expansion of human mesenchymal stem cells: a more effective cell proliferation kinetics and metabolism under hypoxia. *J Cell Physiol* [Internet]. 2010 Apr [cited 2015 Jun 23];223(1):27–35. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20020504>
183. Fillmore N, Huqi A, Jaswal JS, Mori J, Paulin R, Haromy A, et al. Effect of fatty acids on human bone marrow mesenchymal stem cell energy metabolism and survival. *PLoS One* [Internet]. 2015 Jan [cited 2015 Jul 6];10(3):e0120257. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4358990&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
184. Ochocki JD, Simon MC. Nutrient-sensing pathways and metabolic regulation in stem cells. *J Cell Biol* [Internet]. 2013 Oct 14 [cited 2015 Jul 22];203(1):23–33. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3798256&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
185. Liu Y, Boukhelifa M, Tribble E, Morin-Kensicki E, Uetrecht A, Bear JE, et al. The Sac1 phosphoinositide phosphatase regulates Golgi membrane morphology and mitotic spindle organization in mammals. *Mol Biol Cell* [Internet]. 2008 Jul [cited 2016 Mar 23];19(7):3080–96. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2441670&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
186. Vergne I, Deretic V. The role of PI3P phosphatases in the regulation of autophagy. *FEBS Lett* [Internet]. 2010 Apr 2 [cited 2016 Mar 21];584(7):1313–8. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014579310001584>