



ESCUELA DE DOCTORADO
INTERNACIONAL DE LA USC

Miriam
Sartages García

Tesis doctoral

Fisiopatología de las
malformaciones cavernosas
cerebrales: papel del EGFR y
de las GCKIII quinasas

Santiago de Compostela, 2021

Programa de doctorado en Medicina Molecular



TESIS DE DOCTORADO

**FISIOPATOLOGÍA DE LAS MALFORMACIONES
CAVERNOSAS CEREBRALES: PAPEL DEL EGFR Y
DE LAS GCKIII QUINASAS**

Miriam Sartages García

ESCUELA DE DOCTORADO INTERNACIONAL DE LA UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE
COMPOSTELA

PROGRAMA DE DOCTORADO EN MEDICINA MOLECULAR

SANTIAGO DE COMPOSTELA

AÑO 2021



DECLARACIÓN DEL AUTOR DE LA TESIS

FISIOPATOLOGÍA DE LAS MALFORMACIONES CAVERNOSAS CEREBRALES: PAPEL DEL EGFR Y DE LAS GCKIII QUINASAS

Dña. Miriam Sartages García

Presento mi tesis, siguiendo el procedimiento adecuado al Reglamento, y declaro que:

- 1) La tesis abarca los resultados de la elaboración de mi trabajo.*
- 2) En su caso, en la tesis se hace referencia a las colaboraciones que tuvo este trabajo.*
- 3) Confirmando que la tesis no incurre en ningún tipo de plagio de otros autores ni de trabajos presentados por mí para la obtención de otros títulos.*
- 4) La tesis es la versión definitiva presentada para su defensa y coincide con la versión enviada en formato electrónico.*

En Santiago de Compostela, 20 de diciembre de 2021

AUTORIZACIÓN DE LOS DIRECTORES / TUTORES DE LA TESIS

D. **Juan Bautista Zalvide Torrente** como Tutor y Director
y Dña. **Celia María Pombo Ramos**, como Directora

INFORMAN sobre la presente Tesis Doctoral **Fisiopatología de las malformaciones cavernosas cerebrales: papel del EGFR y de las GCKIII quinasas.**

*Que la presente tesis, se corresponde con el trabajo realizado por Dña. **Miriam Sartages García**, bajo mi dirección, y autorizo su presentación, considerando que reúne los requisitos exigidos en el Reglamento de Estudios de Doctorado de la USC, y que como director de esta no incurre en las causas de abstención establecidas en Ley 40/2015.*

De acuerdo con el Reglamento de Estudios de Doctorado, también declara que esta tesis doctoral es apta para ser defendida en base a la modalidad Monográfico con reproducción de publicaciones, en la que la participación del doctorando fue determinante para su elaboración y las publicaciones se ajustan al Plan de Investigación.

En Santiago de Compostela, 20 de diciembre de 2021



Dña. Miriam Sartages García declara no tener ningún conflicto de intereses en relación con la Tesis Doctoral titulada:

Fisiopatología de las malformaciones cavernosas cerebrales: papel del EGFR y de las GCKIII quinasas.

En Santiago de Compostela, 20 de diciembre de 2021



Fdo. Miriam Sartages García

AGRADECIMIENTOS

Casi escribiendo las últimas líneas de esta Tesis, no quiero olvidarme de quienes han formado parte de alguna forma de ella y quiero dar las gracias.

Me gustaría agradecer a mis directores de Tesis la confianza y la buena disposición que han tenido siempre. A Chito por estar al otro lado de la puerta del despacho para preguntarle cualquier duda. A Celia por aportar el otro punto de vista. Gracias a ambos por recibirme en vuestro laboratorio y haberme dado la oportunidad de aprender tanto.

A la Xunta de Galicia por haberme concedido una beca predoctoral para desarrollar este trabajo.

A los investigadores y compañeros del CiMUS, y en especial a los integrantes del grupo MeMoEn. Por un lado, por su ayuda con su experiencia e indicaciones cuando nos salíamos de nuestro campo, y por otro, por echarnos una mano con los reactivos, tecnología y técnicas que me han permitido crear muchas de las figuras que se encuentran en esta Tesis.

Gracias al personal del CiMUS, a los técnicos que en múltiples ocasiones me hicieron más fácil el trabajo con *buffers*, genotipados, citometrías y microscopía; especialmente a Ángela, cuando tenía al mismo tiempo tres geles de agarosa en dos laboratorios distintos para tener el resultado cuanto antes. También a los técnicos del CEBEGA. Por la asistencia en las técnicas, los consejos y el mantenimiento de los animales; ir a pinchar a las ocho de la mañana costaba un poco menos cuando te recibía con un “Anda, Miriam, tú siempre tan temprano por aquí”.

No quiero omitir a los estudiantes y compañeros que han pasado por el laboratorio: a Cris Iglesias, por sus icónicas libretas para consultar y estar siempre si hacía falta algún favor; a Cris Almengló, por pasar de vecina a compañera; y a Ebel Florida, porque, aunque apenas coincidimos, fue la que encontró el hilo del que yo pude tirar.

También a los estudiantes de grado, con los que entendí que eso de enseñar tampoco se me daba tan mal: Tania, Toño, Pablo, Sara, Martín, Alicia, Carmen y Lucía. Ojalá os haya explicado algo útil de todo este mundo. También a Sanaz y Amin, por una última etapa diferente.

A Mar. Si algo he deducido en estos años de tesis es que me encanta el trabajo de poyata, que la primera vez que haces un protocolo es la más complicada y que me llevo una amiga. A la que le encantan los artículos con figuras de rutas, muchas figuras de rutas; la autora de la Figura 14. Gracias por los cafés vitales, las charlas sobre inhibidores y bandas de *western blot*. Por ayudar en temas del laboratorio y por estar siempre para los temas de fuera. Como dice T.S., “*And I got nothing but well wishes for ya*”. Gracias.

Y por supuesto, a mi familia. A mi abuelo, por preguntarme cada fin de semana cómo se estaban portando esos ratones; a mi abuela, que le hacía gracia cuando yo bromeaba sobre la Xunta pagándome. A Esteban y a mi Doñita. A mi neno, mi hermano.

A mis padres, por todos los festivos y domingos que había que irse a llevar a Miriam a la estación. Por no cuestionar ni una sola vez que me apeteciera dedicarme a un mundo desconocido para ellos. Por aplaudir como si hubiera ganado algún premio cuando publicamos el artículo del 2020, y más todavía con el de 2021. Estáis en el Sartages y el García de la portada, tan autores como yo.

A toda persona que me haya hecho esta etapa más llevadera. Muchas gracias.

ABREVIATURAS, ACRÓNIMOS Y ANGLICISMOS

Background: lecturas inespecíficas, fondo

BSA: *bovine serum albumin*; albúmina de suero bovino

CCM: *cavernous cerebral malformations*; malformaciones cavernosas cerebrales

cDNA: *complementary DNA*; ADN complementario

CSC: *CCM signaling complex*

DMEM: *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

DMSO: dimetilsulfóxido

DNA: *deoxyribonucleic acid*; ácido desoxirribonucleico o ADN

dNTP: *Deoxynucleotide Triphosphates*

downstream: en sentido descendente

DTT: ditioneitol

dTTP, dCTP, dGTP, dATP: *deoxythymidine triphosphate, deoxycytidine triphosphate, deoxyguanosine triphosphate, deoxyadenosine triphosphate*

ECACC: *European Collection of Authenticated Cell Cultures*

EDTA: *Ethylenediaminetetraacetic acid*; ácido etilendiaminatetraacético

EGF: *epidermic growth factor*; factor de crecimiento epitelial

EGFR: *epidermic growth factor receptor*; receptor del factor de crecimiento epitelial

ERK5: *Extracellular signal-regulated kinase 5*

FBS: *fetal Bovine Serum*; Suero fetal bovino

FC: *Flow Cytometry*; Citometría de flujo

Forward: cebador directo

FSC: *Forward Scatter*; en citometría referido al tamaño celular

GAPDH: *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*; gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa

GCK: *Germinal Center Kinases*

GFAP: *glial fibrillary acidic protein*; proteína ácida fibrilar glial

GPS: *L-Glutamine–Penicillin–Streptomycin*; L-Glutamina-Penicilina-Estreptomicina

HCAEC: *Human Coronary Artery Endothelial Cells*

hCMEC/D3: *human brain microvascular endothelial cells*

HEK293: *Human Embryonic Kidney cells 293*

HEPES: *4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid*

HRP: *horseradish peroxidase*; peroxidasa de rábano

HuVEC: *Human Umbilical Vein Endothelial Cells*

IHC: *immunohistochemistry*; inmunohistoquímica

kDa: Kilodaltons

KLF2: *Krüppel-like Factor 2*

KLF4: *Krüppel-like Factor 4*

Knockdown (KD): silenciado, referido a un gen cuya expresión ha sido reducida en un animal de estudio

knockout (KO): delecionado, referido a un gen que no se expresa o no es funcional en un animal de estudio

MAPKs: *Mitogen Activated Protein Kinases*

MEKK3 o MAP3K3: *Mitogen activated protein kinase kinase kinase 3*

mRNA: *Messenger RNA*; ARN mensajero

MTT: *3-(4,5-Dimethylthiazol-2-Yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide*; bromuro de 3(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolio

ON: *overnight*; durante la noche

P/S: *Penicillin-Streptomycin*; penicilina/estreptomicina

p/v: porcentaje peso-volumen

PBS: *phosphate buffered saline*; tampón fosfato salino.

PCR: *Polymerase Chain Reaction*; reacción en cadena de la polimerasa

Pellet: precipitado

PVDF: *polyvinylidene fluoride*; polifluoruro de vinilideno

Readout: resultado de una interacción molecular o de la activación de un gen

Reverse: cebador inverso

RIPA: *Radioimmunoprecipitation assay buffer*

RNA: *ribonucleic acid*; ácido ribonucleico o ARN

RPM: revoluciones por minuto

RT: *room temperature*; temperatura ambiente

SCC: *Side Scatter*; en citometría referido a la complejidad celular

shRNA: *Short Hairpin RNA*

siRNA: *Small Interfering RNA*

SNC: Sistema nervioso central

Spin: centrifugación de corta duración

Spinfection: Infección viral por centrifugación

STK20: *Sterile 20-like kinase*

U/ml: Unidades de actividad enzimática por mililitro

upstream: en sentido ascendente

v/v: porcentaje volumen-volumen

VEGF: *vascular endothelial growth factor*; factor de crecimiento vascular endotelial

VEGFR2: *vascular endothelial growth factor receptor 2*; receptor del factor de crecimiento vascular endotelial 2

Vórtex: mezclador de vórtice

Wild type: referido a un alelo, salvaje o normal, el que se encontraría en una población natural

RESUMEN

Las malformaciones cavernosas cerebrales (CCM) son una de las malformaciones vasculares más comunes del cerebro y una de las principales causas de accidente cerebrovascular, especialmente en jóvenes. Las CCM se componen de vasos sanguíneos anormales en forma de cavernas de paredes delgadas. Pueden aparecer espontáneamente o como manifestaciones de cavernomatosis familiar, una enfermedad causada por mutaciones en uno de los tres genes CCM (*CCM1*, *CCM2* y *CCM3*). En el caso de pacientes sintomáticos, la enfermedad puede cursar con déficits neuronales (cefaleas, afasias, epilepsias, ...) y hemorragias. En la actualidad, las lesiones solo se atajan mediante neurocirugía, un tratamiento invasivo que no se puede aplicar en todos los casos. A pesar de que se han propuesto algunos candidatos como tratamiento farmacológico, todavía no se dispone de ningún fármaco para tratar las CCM.

La presente tesis aborda el estudio de las bases moleculares de esta enfermedad mediante dos estrategias distintas, con las finalidades últimas de aumentar el conocimiento que se tiene de ella y de encontrar nuevas dianas farmacológicas para un tratamiento accesible y eficaz.

Por un lado, un primer objetivo nos llevó a estudiar qué otras alteraciones moleculares en las células endoteliales subyacen al desarrollo de las lesiones vasculares. Anteriormente, ya se habían descrito algunas de las alteraciones celulares que presentaban las células deficientes en genes CCM: desregulación de vías de señalización como la de RhoA-ROCK, MEKK3-KLF2/4, desregulación del citoesqueleto, pérdida de las uniones entre células, hiperpermeabilidad...

En el desarrollo del proyecto, y sobre resultados obtenidos previamente en nuestro grupo, descubrimos que las células endoteliales deficientes en el gen *CCM3* tenían aumentado el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR). Esta diferencia no se explicaba en defectos en la internalización del receptor en presencia de su ligando, aunque sí existían en la vía de degradación lisosomal. Al inhibir farmacológicamente la activación del EGFR, no observamos que las células sin *CCM3* recuperasen la normalidad en las vías afectadas. Sin embargo, estas células demostraron ser más susceptibles a sufrir apoptosis en presencia del inhibidor. Esta condición nos sugiere que el uso de inhibidores farmacológicos del EGFR pueden convertirse en una nueva estrategia como terapia en las CCM.

Por otro lado, quisimos también conocer cuál era el papel que las GCKIII quinasas *STK24* y *STK25* en el desarrollo de las malformaciones cavernosas. Estas dos quinasas ya habían sido relacionadas funcional y estructuralmente con *CCM3*, pero no se había investigado su rol en la patogénesis de las CCM.

En una primera aproximación *in vitro*, inhibimos la expresión de *STK24* y *STK25* usando siRNAs simultáneamente en células HuVEC y observamos qué efectos se producían en la biología endotelial. Estas células presentaban características como sobreexpresión de *KLF2* y *KLF4*, alta dispersión del aparato de Golgi, gran presencia de fibras de estrés y un menor porcentaje de VE-Cadherina y β -catenina en la membrana. Todas estas alteraciones coinciden con las que caracterizan a las células endoteliales sin algún gen CCM. Además, estudios *in vivo* con ratones deficientes para *Stk24* y *Stk25* en células endoteliales confirmaron que estos animales desarrollan malformaciones cavernosas cerebrales. Los animales presentaban lesiones vasculares en la corteza cerebral, el cerebelo y el bazo, las cuales comprometen severamente la

supervivencia. Las células endoteliales de los cerebros de estos animales mostraban sobreexpresión de *Klf2* y *Klf4*, al igual que ocurría en ratones mutantes para genes *Ccm*. Por tanto, nuestros resultados sugieren que las GCKIII quinasas STK24 y STK25 juegan un importante papel en la inhibición de las CCM.

PALABRAS CLAVE: CCM, malformaciones cavernosas cerebrales, cavernoma, endotelio, CCM3, EGFR, GCKIII, STK24, STK25.

ABSTRACT

Cerebral cavernous malformations (CCM) are one of the most common vascular malformations of the brain and one of the leading causes of stroke, especially in young people. CCM consist of abnormal blood vessels in the form of thin-walled caverns. They can appear spontaneously or as manifestations of familial cavernomatosis, a disease caused by mutations in one of the three CCM genes (CCM1, CCM2, and CCM3). In the case of symptomatic patients, the disease can present with neuronal deficits (headaches, aphasia, epilepsy,...) and hemorrhages. Currently, injuries only can be treated by neurosurgery, an invasive treatment that cannot be applied in all cases. Although some candidates have been proposed as pharmacological treatment, no drug is yet available to treat CCM.

This thesis proposes the study of the molecular bases of this disease through two different strategies, with the aim of increasing the knowledge we have about it and finding new drug targets for an accessible and effective treatment.

On the one hand, a first objective led us to study what other molecular alterations in endothelial cells underlie the development of vascular lesions. Previously, some of the cellular alterations exhibited by cells deficient in CCM genes had already been described: dysregulation of signaling pathways such as RhoA-ROCK, MEKK3-KLF2 / 4, dysregulation of the cytoskeleton, loss of cell junctions, hyperpermeability ...

During the development of the project, and on the results previously obtained in our group, we discovered that endothelial cells deficient in the CCM3 gene had increased epidermal growth factor receptor (EGFR). This difference was not explained by defects in receptor internalization in the presence of its ligand, although they did exist in the lysosomal degradation pathway. By pharmacologically inhibiting EGFR activation, we did not observe that cells without CCM3 returned to normality in the affected pathways. However, these cells were shown to be more susceptible to apoptosis in the presence of the inhibitor. This condition suggests that the use of pharmacological EGFR inhibitors may become a new strategy as a therapy in CCM.

On the other hand, we also wanted to know which is the role of the GCKIII kinases STK24 and STK25 in the development of cavernous malformations. These two kinases had already been functionally and structurally related to CCM3, but their role in the pathogenesis of CCMs had not been investigated.

In a first *in vitro* approach, we inhibited the expression of STK24 and STK25 using siRNAs simultaneously in HuVEC cells and observed what effects were produced on endothelial biology. These cells presented characteristics such as *KLF2* and *KLF4* overexpression, high dispersion of the Golgi apparatus, increased presence of stress fibers and a lower percentage of VE-Cadherin and β -catenin in the membrane. All these alterations mimic those that characterize endothelial cells without any CCM gene. Furthermore, *in vivo* studies with mice deficient for *Stk24* and *Stk25* in endothelial cells confirmed that these animals develop brain cavernous malformations. The animals presented vascular lesions in the cerebral cortex, cerebellum and spleen, which severely compromised their survival. The endothelial cells of the brains of these animals showed overexpression of *Klf2* and *Klf4*, as occurred in mutant mice for *Ccm* genes. Therefore, our results suggest that the GCKIII kinases STK24 and STK25 play an important role in the inhibition of CCMs.

MIRIAM SARTAGES GARCÍA

KEY WORDS: CCM, cerebral cavernous malformations, cavernoma, endothelium, CCM3, EGFR, GCKIII, STK24, STK25.



RESUMO

As malformacións cerebrais cavernosas (CCM) son unha das malformacións vasculares máis comúns do cerebro e unha das principais causas de ictus, especialmente nos mozos. Os CCM están formados por vasos sanguíneos anormais en forma de cavernas de paredes finas. Poden aparecer espontaneamente ou como manifestacións da cavernomatose familiar, unha enfermidade causada por mutacións nalgún dos tres xenes CCM (CCM1, CCM2 e CCM3). No caso dos pacientes sintomáticos, a enfermidade pode presentar déficits neuronais (dores de cabeza, afasias, epilepsias,...) e hemorragias. Actualmente, as lesións só se abordan mediante a neurocirurxía, un tratamento invasivo que non se pode aplicar en todos os casos. Aínda que algúns candidatos foron propostos como tratamento farmacolóxico, aínda non hai ningún medicamento dispoñible para tratar CCM.

Esta tese versa sobre o estudo das bases moleculares desta enfermidade a través de dúas estratexias diferentes, co fin último de aumentar o coñecemento da mesma e atopar novas dianas farmacolóxicas para un tratamento accesible e eficaz.

Por unha banda, un primeiro obxectivo levounos a estudar que outras alteracións moleculares nas células endoteliais subxacen no desenvolvemento das lesións vasculares. Con anterioridade, xa se describiran algunhas das alteracións celulares que presentan células deficientes en xenes CCM: desregulación de vías de sinalización como RhoA-ROCK, MEKK3-KLF2/4, desregulación do citoesqueleto, perda de unións celulares, hiperpermeabilidade...

No desenvolvemento do proxecto, e sobre os resultados obtidos previamente no noso grupo, descubrimos que as células endoteliais deficientes no xene CCM3 tiñan un aumento do receptor do factor de crecemento epidérmico (EGFR). Esta diferenza non se explicaba por defectos na internalización do receptor en presenza do seu ligando, aínda que si existían na vía de degradación lisosomal. Ao inhibir farmacoloxicamente a activación do EGFR, non observamos que as células sen CCM3 volvesen á normalidade nas vías afectadas. Non obstante, mostrouse que estas células son máis susceptibles á apoptose en presenza do inhibidor. Esta condición suxire que o uso de inhibidores farmacolóxicos de EGFR pode converterse nunha nova estratexia como terapia no CCM.

Por outra banda, tamén quixemos coñecer o papel das GCKIII quinasas STK24 e STK25 no desenvolvemento de malformacións cavernosas. Estas dúas quinasas xa estiveran relacionadas funcional e estruturalmente con CCM3, pero o seu papel na patoxénese dos CCM non fora investigado.

Nun primeiro enfoque *in vitro*, inhibimos a expresión de STK24 e STK25 usando siRNAs simultaneamente en células HuVEC e observamos que efectos se producían na bioloxía endotelial. Estas células presentaban características como a sobreexpresión de *KLF2* e *KLF4*, alta dispersión do aparello de Golgi, gran presenza de fibras de tensión e unha menor porcentaxe de VE-Cadherina e β -catenina na membrana. Todas estas alteracións coinciden coas que caracterizan ás células endoteliais sen ningún xene CCM. Ademais, estudos *in vivo* con ratos deficientes para *Stk24* e *Stk25* en células endoteliais confirmaron que estes animais desenvolven malformacións cavernosas cerebrais. Os animais presentaban lesións vasculares no córtex cerebral, cerebelo e bazo, que comprometían gravemente a supervivencia. As células endoteliais dos cerebros destes animais mostraron a sobreexpresión de *Klf2* e *Klf4*, como ocorre

nos ratos mutantes dos xenes *Ccm*. Polo tanto, os nosos resultados suxiren que as GCKIII quinasas STK24 e STK25 xogan un papel importante na inhibición dos CCM.

PALABRAS CLAVE: CCM, malformacións cavernosas cerebrais, cavernoma, endotelio, CCM3, EGFR, GCKIII, STK24, STK25.

ÍNDICE

ÍNDICE

ÍNDICE.....	XI
INTRODUCCIÓN.....	1
1. LAS MALFORMACIONES CAVERNOSAS CEREBRALES.....	3
1.1. Definición y demografía.....	3
1.2. Tipos de CCM.....	3
1.3. Sintomatología.....	3
1.4. Descripción de las lesiones.....	4
1.5. Neurocirugía como tratamiento.....	5
2. LAS BASES GENÉTICAS DE LAS CCM FAMILIARES.....	5
2.1. CCM1.....	6
2.2. CCM2.....	7
2.3. CCM3.....	7
2.4. OTROS GENES.....	9
3. ALTERACIONES CELULARES ASOCIADAS A LAS CCM.....	10
3.1. Vía de RhoA-ROCK.....	10
3.2. Integridad de las uniones entre células.....	12
3.3. Eje MEKK3-MEK5-ERK5-KLF2/4.....	14
3.4. Capacidad migratoria y dispersión del aparato de Golgi.....	16
3.5. Regulación del VEGFR2.....	16
4. LA FAMILIA DE LAS GCKIII QUINASAS.....	18
4.1. STK24.....	20
4.1.1. STK24 en la apoptosis.....	21
4.1.2. STK24 en dinámica de membrana.....	22
4.1.3. STK24 en la regulación del citoesqueleto.....	23
4.1.4. STK24 en el desarrollo embrionario.....	23
4.1.5. Antecedentes de STK24 en CCM.....	23

4.2. STK25	24
4.2.1. STK25 en la migración y polaridad celular: la regulación del aparato de Golgi	24
4.2.2. STK25 en apoptosis celular	25
4.2.3. STK25 en la regulación del citoesqueleto.....	25
4.2.4. STK25 en el desarrollo embrionario	25
4.2.5. Antecedentes de STK25 en CCM	26
4.3. STK26	27
OBJETIVOS	29
MATERIAL Y MÉTODOS	33
1. CULTIVOS CELULARES	35
1.1. HEK 293 (<i>Human Embryonic Kidney 293</i>)	35
1.2. A549 (<i>Adenocarcinomic human alveolar basal epithelial cells</i>)	35
1.3. HuVEC (<i>Human Umbilical Venous Endothelial Cells</i>)	35
1.3.1. Recogida del cordón umbilical.....	35
1.3.2. Extracción de las células endoteliales de la vena.....	36
1.4. hCMEC/D3 (<i>Human Cerebral Microvascular Endothelial Cell Line</i>)	36
2. FÁRMACOS Y TRATAMIENTOS	37
3. SILENCIAMIENTO GÉNICO MEDIANTE SHRNA	37
4. TRABAJO Y MANIPULACIÓN DE MICROORGANISMOS	39
4.1. MEDIOS DE CULTIVO BACTERIANO	39
4.2. PROCEDIMIENTOS DE RUTINA EN LA MANIPULACIÓN DE PLÁSMIDOS BACTERIANOS	39
4.2.1. Transformación de bacterias competentes	39
4.2.2. Obtención del DNA plasmídico	39
4.2.3. Electroforesis en gel de agarosa.....	40
4.2.4. Purificación de fragmentos de DNA a partir de geles de agarosa.....	40
4.2.5. Cuantificación de la concentración del DNA.....	40
5. SILENCIAMIENTO GÉNICO MEDIANTE SiRNA	40
6. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GÉNICA MEDIANTE PCR A TIEMPO REAL	41
6.1. EXTRACCIÓN DE RNA	41
6.2. RETROTRANSCRIPCIÓN	42
6.3. qPCR	42
7. OBTENCIÓN DE EXTRACTOS DE PROTEÍNAS	45
7.1. Extracción de proteína a partir de hígado de ratón	45
7.2. Extracción de proteína en cultivo celular	45

7.3. CUANTIFICACIÓN DE LOS EXTRACTOS USANDO EL MÉTODO DE BRADFORD	45
8. ANÁLISIS DE LOS EXTRACTOS DE PROTEÍNAS POR WESTERN BLOT	46
8.1. Preparación de las muestras para electroforesis en SDS-PAGE	46
8.2. Electroforesis en SDS-PAGE.....	46
8.3. Transferencia semi-seca	46
8.4. Inmunodetección.....	46
9. INMUNOFLUORESCENCIA.....	48
9.1. PRETRATAMIENTO DE LOS CUBREOBJETOS	48
9.2. FIJACIÓN, TINCIÓN Y MONTAJE DE LAS MUESTRAS.....	48
9.3. OBTENCIÓN DE IMÁGENES MEDIANTE MICROSCOPIA	49
9.4. MÉTODOS DE ANÁLISIS DE IMÁGENES DE INMUNOFLUORESCENCIA	49
10. ENSAYO DE FORMACIÓN DE TUBOS DE CÉLULAS ENDOTELIALES.....	50
11. CITOMETRÍA DE FLUJO PARA ESTUDIO DE EGFR	50
12. ENSAYO DE VIABILIDAD CELULAR POR REDUCCIÓN DE MTT	51
13. ENSAYO DE DETECCIÓN DE ACTIVIDAD CASPASA 3/7	51
14. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN	52
14.1. ESTABULACIÓN	52
14.2. MODELOS ANIMALES	52
14.3. EXTRACCIÓN DE DNA Y GENOTIPADO DE LOS ANIMALES	53
14.3.1. Genotipado de ratones <i>Stk24</i>	53
14.3.2. Genotipado de ratones <i>Cdh5-Cre</i>	54
14.3.3. Genotipado de ratones <i>Stk25 loxP</i>	55
14.4. INDUCCIÓN DE LA EXPRESIÓN DE CRE RECOMBINASA.....	56
14.4.1. Preparación y administración de tamoxifeno.....	56
14.4.2. Recolección de órganos	57
14.5. TÉCNICAS HISTOLÓGICAS Y ANÁLISIS	58
14.6. AISLAMIENTO DE CÉLULAS ENDOTELIALES DE ENCÉFALO DE RATÓN.....	59
14.6.1. Incubación de las <i>Dynabeads</i> ™ y el anticuerpo	59
14.6.2. Recolección de tejido cerebral	59
14.6.3. Homogenización del tejidos y primera digestión.....	59
14.6.4. Eliminación de mielina y lisis de eritrocitos	60
14.6.5. Segunda digestión	60
14.6.6. Aislamiento con las <i>Dynabeads</i> ™	60

RESULTADOS.....	63
CAPÍTULO I: PAPEL DEL EGFR EN LAS CCM.....	65
1. EL SILENCIAMIENTO DE CCM3 EN CÉLULAS ENDOTELIALES PROVOCA AUMENTO DE VEGFR2.....	66
2. LAS CÉLULAS SIN CCM3 PRESENTAN MAYOR CANTIDAD DE EGFR.....	67
3. LA PRINCIPAL VÍA DE DEGRADACIÓN DEL EGFR ES LA VÍA LISOSOMAL .	68
4. LA FALTA DE CCM3 NO AFECTA A LA CAPACIDAD DE INTERNALIZACIÓN DEL EFGR.....	69
5. EL TRATAMIENTO CON LAPATINIB NO REVIERTE LOS DEFECTOS DE CÉLULAS ShCCM3	70
6. LAS CÉLULAS ENDOTELIALES SIN CCM3 PRESENTAN MENOR VIABILIDAD CELULAR AL SER EXPUESTAS A LAPATINIB	72
CAPÍTULO II: PAPEL DE LAS GCKIII QUINASAS EN LAS CCM.....	76
1. EXPRESIÓN DE GCKIII EN CÉLULAS ENDOTELIALES	76
2. EFECTO DEL SILENCIAMIENTO DE <i>STK24</i> Y <i>STK25</i> EN CÉLULA ENDOTELIAL	77
3. LA FALTA DE CCM3 AFECTA A LAS PROTEÍNAS DE <i>STK24</i> Y <i>STK25</i>	78
4. LA FALTA DE <i>STK25</i> Y <i>STK24</i> AFECTA A LA PROTEÍNA CCM3.....	80
5. LAS CÉLULAS ENDOTELIALES QUE NO EXPRESAN <i>STK25</i> Y <i>STK24</i> MUESTRAN AUMENTO DE <i>KLF2</i> Y <i>KLF4</i>.....	81
6. LA INHIBICIÓN DE <i>STK25</i> Y <i>STK24</i> AFECTA A LA FORMACIÓN DE TUBOS..	82
7. LA DISTRIBUCIÓN DEL APARATO DE GOLGI SE VE AFECTADA POR LA INHIBICIÓN DE AMBOS GENES <i>STK25</i> Y <i>STK24</i>.....	84
8. LA FALTA DE <i>STK24</i> Y <i>STK25</i> AUMENTA LA PRESENCIA DE FIBRAS DE ESTRÉS EN CÉLULAS ENDOTELIALES.....	87
9. LA PRESENCIA DE β-CATENINA EN LA MEMBRANA CELULAR SE REDUCE CUANDO ELIMINAMOS <i>STK24</i>, <i>STK25</i> Y AMBOS	89
10. LA VE-CADHERINA ESTÁ MENOS PRESENTE EN LA MEMBRANA DE CÉLULAS DEFICIENTES EN <i>STK24</i> Y <i>STK25</i>.....	91
11. LOS RATONES <i>KNOCKOUT</i> PARA <i>Stk24</i> NO DESARROLLAN MALFORMACIONES CAVERNOSAS.....	93

12. LOS RATONES QUE NO EXPRESAN STK25 EN CÉLULAS ENDOTELIALES NO DESARROLLAN MALFORMACIONES CAVERNOSAS.....	94
13. LA SUPERVIVENCIA DE LOS RATONES <i>Stk24</i>^{-/-} <i>Stk25</i>^{iEC/iEC} SE VE ALTAMENTE COMPROMETIDA	95
14. LOS RATONES <i>Stk24</i>^{-/-} <i>Stk25</i>^{iEC/iEC} PRESENTAN MALFORMACIONES CAVERNOSAS EN DIFERENTES LOCALIZACIONES	96
15. LAS CÉLULAS ENDOTELIALES DE CEREBRO DE RATONES <i>Stk24</i>^{-/-} <i>Stk25</i>^{iEC/iEC} PRESENTAN UNA ALTA EXPRESIÓN DE LOS GENES <i>Klf2</i> Y <i>Klf4</i>.....	100
DISCUSIÓN.....	103
1. LA CANTIDAD DE VEGFR2 Y EGFR EN CÉLULAS ENDOTELIALES SIN CCM3 SE REGULA DE DIFERENTE FORMA	105
2. EL EGFR SE DEGRADA PREFERENTEMENTE POR VÍA LISOSOMAL.....	106
3. LA FALTA DE CCM3 NO AFECTA A LA INTERNALIZACIÓN DEL EGFR	107
4. EL TRATAMIENTO CON LAPATINIB NO REVIERTE LOS DEFECTOS DE CÉLULAS ShCCM3	108
5. LAS CÉLULAS ENDOTELIALES ShCCM3 SON MÁS SUSCEPTIBLES A MUERTE CELULAR AL TRATARLAS CON LAPATINIB.....	109
6. EFECTOS DEL SILENCIAMIENTO DE STK24 SOBRE STK25 Y VICEVERSA..	112
7. EFECTO DEL SILENCIAMIENTO DE CCM3 SOBRE STK24 Y STK25 Y VICEVERSA.....	113
8. LAS CÉLULAS ENDOTELIALES SIN STK24 Y STK25 SOBREEXPRESAN <i>KLF2</i> Y <i>KLF4</i>	113
9. LA TUBULOGÉNESIS DEPENDE DE STK24.....	113
10. LA DISPERSIÓN DEL APARATO DE GOLGI DEPENDE DE STK25	113
11. LAS CÉLULAS ENDOTELIALES SIN STK24 Y STK25 PRESENTAN GRAN CANTIDAD DE FIBRAS DE ESTRÉS	114
12. LAS CÉLULAS ENDOTELIALES SIN STK24 Y STK25 TIENEN UNA DISTRIBUCIÓN Y PRESENCIA DEFECTIVAS DE VE-CADHERINA Y β-CATENINA	114
13. LOS RATONES <i>KNOCKOUT</i> PARA <i>Stk24</i> Y LOS QUE NO EXPRESAN <i>Stk25</i> EN CÉLULAS ENDOTELIALES NO PRESENTAN LESIONES VASCULARES	115
14. LOS RATONES <i>Stk24</i>^{-/-} <i>Stk25</i>^{iEC/iEC} PRESENTAN CAVERNOMAS EN DIFERENTES LOCALIZACIONES Y RESULTA EN LETALIDAD.....	116

15. LAS CÉLULAS ENDOTELIALES DE RATONES <i>Stk24</i>^{-/-} <i>Stk25</i>^{iEC/iEC} TIENEN ALTERADA LA EXPRESIÓN DE <i>Klf2</i> Y <i>Klf4</i>.....	117
CONCLUSIONES.....	121
BIBLIOGRAFÍA.....	125
ANEXOS.....	143
ANEXO I. CRITERIO DE CALIDAD DE LOS ARTÍCULOS DONDE LOS RESULTADOS DE LA PRESENTE TESIS HAN SIDO PUBLICADOS.....	145
ANEXO II. INFORME FAVORABLE DEL COMITÉ DE ÉTICA PARA EL USO DE HUVEC	147
ANEXO III. MODELO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA EL USO DE HUVEC	148
ANEXO IV. AUTORIZACIÓN DEL PROYECTO DE EXPERIMENTACIÓN ANIMAL.....	152

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

1. LAS MALFORMACIONES CAVERNOSAS CEREBRALES

1.1. Definición y demografía

Los angiomas cavernosos, hemangiomas cavernosos, cavernomas cerebrales, cavernomatosis o malformaciones cavernosas cerebrales (*Cerebral Cavernous Malformations*, CCM) son vasos sanguíneos anormales y consisten en grupos de vasos en forma de cavernas de paredes delgadas sin estroma intermedio. Pertenecen al grupo de malformaciones vasculares de bajo flujo y ocurren en los lechos vasculares entre venas y capilares (Clatterbuck et al., 2001).

Las malformaciones cavernosas se han descrito en varias localizaciones del sistema nervioso central (SNC) (encéfalo, retina, médula espinal) y en otras localizaciones como la órbita (Calandriello et al., 2017), el hígado (Choi et al., 2018) y la piel (Matsui et al., 2014).

Las CCM aparecen en un 0,4 – 0,8 % del total de la población, según se van descubriendo en estudios clínicos, resonancias magnéticas a larga escala o autopsias. Resultan entre un 5 – 15 % de todas las malformaciones vasculares cerebrales. Pueden ser detectadas a cualquier edad, pero son más comunes en individuos de entre 20 y 50 años, siendo los 30 años los más afectados (Taslimi et al., 2016). Aparecen en ambos géneros con igual frecuencia (Barrow y Schuette, 2011).

1.2. Tipos de CCM

Las CCM aparecen en dos formas: forma esporádica y forma familiar.

La forma esporádica, que representa un 80 % de las CCM detectados, se caracteriza por no haber antecedentes familiares y existir una única lesión en la mayoría de los casos (Choquet et al., 2015). Sin embargo, la forma familiar representa un 20 % de las CCM, presentando múltiples lesiones, que pueden crecer en número, tamaño y gravedad y tiene base genética (OMIM®, *Online Mendelian Inheritance in Man*® #116860), ya que presenta herencia autosómica dominante, con penetrancia variable (Riant et al., 2010).

Se han descrito 3 genes cuyas mutaciones originarían la enfermedad del tipo familiar: CCM1/KRIT1 (7q21-22), CCM2/malcavernina (7p13) y CCM3/PDCD10 (3q26.1) con penetrancias del 88, 100 y 63 %, respectivamente (Craig et al., 1998).

1.3. Sintomatología

Parte de los pacientes que sufren CCM son asintomáticos (20 – 50 %) y las lesiones suelen aparecer en resonancias magnéticas recomendadas para diagnosticar focos epilépticos (Figura 1A), o déficits neurológicos (alteraciones en el equilibrio, en la capacidad acústica, afasias, cefaleas...) (Moore et al., 2014; Labauge et al., 2000).

En la mayoría de los pacientes aparece una sola lesión y su desarrollo suele ser benigno. Las formas graves de la patología son raras y se dan cuando se producen sangrados de las lesiones que afectan a regiones vitales del SNC. Éstas suelen ser las asociadas al tipo familiar.

Los síntomas y signos más comunes de las CCM son desórdenes epilépticos (50 %), hemorragias intracerebrales que pueden derivar en infartos cerebrales (25 %) y déficits neurológicos (25 %), que pueden aparecer combinados (Horne et al. 2016).

Estos síntomas pueden atribuirse a las hemorragias dentro o fuera de la lesión, a la presión que crea la masa, procesos inflamatorios asociados u otros fenómenos como la deposición de hemosiderina alrededor de la zona afectada.

1.4. Descripción de las lesiones

A vista macroscópica, los cavernomas son lesiones bien definidas y aspecto lobulado, que recuerdan a una mora (Figura 1B). A nivel histológico, son canales (cavernas) agrandados y dilatados de células endoteliales, de unos 30 – 50 μm de tamaño. Estas células componen un endotelio fino, débil e inmaduro que muestra predisposición a hemorragias. La sangre que sale acaba en el parénquima nervioso y provoca el deterioro del tejido y los consecuentes síntomas (McCormick et al., 1968).

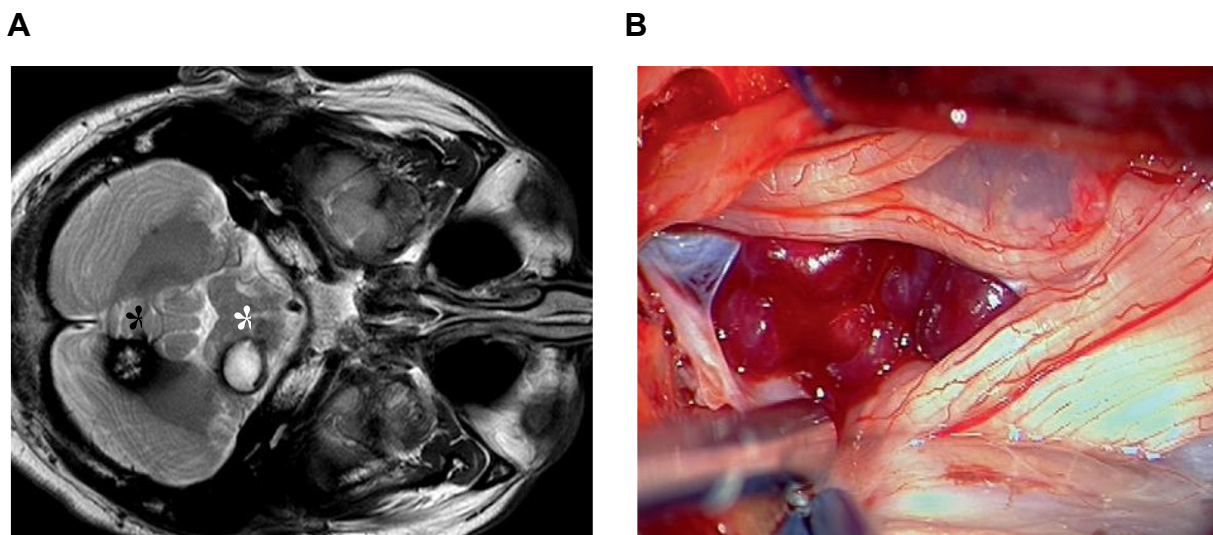


Figura 1. Imágenes de cavernomas humanos. A. Imagen de resonancia magnética pre operatoria de un paciente con múltiples cavernomas (asteriscos). La lesión situada en el bulbo raquídeo presentaba sangrado reciente (blanco); original de Bradáč et al., (2020), con permiso de *Springer Nature*. B. Vista de un cavernoma en la médula espinal durante una intervención quirúrgica; original de Kivelev y Niemelä (2020), con permiso de *Springer Nature*.

Los cavernomas suelen medir entre 0,01 y 1,7 cm. A pesar de que pueden incrementar su tamaño, las lesiones no invaden el tejido nervioso, no tiene comportamiento neoplásico ni invaden otras áreas del cuerpo, a pesar de que los nombres angioma y hemangioma puedan llevar a equívocos (Maraire y Awad 1995).

Estas lesiones son más supratentoriales (65 – 80 %) que infratentoriales (Maraire y Awad 1995). Los supratentoriales más comunes se sitúan en los lóbulos frontal y temporal, mientras que los infratentoriales se suelen localizar en el cerebelo y en el puente troncoencefálico.

1.5. Neurocirugía como tratamiento

Desde que se extirpara por primera vez un cavernoma en 1890 (Bremer y Carson, 1890), se han revisado y comparado seguimientos de pacientes tras una intervención quirúrgica para mejorar sus síntomas y no se encontraron evidencias que demostraran grandes beneficios ni perjuicios (Akers et al., 2017).

La intervención quirúrgica (Dalyai et al., 2011) suele ser favorable en casos clínicos como:

- Ataques epilépticos que no se resuelven con medicación.
- Existencia de declive neurológico progresivo.
- Paciente joven en el que la recuperación sea más rápida.
- Hemorragias clínicamente relevantes que supongan un riesgo para la vida.
- Cavernomas espontáneos, ya que son más fáciles de intervenir.
- Un número y tamaño de lesiones bajo.
- Lesiones accesibles y bien localizadas.

Debe entonces ser considerada por especialistas y valorar riesgos y beneficios, que la calidad de vida del paciente tras la operación sea superior a la esperada en un transcurso natural de la patología y reducir las comorbilidades asociadas a este tipo de intervenciones (agravamiento de las hemorragias, aparición de nuevos déficits neurológicos...) usando alternativas como el tratamiento farmacológico.

2. LAS BASES GENÉTICAS DE LAS CCM FAMILIARES

Como se ha dicho, la cavernomatosis familiar se transmite de forma genética, por mutación de uno de los genes CCM. Los análisis multilocus que se han realizado relacionan a CCM1 con un 40 % de las CCM, a CCM2 con un 20 % y a CCM3 con un 40 % (Craig et al., 1998), aunque son los portadores de mutaciones en CCM3 los que presentan mayor riesgo de hemorragias cerebrales y a edades más tempranas (Denier et al., 2006; Riant et al., 2013). La hipótesis más aceptada que explicaría la patogenia de los cavernomas familiares es la hipótesis de Knudson, o hipótesis de la doble mutación (*Two-hit hypothesis*).

Según esta idea, las lesiones se producirían por la pérdida de función de las proteínas CCM debida, a su vez, a la acumulación de dos mutaciones en la célula endotelial: una primera mutación (*first hit*) en uno de los alelos que afecta a todas las células del individuo, de tipo germinal y que se transmitirá a la herencia; y una segunda mutación (*second hit*), en el otro alelo que afectaría a unas pocas células, de tipo somática y que acabaría por desencadenar la aparición de la enfermedad. Esta hipótesis es compatible con experimentos en los que animales *knockout* ven comprometida su viabilidad embrionaria debido a defectos vasculares, mientras que los que solo tienen un alelo mutado apenas desarrollan lesiones (Plummer et al., 2004). También existen experimentos en los que a animales heterocigotos para *Ccm1* o *Ccm2*, se les mutan genes supresores de tumores, como *Trp53* (McDonald et al., 2011) o *p53* (Plummer et al., 2004), lo que genera mutaciones somáticas e inestabilidad genómica. Los ratones (*Mus musculus*) que tenían esta segunda condición desarrollaban lesiones graves, apoyando la hipótesis *two-hit*.

Además, se ha hablado de un tercer evento desencadenante del desarrollo de lesiones (*third hit*), que intentaría explicar el motivo de que gran parte de los pacientes no presenten síntomas durante años; también serviría para comprender el porqué del incremento en tamaño y severidad de los cavernomas en otras personas. Se barajan desencadenantes no genéticos como la hipoxia (Denier et al., 2006), el estrés oxidativo (Goitre et al., 2017), el microbioma (Tang et al., 2017) o el sistema inmunitario (Shi et al., 2016; Abdelilah-Seyfried et al., 2020).

En los últimos años se han analizado lesiones de pacientes con cavernomatosis en profundidad, y se han encontrado mutaciones somáticas en las células que las conforman, lo que corrobora la hipótesis de la doble mutación. También se han encontrado mutaciones en genes distintos que los CCM que podrían estar contribuyendo a agravar o acelerar el desarrollo de las lesiones, como la sugerida por Ren et al., (2021). En este caso, cuando eliminaban la expresión de *Ccm1*, describían el inicio de las lesiones, pero observaban un empeoramiento en tamaño y gravedad al activar simultáneamente de forma genética, por mutación activadora del gen *PIK3CA*, una vía implicada en la proliferación celular, la vía de PI3K-AKT-mTORC1. Sorprendentemente, otros estudios han relacionado esta misma ruta de señalización con los cavernomas esporádicos ya que en un estudio del 2021, Peyre et al., encontraron que el 39 % de los cavernomas de este tipo presentaban una mutación que mantenía activa la vía iniciada por *Pi3k*, dejando abiertas nuevas posibilidades de estudio y tratamiento en la patología.

En esta línea, Weng et al., (2021) volvieron a encontrar la misma mutación de *PI3K* en otra población de estudio, en un 28 % de los individuos afectados, y añadieron otra, esta vez en el gen *MEKK3* (o *MAP3K3*), en el que encontraban también una mutación somática en el 22 % de los individuos con cavernomas esporádicos y que ocurría en ausencia de mutaciones en los genes CCM clásicos. Veremos la relevancia del hallazgo de esta mutación más adelante.

En los últimos años incluso se ha sugerido un cuarto evento, en el ámbito fisiológico: en experimentos en pez cebra (*Danio rerio*), se demostró que la hemodinámica del flujo de la sangre modificaba la expresión de genes implicados en el desarrollo de los cavernomas y que también la mecanotransducción de señales contribuiría en la enfermedad (Rödel et al., 2019).

Además, en el SNC, el endotelio está especialmente ligado a otros tipos celulares, como astrocitos, microglía y neuronas. Las señales que reciban las endoteliales de las demás células, como VEGF por parte de los astrocitos o señales inflamatorias mediadas por la microglía, podrían modificar la biología de la propia célula endotelial y agravar el transcurso de las lesiones.

Las proteínas que codifican los genes CCM muestran estructuras y dominios funcionales diferentes, y no comparten ninguna secuencia homóloga. Por este motivo, cada una puede interactuar con proteínas dispares y afectar a un amplio abanico de funciones y rutas celulares.

Sin embargo, esto no explicaría que la pérdida de función de alguno de ellos lleve a desarrollar la misma enfermedad. El motivo de que los tres genes lleguen a producir las mismas lesiones parece deberse a que las proteínas CCM1, CCM2 y CCM3 pueden formar un complejo (CSC; *CCM signaling complex*) para realizar sus funciones; el cumplimiento de estas se ve afectado cuando alguna de ellas está mutada (Yadla et al., 2010).

2.1. CCM1

El gen CCM1 (o *KRIT1*, *krev interaction trapped 1*), localizado en el cromosoma 7 (7q21-22), codifica una proteína de 736 aminoácidos con diferentes dominios que le permite interactuar con múltiples proteínas, lo que le permite estar implicada en diferentes funciones celulares. Dadas estas interacciones, la proteína se ha ubicado en la membrana celular (Béraud-Dufour et al., 2007), junto a los microtúbulos (Gunel et al., 2002) y en las uniones entre células (Glading et al., 2007; Glading y Ginsberg, 2010). También en vesículas intracelulares y el núcleo (Marzo et al., 2014).

Una de las relaciones más relevantes de CCM1 es la que mantiene con las otras proteínas CCM. CCM1 interactúa directamente con CCM2 gracias a sus dominios NPxF. Dado que ambas muestran una expresión espaciotemporal similar, se cree que están íntimamente ligadas (Seker et al., 2006). Se ha llegado a ver que incluso CCM2 es capaz de regular la localización

celular de CCM1 (Zawistowski et al., 2005). Sin embargo, no se ha encontrado ninguna interacción directa entre las estructuras proteicas de CCM1 y CCM3. En realidad es CCM2 la que interacciona con ambas y que funciona de nexo entre ellas, la que permite formar el complejo CSC.

Además de con sus compañeras del complejo CSC, se ha demostrado que CCM1 se relaciona con proteínas relevantes en la regulación de la estructura de la célula endotelial. Por ejemplo, interacciona con Rap1 (Glading et al., 2007) y HEG1, contribuyendo a la estabilidad de las uniones entre las células endoteliales. También se asocia con proteínas como VE-Cadherina y β -catenina, influyendo en la estabilidad en las uniones entre células (Glading y Ginsberg, 2010).

CCM1 no solo actúa en la regulación del endotelio vascular, sino que también es importante durante el desarrollo vascular. Los ratones *Ccm1 knockout* mueren en la gestación debido a defectos cardiacos y vasos malformados (Whitehead et al., 2004), manifestando su papel en la vasculogénesis y desarrollo embrionario. Cuando la mutación es postnatal, los ratones *knockout* para *Ccm1* presentan lesiones muy similares a las humanas, con cavernas de vasos dilatados, con paredes finas y débiles; también llegaban a tener depósitos de hemosiderina e inflamación (Mleynek et al., 2014).

2.2. CCM2

El gen CCM2 (o OSM, *Osmosensing Scaffold for MEKK3*), que se ubica en el cromosoma 7p13, codifica una proteína de 444 aminoácidos con diversos dominios de interacción.

La proteína CCM2 funciona como elemento central en el complejo formado por las tres proteínas CCM al poseer un dominio que le permite interaccionar con CCM1 y otro con CCM3. Si CCM2 se elimina, CCM1 y CCM3 no interaccionan, lo que pone de manifiesto su papel como proteína adaptadora o andamio.

Dada su estrecha relación con CCM1, a CCM2 se le puede ubicar asociada a esta en el núcleo, el citoplasma o en las uniones entre células (Zhang et al., 2007).

Una de las interacciones más interesantes que realiza CCM2 es con la quinasa MEKK3, que ha cobrado mucha importancia en la explicación molecular a la patogénesis de las CCM (Fisher et al., 2015; Zhou et al., 2016; Choi et al., 2018). En este caso, CCM2 es necesaria para prevenir la sobreactivación de la ruta de señalización celular que inicia MEKK3, que conlleva la activación de ERK5 como veremos más adelante. También regulando a MEKK3, pero a través de MEK3 y p38, modula la morfología celular en respuesta a choques hiperosmóticos, lo que conlleva modificación en la dinámica de membrana, del citoesqueleto y de las uniones entre células (Uhlik et al., 2003).

Además de las funciones que desempeña a nivel molecular, CCM2 resulta ser de relevancia en el desarrollo del sistema vascular. Como los ratones deficientes en *Ccm1*, la eliminación total de *Ccm2* en el periodo embrionario es letal (Boulday et al., 2009); al inactivar el gen después del nacimiento (Boulday et al., 2011), aparecían las típicas lesiones cavernosas en el cerebelo y en la retina de los animales, además de los vasos de las meninges dilatados.

2.3. CCM3

El gen CCM3 (o PDCD10, *Programmed Cell Death 10; TFAR15, TF-1 Cell Apoptosis-Related Protein 15*), localizado en el cromosoma 3q26.1, codifica una proteína de 212 aminoácidos. Esta proteína se caracteriza por tener dos dominios proteicos diferentes (Figura 2):

o Dominio de dimerización: dominio más próximo al extremo N-terminal que permite a dos proteínas CCM3 crear un homodímero (Li et al., 2010); además, le sirve para interaccionar con otras proteínas de la familia de quinasas GCKIII (STK24, STK25 y STK26) y formar heterodímeros (Fidalgo et al., 2010; Ceccarelli et al., 2011).

o Dominio homólogo a FAT (*focal adhesion targeting*): situado en el extremo C-terminal de la proteína, le permite establecer interacción con CCM2 y cumplir funciones junto a ella y CCM1. También le sirve para establecer unión con proteínas como la estriatina y así, poder formar parte de otro complejo proteico, el STRIPAK (*striatin-interacting phosphatase and kinase complex*) (Goudreault et al., 2009).

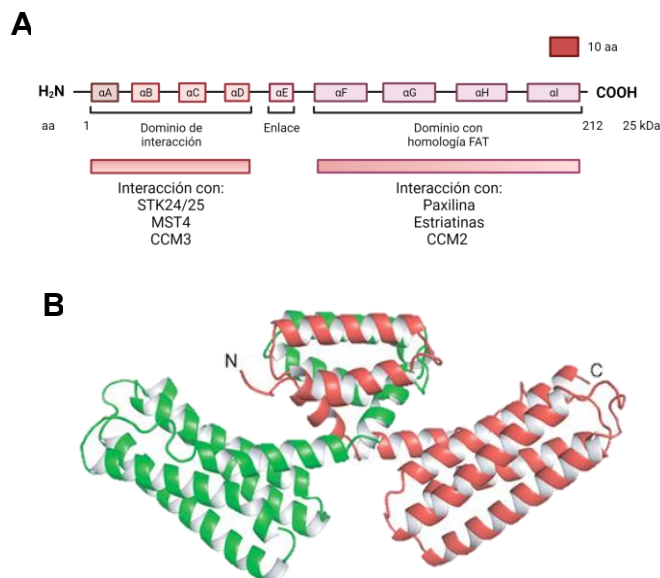


Figura 2. Dominios de interacción y estructura tridimensional de CCM3. **A.** Representación esquemática de los dominios de CCM3, que le permiten interaccionar con proteínas como las GCKIII o CCM2 y cumplir sus funciones celulares; creado con BioRender.com y basado en Valentino et al., (2020) con permiso de contenido abierto de Elsevier. **B.** Estructura tridimensional de CCM3 en su forma homodimérica (verde y rojo); original de Li et al., 2010, con permiso de contenido abierto de Elsevier.

Las interacciones de CCM3 con otras proteínas le permite ser ubicada en varios compartimentos celulares y participar en diversas funciones; por ejemplo, la unión entre CCM2 y CCM3 es importante para estabilizar ambas proteínas y para un correcto funcionamiento endotelial (Draheim et al., 2015).

Sin embargo, CCM3 parece ubicarse preferentemente formando parte del complejo STRIPAK (Goudreault et al., 2009). De hecho, no solo forma parte de él, sino que asegura su integridad al estabilizar a las quinasas GCKIII, que forman parte también del complejo. En este caso, evita que sean marcadas con ubiquitina y garantiza que el conjunto realice su papel (Fidalgo et al., 2010).

Las funciones en las que está implicada varían entre regulación de vías de señalización, control de orgánulos o de membranas celulares, entre otras, demostrando su versatilidad funcional.

Una de las interacciones más importantes que realiza junto a las quinasas GCKIII es unirse a GM130, una proteína ubicada en la cara *cis* del aparato de Golgi (Fidalgo et al., 2010), que funciona como un anclaje a CCM3. Además de ser capaz de residir en este orgánulo, CCM3 es

indispensable en la polarización y orientación que toma el aparato de Golgi para que ocurra una correcta migración celular, demostrado tanto *in vitro* (Fidalgo et al., 2010) como *in vivo* (Louvi et al., 2014).

Otro relevante rol que se le ha descubierto a CCM3 es la gestión de endomembranas celulares. En un trabajo que usaba como modelo de exocitosis a los neutrófilos (Zhang et al., 2013), la deficiencia en la expresión de CCM3 o la proteína STK24 (de la familia GCKIII y que forma parte del complejo STRIPAK), disparaba descontroladamente la exocitosis. Otro estudio relacionaba este exceso de acción exocítica con la alta secreción de ANGTP-2 al espacio extracelular de células endoteliales al eliminar CCM3, lo cual contribuía en gran parte a la destrucción de las uniones entre células (Zhou et al., 2016). También se han mostrado alteraciones en la endocitosis de *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) cuando se eliminan CCM3 o STK24 y en el manejo y reciclaje de la membrana plasmática (Lant et al., 2015; Pal et al., 2017) mediante la acción de la proteína CDC42.

La importancia de CCM3 en el desarrollo de estructuras cardíacas y vasculares durante el periodo embrionario se vio reflejada en estudios con pez cebra (*D. rerio*) (Yoruk et al., 2012, Zheng et al., 2010), en los que se observaban severas malformaciones en el corazón de los animales y que conducían a su muerte.

La inactivación postnatal temprana en ratones conlleva a desarrollar malformaciones cavernosas en el encéfalo, graves y múltiples, que derivan en la muerte de los animales a los pocos días (Zhou et al., 2015; Zhou et al., 2016, Zhou et al., 2021); existe la opción de inducir la mutación en animales adultos o con diferentes dosis del inductor, que desarrollan cavernomas más leves y llega a ser un modelo crónico de la enfermedad (Malinverno et al., 2019).

En los modelos de ratón deficientes para CCM3, no solo se han observado lesiones cavernosas en órganos y estructuras relacionadas con el sistema nervioso, como el encéfalo o la retina; también se han observado lesiones del mismo tipo en órganos como el bazo (Zhou et al., 2021) o en testículos (en este caso, mutantes para CCM1; Ren et al., 2021).

2.4. OTROS GENES

A pesar de que la mutación en alguno de los genes *Ccm* explica la base genética de muchos casos clínicos de malformaciones cavernosas cerebrales, aún existen otros casos en los que se desconoce si existen más genes que puedan originar la enfermedad o empeorar la evolución de las lesiones; de hecho, en un 22 % de los casos esporádicos no se detectan mutaciones en ninguno de los 3 genes CCM (Haasdijk et al., 2012). Además, seguir investigando qué otras proteínas o vías celulares pueden regular y modificar las proteínas CCM permite buscar nuevas estrategias de tratamiento farmacológico.

El grupo de Laviña et al., vinculó en 2018 una GTPasa llamada CDC42 (*cell division cycle 42*) a la aparición de malformaciones en los vasos de la retina durante el desarrollo embrionario de ratones; cuando eliminaban en células endoteliales el gen que la codificaba, la migración de las células era defectiva. Las células mostraban incapacidad para formar filopodios y para presentar polaridad basal-apical; en sus uniones entre células, aunque no desaparecían del todo proteínas como la VE-Cadherina y la β -catenina, sí que se reducía su presencia en la membrana.

En 2019 se publicó otro estudio (Castro et al., 2019), centrado esta vez en el efecto de la eliminación de *Cdc42* de células endoteliales en el encéfalo de ratones. Estos ratones presentaban lesiones muy similares a las que presentaban ratones sin CCM3 o CCM1 en el cerebelo. Además, observaban que la vía de señalización MEKK3-KLF4 estaba también sobreactivada (ver apartado 3.3); la expresión de *Klf4* era más alta que en animales control y cuando eliminaban al mismo tiempo la expresión de *Klf4*, lograban reducir el número y tamaño de las lesiones.

La relación que tiene CDC42 con los genes CCM ya se había abordado; en un trabajo sobre el papel de CCM3 y el complejo STRIPAK en el reciclaje de membrana y la endocitosis, se sugería que la actividad de cdc42 era promovida por CCM3 (Lant et al., 2015).

3. ALTERACIONES CELULARES ASOCIADAS A LAS CCM

Durante años, se han llevado a cabo múltiples investigaciones para determinar cuáles son las bases moleculares y celulares que subyacen a las malformaciones, con el objetivo de obtener una estrategia farmacológica exitosa y que las malformaciones puedan ser tratadas con fármacos y evitar intervenciones quirúrgicas.

El endotelio de los vasos sanguíneos, que es la monocapa que componen las células endoteliales unidas entre sí para formar tubos, tiene por principal desempeño regular la permeabilidad de la pared del vaso sanguíneo, además de funciones secretoras, sintéticas, metabólicas e inmunológicas. Al observar las lesiones de los pacientes, se ha detallado que los vasos sanguíneos afectados muestran un endotelio alterado, fino, débil e inmaduro.

Observando las características que mostraba el endotelio de los cavernomas, como alta permeabilidad (Mikati et al., 2015), fugas de sangre, adquisición de morfología mesenquimal (Maddaluno et al., 2013) ... las investigaciones se han centrado en estudiar la contribución de las proteínas CCM en rutas de migración, dinámicas de membrana, uniones entre células o angiogénesis, sospechosas de poder estar contribuyendo al desarrollo de lesiones.

3.1. Vía de RhoA-ROCK

En una célula endotelial normal, los anclajes entre células y entre estas y la matriz extracelular son llevados a cabo por moléculas de adhesión como las cadherinas y las integrinas, entre otros. Todas estas moléculas deben interactuar entre ellas para garantizar que el funcionamiento y desarrollo del tejido endotelial sea exitoso.

Sin embargo, se sabe que las malformaciones cavernosas se caracterizan por unas uniones entre células endoteliales alteradas e inestables. Una de las rutas celulares que controla la estabilidad de estas uniones es la ruta RhoA-ROCK, en la que también colaboran las proteínas CCM.

RhoA pertenece a la familia de GTPasas Rho, junto Cdc42 y Rac1; son conocidas por su actividad reguladora de la dinámica del citoesqueleto de actina y en la exocitosis (Ridley 2006).

Cuando la ruta está activa, ROCK (*Rho-associated kinase*), ubicado *downstream a* RhoA, es capaz de fosforilar a la MLC (*myosin light chain*) y desencadenar una serie de eventos, como la formación de fibras de estrés, de filamentos de actina y afectar la integridad de las uniones entre células. La activación suele ocurrir cuando es necesaria la migración endotelial, la proliferación o la formación de tubos (van Nieuw Amerongen, et al., 2003).

Varios estudios han demostrado que el complejo que forman las proteínas CCM controla esta ruta (Whitehead et al., 2009; Stockton et al., 2010; Lisowska et al., 2018) (Figura 3). CCM1 es capaz de asociarse a proteínas que forman parte de las uniones entre células, como β -catenina, para estabilizarlas; con esto evita la acumulación de RhoA y la hiperactividad de ROCK. CCM2 inhibe esta ruta al promover la degradación de RhoA y CCM3 utiliza proteínas con las que interacciona habitualmente, como la quinasa STK25 o Cdc42, para regular las uniones entre células en funciones de migración y adhesión celular.

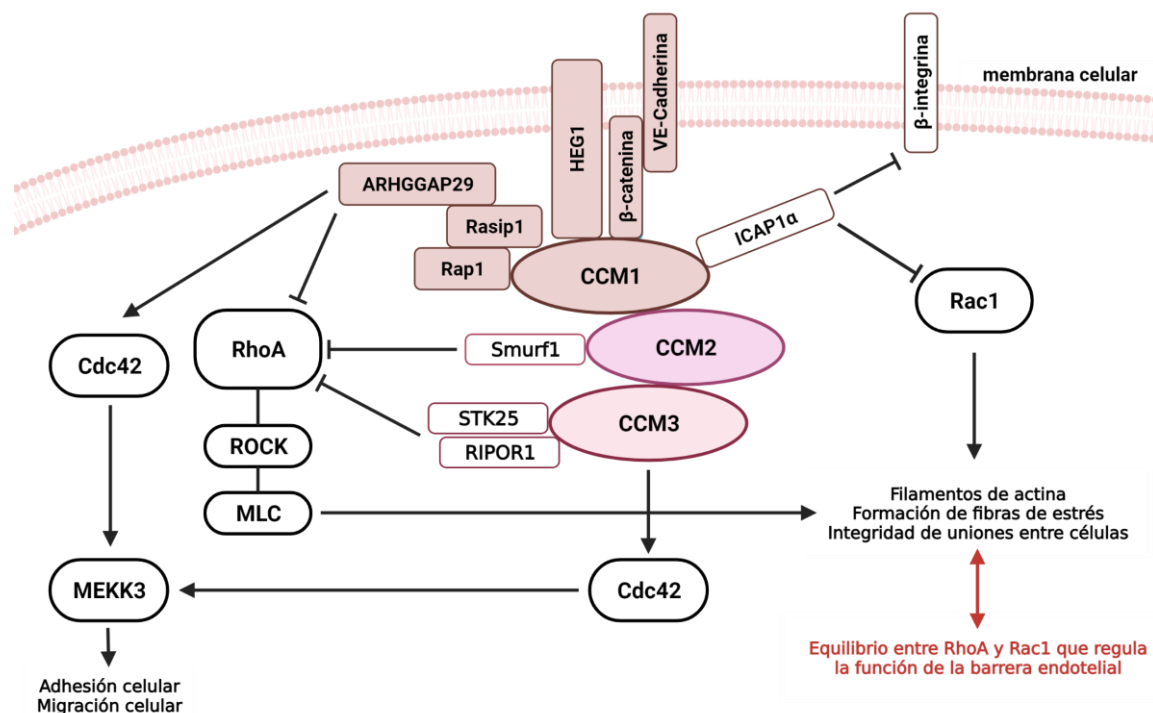


Figura 3. Red de interacciones de CCM1, CCM2 y CCM3 en la ruta de la familia de las Rho GTPasas, fundamental en la regulación del citoesqueleto y la integridad de la membrana celular. El complejo formado por las proteínas CCM, ubicado en la membrana celular gracias a que CCM1 puede unirse a β-catenina y HEG1, es necesario para inhibir la ruta de RhoA y su efector ROCK. A través de diferentes proteínas, las tres CCM se encargan de regular su actividad y evitar que las células endoteliales muestren un exceso de fibras de estrés y una desregulación de las uniones entre las células, que contribuyen al desarrollo de las lesiones de los cavernomas. Ilustración creada con BioRender.com y basada en Riolo et al., (2021) y modificado con permiso de contenido abierto de MDPI.

Sabiendo que las proteínas CCM participan en la regulación del citoesqueleto a través de esta ruta, las células con mutaciones en sus genes presentarán alta actividad en esta vía de señalización. Esto se refleja en el comportamiento del citoesqueleto, como la acumulación de fibras de estrés.

Las fibras de estrés son haces de microfilamentos de actina que aparecen en células no musculares como células endoteliales, epiteliales y miofibroblastos. Por lo general, determinan la forma y la polaridad en las células animales y tienen gran relevancia en procesos de adhesión celular, mecanotransducción, morfogénesis y migración celular (Tojkander et al., 2012). Son naturalmente abundantes en células endoteliales, ya que aparecen como respuesta a la presión hidrostática y a la tensión que soportan al recubrir las paredes de los vasos sanguíneos. Sin embargo, si existe un exceso de fibras de estrés, la permeabilidad del endotelio aumenta y se alteran las uniones entre las células.

La implicación de CCM1, CCM2 y CCM3 en la acumulación de estas fibras se hizo patente al ver que en los modelos celulares endoteliales en los que se elimina alguna de las proteínas, aparecían fibras de estrés (Zheng et al. 2010; Chan et al., 2011; Lisowska et al., 2018; Suryavanshi et al., 2018).

En los modelos celulares sin alguna de las proteínas CCM, al utilizar fármacos que inhibían la acción de ROCK, las fibras de estrés disminuían y se conseguía rescatar el fenotipo (Borikova et al., 2010). También ocurría en modelos murinos cuando se usaba fasudil (McDonald et al., 2012; Shenkar et al., 2017), un inhibidor específico de ROCK: las lesiones vasculares de estos

animales disminuían su gravedad y su supervivencia se incrementaba. Otros trabajos también se han centrado en utilizar inhibidores de esta vía para detener la progresión de la enfermedad, como el de McKerracher et al., (2020), en el que aplicar el inhibidor de ROCK BA-1049 se reducían las hemorragias y el volumen de los cavernomas.

Actualmente se está llevando a cabo uno de los pocos ensayos clínicos para el tratamiento de las malformaciones cavernosas utilizando precisamente un inhibidor de ROCK de la familia de las estatinas, la atorvastatina (Polster et al., 2019) que se encuentra en la Fase II (Identificador <https://clinicaltrials.gov/: NCT02603328>).

Otro de los cambios que muestran las células endoteliales sin proteínas CCM está relacionado con su capacidad angiogénica. Para estudiar el mecanismo subyacente a este proceso, se utilizan ensayos *in vitro* como la formación de túbulos en una matriz artificial con una composición que imite a la que se encontraría en una matriz extracelular natural. Sembradas en subconfluencia, las células endoteliales son inducidas a diferenciarse y sufren modificaciones en su tamaño y morfología. Este proceso requiere la participación del citoesqueleto, los receptores de membrana, las moléculas de adhesión y la matriz extracelular, bajo la coordinación de diferentes rutas de señalización, incluida la vía de RhoA-ROCK. Como resultado, se forman sobre esta matriz artificial estructuras similares a vasos que convergen en nudos, originando una especie de red o malla. Las células endoteliales normales crean túbulos finos y alargados, huecos en el centro que recuerdan al lumen que forman en los vasos sanguíneos; los túbulos se encuentran en intersecciones refinadas y sencillas.

En un trabajo de Borikova et al., del 2010, usaban células que no expresaban los genes *Ccm* y las colocaban sobre Matrigel®, lo cual otros trabajos han probado también (He et al. 2010; Schleider et al., 2011). Ninguno de estos tipos celulares conseguía formar túbulos finos, bien estructurados; los túbulos generados mostraban menos longitud y no conseguían formar redes entre ellos, comparándolos con cultivos de células normales. Cuando añadían el inhibidor de ROCK Y-27632 o las células tampoco expresaban ROCK2 simultáneamente a las CCM, se rescataban parcialmente la capacidad de formar túbulos; por lo que la ruta RhoA-ROCK sería solo en parte responsable de la incapacidad de las células endoteliales de formar túbulos en CCM.

3.2. Integridad de las uniones entre células

Una de las primeras alteraciones que se describió en cavernomas cerebrales fue la de la hiperpermeabilidad de las células endoteliales que los componen (Figura 4). Entre las uniones entre células características de las células endoteliales, destacan las uniones adherentes (*adherens junctions*). Las uniones adherentes que se encuentran entre las células endoteliales son fundamentales para controlar la permeabilidad de los vasos sanguíneos, su mantenimiento, la generación de vasos nuevos, inhibición del crecimiento por contacto o polaridad celular. Para funciones tan dinámicas, la estructura y las proteínas que las forman deben ser también dinámicas y plásticas.

La organización estructural de estas uniones se debe en gran parte a la VE-Cadherina (CDH5 o CD144), una proteína de adhesión transmembrana que se expresa específicamente en células endoteliales.

En su dominio intracelular se une a diversos tipos de proteínas; entre ellas el VEGFR2, participando en su regulación. Cuando este receptor está unido a la VE-Cadherina, se retiene en la membrana celular y puede ser desfosforilado, desactivando la ruta de señalización (Lampugnani et al., 2006).

Además, se encuentra asociada frecuentemente con CCM1 (y al complejo que forma con las otras proteínas CCM, por tanto) (Glading y Ginsberg, 2010). La estabilización de esta

cadherina se ha demostrado fuertemente afectada por las CCM, ya que en los modelos murinos que carecían de algún gen *Ccm* (Boulday et al., 2011; Glading et al., 2007; Bravi et al., 2015) las uniones entre células presentaban baja presencia de VE-cadherina en la membrana celular, y la que había mostraba un patrón discontinuo e irregular a lo largo de la superficie celular.

Existen evidencias de que otra de las moléculas que se puede unir a VE-Cadherina es la β -catenina, que es una de las moléculas más estudiadas de la ruta de señalización de Wnt (Clevers y Nusse, 2012).

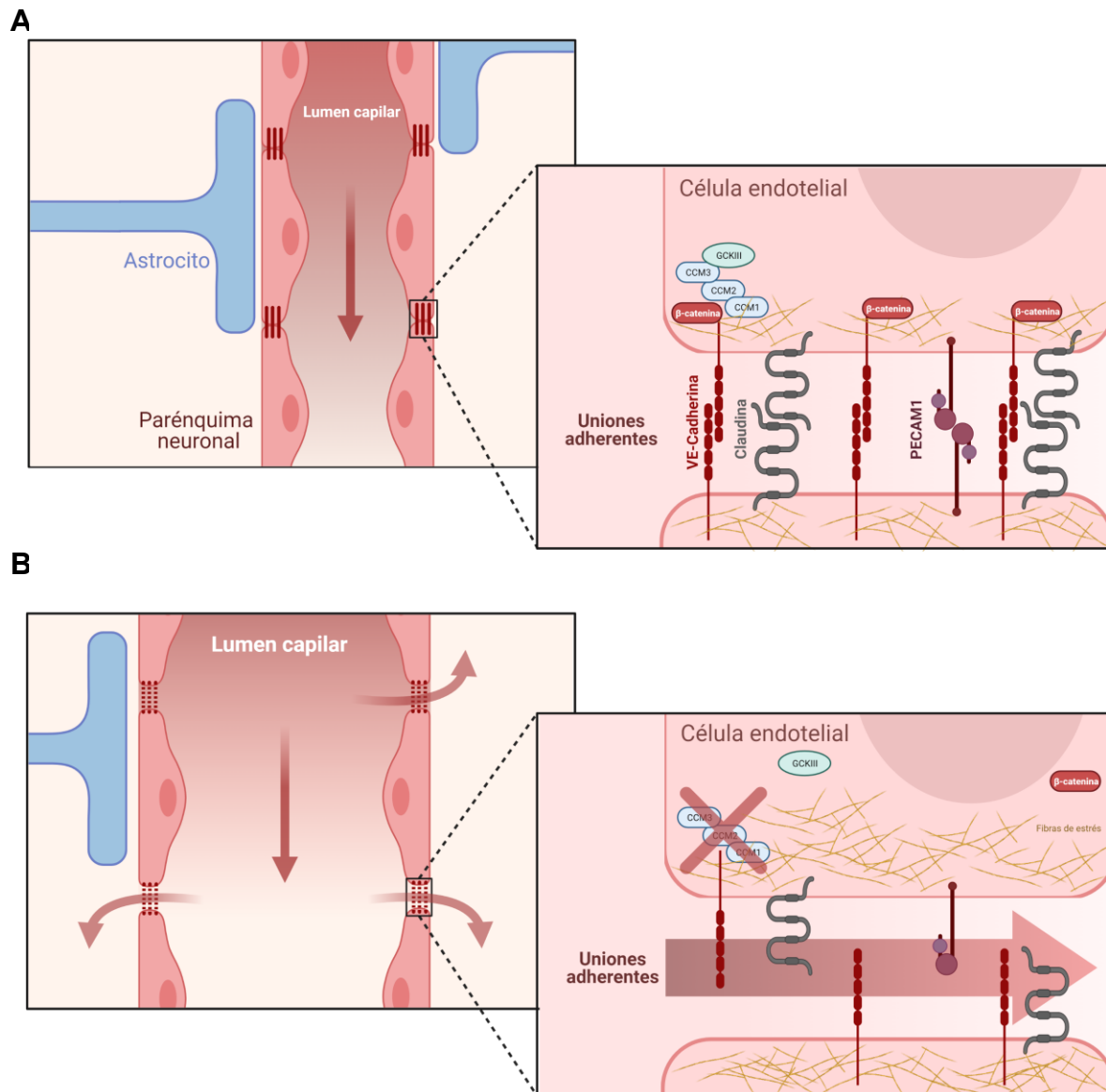


Figura 4. Las células endoteliales sin genes CCM presentan alta permeabilidad y uniones adherentes entre células débiles. **A.** Las uniones mediadas por la VE-Cadherina y otras moléculas de adhesión, establecen y mantienen la integridad de la monocapa endotelial que cubre el interior de los vasos sanguíneos, evitando que la sangre salga de los capilares. **B.** Cuando no se expresa alguno de los genes CCM, las uniones que mantenían la continuidad de la barrera se vuelven débiles y permeables al paso de la sangre, ya que se reduce la presencia de VE-Cadherina, β -catenina y de otros componentes del citoesqueleto. Ilustración propia creada con BioRender.com.

En condiciones normales, la VE-Cadherina es capaz de retener a la β -catenina en la membrana. Sin embargo, cuando existe una baja cantidad de VE-Cadherina en la membrana endotelial, la β -catenina puede translocarse al núcleo, funcionar como un factor de transcripción y regular la expresión de genes relacionados con la migración y proliferación (Dejana, 2010).

Conocidos los efectos sobre la VE-Cadherina cuando se silencian o eliminan las proteínas CCM y dada la relevancia de su función reguladora sobre la actividad de la β -catenina, no es de extrañar que la cantidad de la catenina en la membrana sea baja en los modelos de la enfermedad (Glading et al., 2007; Glading y Ginsberg, 2010; Bravi et al., 2015) y que la que pueda existir presente un patrón desorganizado.

Conociendo estas alteraciones, se propuso utilizar un fármaco inhibidor de la capacidad transcripcional de la β -catenina, el sulindac. Bravi et al., (2015) probaron esta droga en ratones *knockout* para *ccm3* y observaron que, tras su aplicación, las uniones adherentes de las células endoteliales lograban reorganizar su estructura, aumentaba la presencia de VE-Cadherina en la membrana y que las lesiones cavernosas reducían su tamaño y gravedad.

3.3. Eje MEKK3-MEK5-ERK5-KLF2/4

En el 2015, Zhou et al., describieron un modelo de estudio del desarrollo cardiaco embrionario en pez cebra y ratón en el que eliminaban la expresión de *Ccm1*, *Ccm2* y *Ccm3*. Los animales mostraban un desarrollo defectivo que conducía a la muerte del embrión. Pudieron hacer análisis de expresión génica y observaron que las células endoteliales sin alguna CCM presentaban un aumento en la expresión de dos factores de transcripción, *Klf2* y *Klf4*, entre otros, y varios de sus genes diana también estaban desregulados, como *Adamts4*, *Bmp6* o *Tsp1*.

Adamts4 codifica una proteasa que degrada componentes de la matriz extracelular (Zhou et al., 2015); *Bmp6* es un gen cuyo producto participa en la transición endotelio mesénquima (Cuttano et al., 2016); y *Tsp1* es un inhibidor angiogénico que participa en la estabilización de las uniones entre células (Lopez-Ramirez et al., 2017). La suma de todas estas desregulaciones llevaría a originar las lesiones cavernosas.

Klf4 ya había sido considerado de gran importancia en la angiogénesis y maduración de los vasos (Chiplunkar et al., 2013) y estudios posteriores (Sangwung et al., 2017) lo apoyaban. Además, había aparecido asociado a la patología de los cavernomas previamente, cuando Maddaluno et al., estudiaron el proceso de transición endotelio-mesénquima (EndMT) que experimentaban las células sin CCM1. *Klf2* también había mostrado relevancia en la biología celular de células endoteliales (Dekker et al., 2006).

Cuando Zhou et al., se plantearon cuál podría ser el nexo entre las proteínas CCM y estos genes, sugirieron a MEKK3.

MEKK3, codificada por el gen MAP3K3, es una serina/treonina proteína quinasa involucrada en la activación de vías en las que participan MAPKs (*Mitogen Activated Protein Kinases*) y que colabora en funciones como la activación de respuesta inmune o la inducción de la muerte celular.

No solo se sabía que MEKK3 interaccionaba con CCM2 (Uhlik et al., 2003; Fisher et al. 2015), sino que uno de sus efectores, ERK5, era conocido por activar *Klf4* y *Klf2* (Ohnesorge et al., 2010; Komaravolu et al., 2015).

Procedieron a estudiar *in vivo* e *in vitro* esta ruta, y confirmaron que existía una alta fosforilación de ERK5 y por tanto, una sobreactivación. Además, cuando a peces cebra les eliminaban la expresión de MEKK3 o de *Klf2* simultáneamente con un gen CCM, se recuperaba el fenotipo de animales control.

Desde entonces, han sido varios los trabajos los que han apoyado estos resultados (Zhou et al., 2016; Cuttano et al., 2016; Choi et al., 2018) (Figura 5) y que han señalado a la activación de este eje como uno de los eventos más importantes en el desarrollo de los cavernomas.

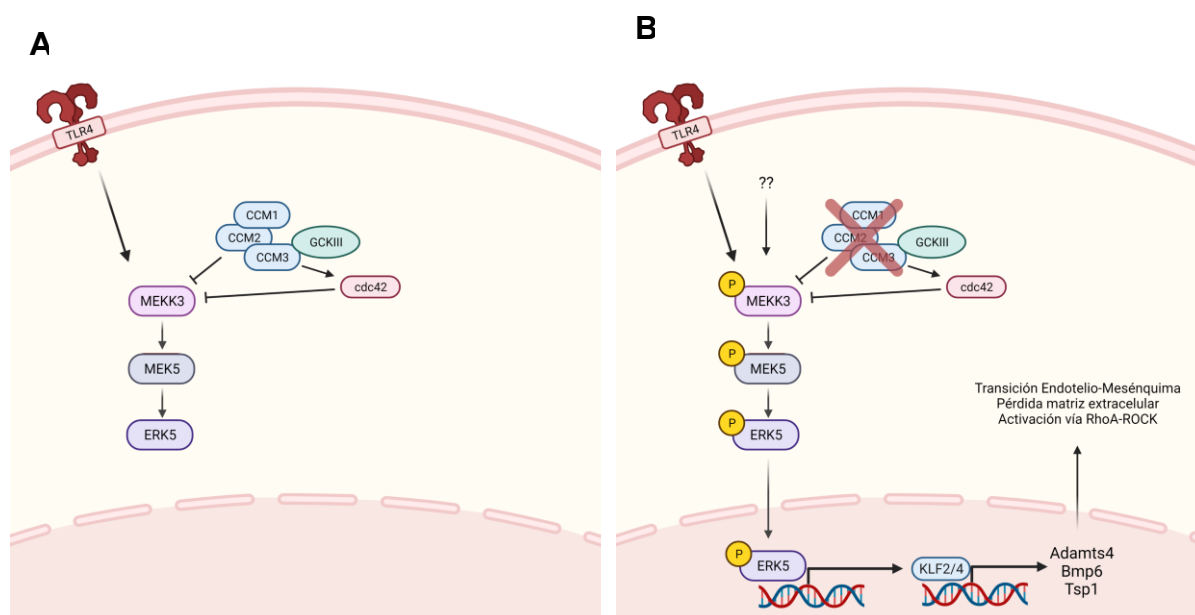


Figura 5. La vía de señalización MEKK3-ERK5-KLF2/4. A. La vía en una célula endotelial normal. B. La falta de alguna de las proteínas CCM, de CDC42 o la activación del TLR4 pueden desencadenar la hiperactivación de la ruta y que se sobre expresen factores de transcripción como KLF2/4 y se produzcan desregulaciones en la biología de la célula endotelial. Ilustración propia creada con BioRender.com.

Una vez conocida esta desregulación, se procedió a estudiar el efecto que un inhibidor de MEKK3, el Ponatinib, podía tener sobre las lesiones causadas por CCM (Choi et al., 2018). Usando este fármaco no solo se impedía que los animales mutados para CCM1, CCM2 o CCM3 desarrollaran lesiones, sino que también se conseguía reducir el tamaño y gravedad de las existentes.

Posteriores trabajos han querido saber si existe alguna otra forma de estimular o acelerar esta vía además de la falta de alguna de las proteínas CCM. Según Castro et al., (2019), una GTPasa que puede estar inhibiendo esta ruta es CDC42. Comprobaron que ratones deficientes en CDC42 presentaban una alta expresión de *klf4* y desarrollaban malformaciones cavernosas (ver apartado 2.4).

En esta línea, también se ha propuesto el TLR4 (*toll-like receptor 4*) como elemento *upstream* a MEKK3 (Tang et al 2017).

El TLR4 es un receptor que inicia la activación de la ruta de señalización MEKK3-KLF2/4 cuando se le une su ligando, LPS (*lipopolysaccharide*) (Kim et al., 2007); el LPS es componente mayoritario de la membrana externa de las bacterias Gram negativas, que activa la respuesta inmune a través de receptores como el TLR4 para inducir la liberación de citoquinas proinflamatorias y luchar contra una infección.

En el trabajo de Tang et al., demostraron que animales *knockout* para CCM1 y criados en ambiente no SPF (*specific pathogen free*) o inyectados con LPS para estimular el sistema inmune, desarrollaban lesiones de mayor gravedad y que aceleraban la progresión de la

enfermedad. Usar un fármaco antagonista de TLR4 o el uso de antibióticos conseguía atenuar la gravedad de las lesiones.

Este nexo entre el deterioro de las lesiones, que están inicialmente producidas por un defecto genético, a causa de un agente del ambiente es un ejemplo que refuerza la teoría del tercer *hit* y que sugiere una relación entre el desarrollo de los cavernomas y el microbioma de los pacientes.

3.4. Capacidad migratoria y dispersión del aparato de Golgi

Aunque CCM3 tiene la capacidad de funcionar asociada a las proteínas CCM, también utiliza a otras para interactuar, como el complejo STRIPAK o las quinzasas de la familia de las GCKIII. Con uno de los miembros de esta familia, STK25, colabora en la orientación de la célula y en el control de dispersión que presenta el aparato de Golgi. Fidalgo et al., (2010) demostraron que células que no expresaban CCM3 tenían menor capacidad de migración y lo relacionaban directamente con una incapacidad de reubicar el aparato de Golgi y los centrosomas; las células sin CCM3 mostraban un aparato de Golgi más disperso y, si se volvía a expresar, el orgánulo conseguía recuperar su funcionalidad. No solo se demostró que CCM3 era imprescindible para esta función, sino que su acción ocurría mediante la interacción con STK25 y la fosforilación de la proteína 14-3-3 ζ (Preisinger et al., 2004).

3.5. Regulación del VEGFR2

Los receptores tirosina quinasa son una familia de receptores de membrana que tienen la capacidad de fosforilar residuos tirosina de otras proteínas y los suyos propios. Dicha fosforilación modula la actividad enzimática y crea sitios de reclutamiento, haciendo posible desencadenar cascadas de señalización celular. Participan en diversas funciones, como proliferación, migración, diferenciación o metabolismo celular.

La estructura de estos receptores se basa en un dominio extracelular al que se une el ligando; un dominio transmembrana; y el dominio intracelular, donde se localiza el dominio tirosina quinasa, donde se producen la mayoría de las interacciones con otras proteínas y donde se unen muchos de los inhibidores de su actividad enzimática.

En ausencia de su ligando, los receptores tirosina quinasa existen en forma monomérica y no están fosforilados en su dominio quinasa; es cuando está presente el ligando cuando se induce la dimerización del receptor y su activación. Es entonces cuando los dominios quinasa intracelulares se autofosforilan y adquieren la capacidad de fosforilar a otras proteínas y usar sus residuos fosforilados para que proteínas adaptadoras puedan acoplarseles.

Para cesar su actividad y terminar la señal transducida mediante las rutas de señalización, estos receptores pueden ser endocitados desde la membrana plasmática, ser marcados para su degradación mediante proteólisis o actuar las llamadas proteína tirosina fosfatasas, que se encargan de eliminar los residuos fosforilados del receptor (Hubbard y Till, 2000).

La familia de los receptores tirosina quinasa incluye el receptor de insulina y los receptores de factores de crecimiento como el factor de crecimiento epidérmico (EGF; *epidermic growth factor*), el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF; *platelet-derived growth factor*), el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF; *fibroblast growth factor*) y el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF, *vascular endothelial growth factor*).

Las células endoteliales son fundamentales en la formación de nuevos vasos durante el proceso de angiogénesis, en el que deben migrar, proliferar y diferenciarse. El factor de

crecimiento vascular endotelial (VEGF) y su receptor tienen un importante impacto en este fenómeno.

Después de la unión del ligando al receptor, se activan varias rutas de transducción de señales (Figura 6).

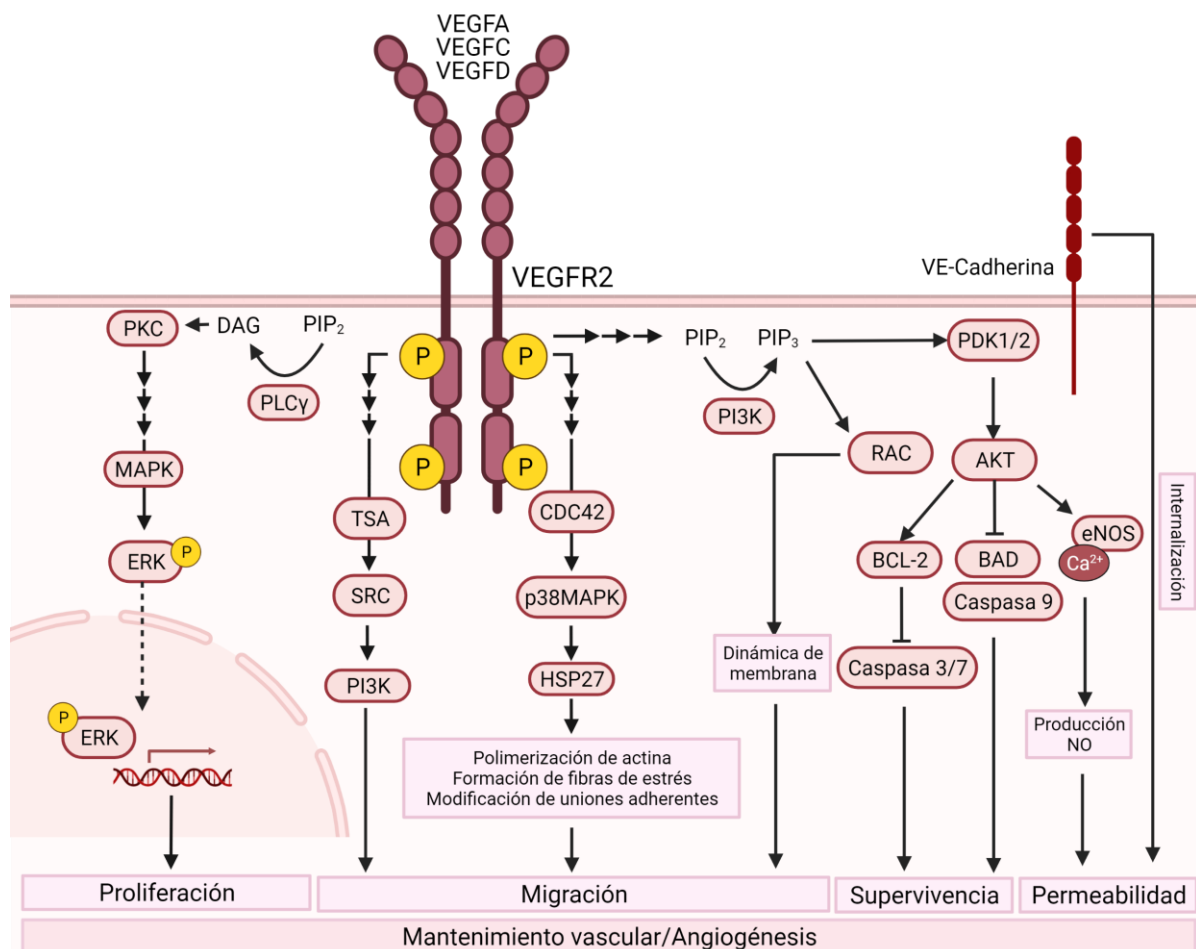


Figura 6. Rutas de transducción de señales que se originan al unirse el VEGF a VEGFR2 de células endoteliales. Mediante ellas, se controlan procesos como la migración, la regulación de los componentes del citoesqueleto o la proliferación. También se enseñan interacciones con otras proteínas importantes en la estabilidad endotelial como la VE-Cadherina. Ilustración creada con BioREnder.com, basada en Madu et al., (2020) y modificada con permiso de contenido abierto de *Ivyspring International Publisher*.

En 2010, He et al., lograron estudiar la relación entre el receptor VEGFR2 y las proteínas CCM, llevando a cabo experimentos con ratones en periodo embrionario. En este caso, comprobaron que en respuesta a VEGF, CCM3 estaba unido al receptor. También midieron los niveles de VEGFR2 en células endoteliales de ratón a los cuales se les había eliminado la expresión de *ccm3*. En este caso, los niveles de VEGFR2 descendían significativamente en ausencia de CCM3, lo que probaba que la proteína CCM estabilizaba al receptor y permitía que la vasculogénesis en el desarrollo llegara a buen puerto. También vieron que, si añadían VEGF a células endoteliales, conseguían facilitar la interacción CCM3-VEGFR2, evitar una excesiva endocitosis del receptor y su degradación y que se produjera angiogénesis.

También tenemos que recordar que las células endoteliales que no expresan algún gen *Ccm* tienen poca VE-Cadherina en su membrana (ver apartado 3.2). Cuando la VE-Cadherina está

ausente, el VEGFR2 se internaliza de forma más rápida y permanece en los endosomas durante más tiempo (Lampugnani et al., 2006).

Por tanto, explicaban que en el periodo embrionario, el proceso de vasculogénesis depende de que CCM3 estabilice al receptor VEGFR2 en la membrana para que pueda unírsele su ligando y que se produzcan las rutas de señales necesarias para la creación de nuevos vasos.

Sin embargo, en 2020, DiStefano y Glading presentaron resultados diferentes sobre el papel de VEGFR2 en la patogénesis de la enfermedad. Al eliminar cualquiera de los genes *Ccm*, la fosforilación del receptor se elevaba, es decir, había una mayor activación sin existir un aumento en la cantidad total del receptor. También observaban un aumento en los niveles de mRNA y proteína del VEGF cuando eliminaban *Ccm1*, lo cual ya había sido descrito (Mleynek et al., 2014). Cuando usaban un inhibidor selectivo del VEGFR2, las lesiones vasculares que presentaban los ratones *Ccm1 knockout* descendían en número y menos permeabilidad a las fugas de sangre desde las estructuras cavernosas. Estos autores proponen que esta ruta angiogénica, junto con otras rutas alteradas, contribuyen a la generación de las lesiones al desaparecer las proteínas CCM e hiperactivarse.

Estos dos estudios parecen tener conclusiones contrarias sobre la responsabilidad del papel del VEGFR2 en la enfermedad; sin embargo, estudian el procedimiento en dos periodos vitales diferentes: si bien la angiogénesis es imprescindible en el periodo embrionario para construir el sistema cardiovascular y el resto del individuo, en estadios posnatales la misma vía puede acabar generando y participando en la evolución de enfermedades vasculares como los tumores vasculares (hemangiomas infantiles, por ejemplo; Lee et al., 2013).

En otro estudio (Renz et al., 2015), visto el papel que el proceso de angiogénesis podía tener en el desarrollo de las lesiones, probaron a inhibir farmacológicamente el receptor VEGFR2 en un modelo embrionario de pez cebra sin *ccm2*; comprobaron que, los niveles de *klf2* elevados en los animales sin tratar tampoco se reducían cuando aplicaban el inhibidor. Concluyeron que este característico fenómeno de expresión incrementada de *klf2* se producía independientemente de VEGFR2, pudiéndose explicar con la intervención de otras rutas como la MEKK3-KLF2/4.

4. LA FAMILIA DE LAS GCKIII QUINASAS

En 1996 se describió una familia de serina/treonina quinasas en células de mamíferos, que eran proteínas homólogas a las descubiertas en *Saccharomyces cerevisiae* anteriormente (Leberer et al., 1992); en la levadura vieron que estaban implicadas en la reproducción y fueron bautizadas como Ste20 (*sterile 20 protein*) (Kyriakis y Avruch, 1996). Estas quinasas se localizarían *upstream* de la vía de activación de las MAPK y participaban en funciones celulares como proliferación, migración y diferenciación. En mamíferos se denominaron proteínas *sterile 20 like*.

Esta familia de quinasas se divide en dos grupos, las PAKs (*p21 Activated Kinases*) y GCKs (*Germinal Center Kinases*), que muestran diferencias estructurales y funcionales.

- PAKs: poseen su dominio catalítico en el extremo C-terminal. Su funcionamiento está determinado por su dominio regulador, en el extremo N-terminal, cuando interacciona con proteínas GTPasas pequeñas como Cdc42 y Rac1. En general, las PAKs están implicadas en la activación de rutas de estrés celular como la vía de SAPK/JNK. También se encuentran interaccionando con el citoesqueleto y cambiando la morfología y movilidad (Yuste et al., 2003).
- GCKs: su dominio quinasa está ubicado en su extremo N-terminal y el regulador en el C-terminal. No presentan dominios que les permitan unirse a GTPasas y se

dividen en 8 familias diferentes (GCK I-VIII). Están implicadas en diversas funciones: procesos inmunitarios, control de volumen celular, proliferación celular, metabolismo o apoptosis.

En este caso, nos centraremos en la subfamilia de quinasas GCKIII.

La subfamilia de quinasas GCKIII está compuesta por tres miembros: STK24, STK25 y STK26. Además, a STK24 y STK26 se les llama también MST3 y MST4 respectivamente, un acrónimo de *Mammalian Ste20 like kinases*, aunque han sido descritos homólogos en otras especies animales no mamíferas, como *C. elegans*. STK25 es también conocido como SOK1 (*Sterile 20/Oxidant Stress-Response Kinase 1*) o YSK1 (*Yeast Sps1/Ste20-related Kinase 1*), también expresado en levaduras (Osada et al., 1997) y en pez cebra (Zheng et al., 2010).

A diferencia de las quinasas PAKs, las GCKIII presentan su dominio enzimático en su extremo N-terminal. Este es el dominio más conservado y presenta secuencias que no sólo comparten entre ellas, sino también con el resto de quinasas GCK, marcando su pertenencia a la familia.

Este dominio, que consta de unos 251 residuos aminoacídicos (Figura 5), presenta varios residuos imprescindibles para su función quinasa, además de un sitio de unión a ATP para llevar a cabo su papel.

El dominio regulador es el que marca las grandes diferencias entre las diferentes familias, ya que muestra mayor variabilidad en la secuencia y por tanto en las interacciones para la regulación y cooperación con otras proteínas.

A pesar de esto, se pueden reconocer ciertas regiones en las proteínas que son compartidas: secuencias NLS (*nuclear localization sequences*), secuencias NES (*nuclear export sequences*) y sitios de corte de caspasas (Figura 7) (Huang et al., 2002). Todas estas regiones son esenciales para la correcta regulación, activación y traslocación de las GCKIII según las necesidades de la célula.

Además, en este extremo C-terminal se localiza el dominio regulador que les permite a las GCKIII no solo interactuar con CCM3 (Figura 2A), sino incluso formar heterodímeros funcionales y necesarios para llevar a cabo las tareas que le corresponde a la CCM (Zhang et al., 2013). También mediante este dominio los monómeros de STK25 y STK26 pueden unirse y formar homodímeros.

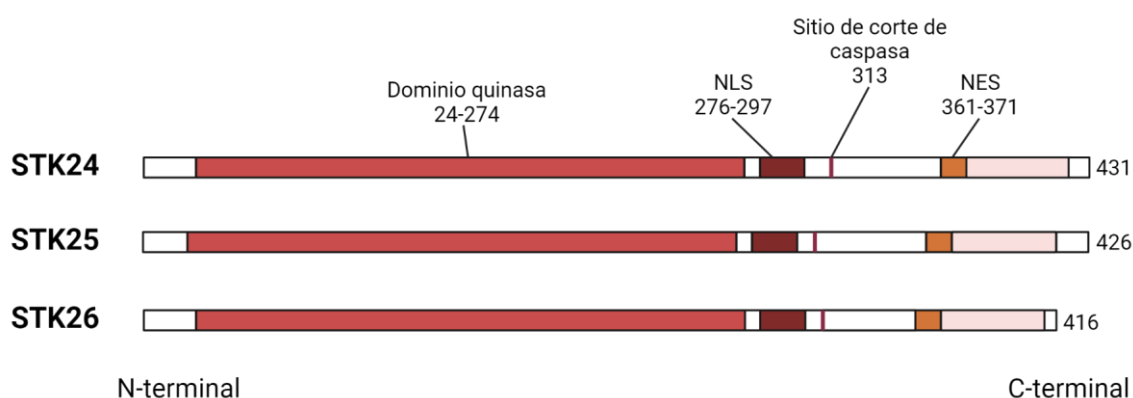


Figura 7. Estructura de las quinasas de la subfamilia GCKIII. Se muestra un esquema de los dominios funcionales de las tres GCKIII, diferenciando una enzimática y otra reguladora. También se señalan regiones reguladoras reconocibles, como las NLS (*nuclear localization sequences*) o las NES (*nuclear export sequences*).

Creado con BioRender.com, según Pombo et al., 2007 con permiso de contenido abierto de BRI.

Además de compartir estructura funcional y secuencias similares, las GCKIII comparten más de un 65 % de sus aminoácidos en su secuencia, por ejemplo, en los pares STK24-STK26 y STK25-STK26; esta similitud aumenta hasta más de un 67 % entre STK24 y STK25 (Tabla 1).

Tabla 1. Porcentaje del número de aminoácidos que comparten entre sí STK24, STK25 y STK26. Se analizó mediante alineamiento múltiple de las secuencias utilizando el programa de análisis Clustal Omega (Madeira et al., 2019).

	STK25	STK26
STK24	67,411 %	65,618 %
STK25	-	65,197 %

Aunque las proteínas GCKIII pueden encontrarse en diferentes localizaciones celulares o ligadas a algún orgánulo cuando están activadas, habitualmente son residentes del complejo proteico STRIPAK, al igual que CCM3.

El complejo proteico STRIPAK (*STRiatin Interacting Phosphatase And Kinase*) es un conjunto de enzimas, proteínas adaptadoras y señalizadoras que participan en funciones de señalización, control del ciclo celular, apoptosis, tráfico vesicular, ensamblaje del aparato de Golgi, polaridad celular, migración celular, desarrollo neural y vascular y función cardíaca (Shi et al., 2016).

Entre los componentes del complejo STRIPAK (Figura 8) se encuentran: proteínas de la familia STRN, que poseen un dominio de interacción con CCM3 y se pueden localizar en las uniones entre células; el complejo proteico PP2A con capacidad catalítica, adaptadora y reguladora; MOB4; calmodulina (CaM); CTTNBP2/NL; la proteína CCM3; las proteínas STRIP1/2 o las GCKIII quinasas, STK24, STK25 y STK26; entre otras (Shi et al., 2016).

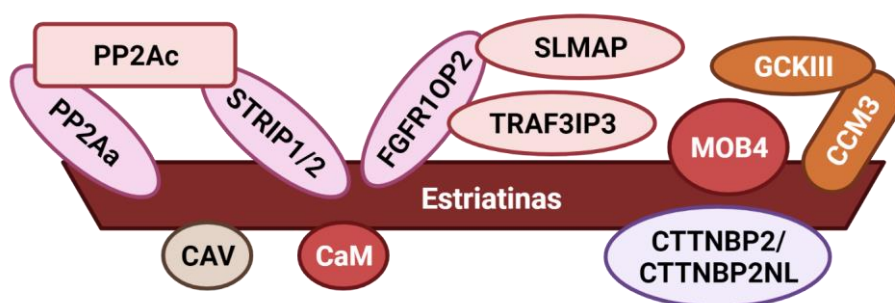


Figura 8. Modelo del complejo STRIPAK según Shi et al., 2016, indicando sus componentes, del que forman parte habitualmente las GCKIII quinasas. Ilustración creada con BioRender.com con permiso de Springer Nature.

4.1. STK24

El gen *STK24* (*Serine/Threonine Kinase 24*) se encuentra en el cromosoma 13 en la localización q32.2 y codifica una proteína con su mismo nombre, STK24, a la que se le conoce también como MST3 (*Mammalian Ste20 like kinase 3*). Esta enzima utiliza su capacidad de fosforilación de residuos serina y treonina para regular diferentes vías de señalización e implicarse en diversas funciones celulares (Figura 9) y fisiológicas. STK24 posee una isoforma llamada Mst3b, que presenta la misma secuencia excepto una región codificante en el extremo 5' de su cDNA, que le permite ser reconocida y fosforilada por PKA. La expresión de Mst3b

se restringe al cerebro, particularmente en el hipocampo y en la corteza cerebral (Zhou et al., 2000), en contraste con la expresión ubicua y la baja especificidad de tejido de STK24.

En los últimos años, ha resultado sustancial su papel en metabolismo y la regulación de la homeostasis de la glucosa y los lípidos gracias a su capacidad quinasa en células hepáticas (Iglesias et al., 2017; Caputo et al., 2021) o en inflamación del tejido adiposo (Qin et al., 2021).

Entre todas las funciones que se han encontrado de STK24, en este trabajo destacamos aquellas que pueden contribuir a la patogenia de las malformaciones cavernosas, al estar relacionadas con vías celulares afectadas ya conocidas (ver apartado 3) o en las que coparticipa con proteínas CCM.

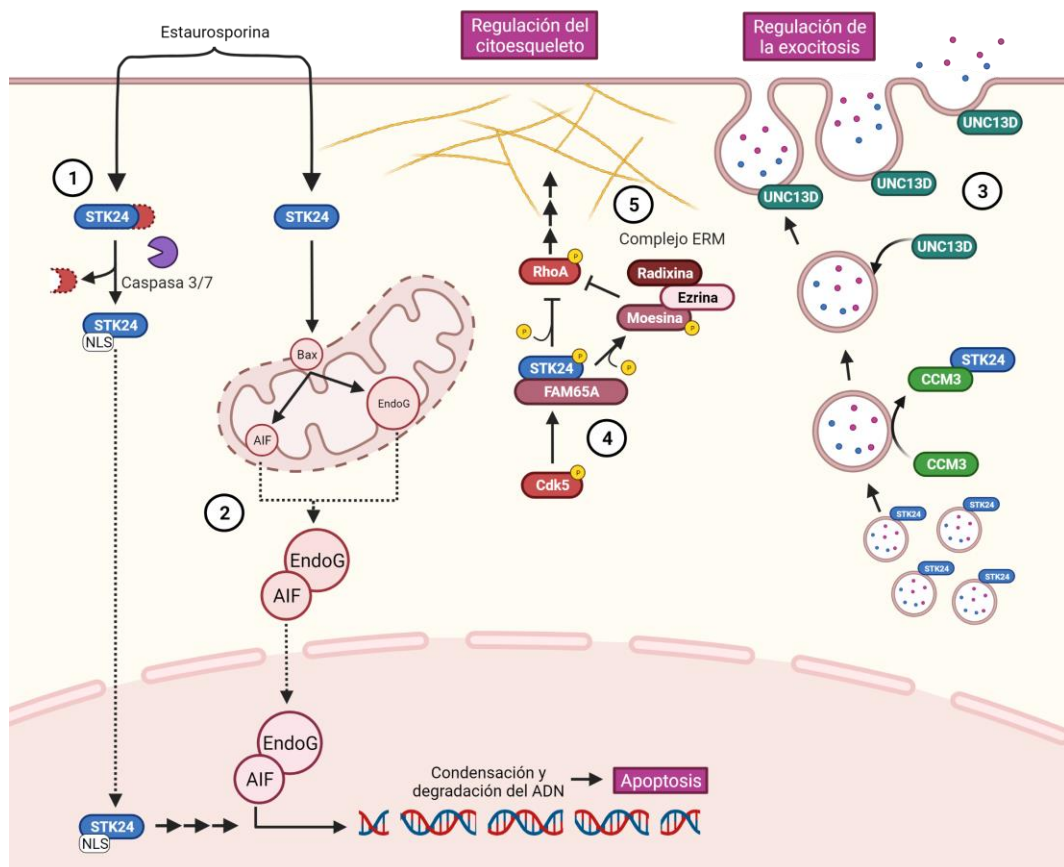


Figura 9. Principales funciones que realiza STK24 en la célula. A través de diversos intermediarios, ubicaciones, interacciones y fosforilaciones en orgánulos celulares, STK24 participa y regula funciones como el tráfico de endomembranas celulares, migración, polaridad, dinámica del citoesqueleto y apoptosis. Ilustración propia creada con BioRender.com.

4.1.1. STK24 en la apoptosis

Una de las primeras funciones que se descubrieron sobre STK24 fue su participación en la apoptosis celular (Figura 9 ①). Lo hacía, además, después de sufrir un corte en su dominio regulador por parte de la caspasa 3/7 cuando se inducían a las células immortalizadas a apoptosis con tratamientos de estaurosporina, demostrando que STK24 podía ser regulada mediante proteólisis.

Tras esta modificación proteolítica, la quinasa no solo activaba su capacidad enzimática para poder interactuar con posibles sustratos, sino que era capaz de translocarse hasta el núcleo

al poseer también una región NLS (*Nuclear Localization Sequence*) en su secuencia del extremo C-terminal (Huang et al., 2002). Cuando se sobreexpresaba STK24, típicos signos apoptóticos, como la condensación del ADN, se manifestaban con más intensidad.

Confirmada su implicación en la apoptosis inducida por caspasa, también se averiguó que participaba en la apoptosis sin la intervención de caspasas e iniciada en la mitocondria (Figura 9 ②) (Lin et al., 2010). En este caso, STK24 actúa sobre Bax, proteína proapoptótica alojada en la membrana externa de la mitocondria. Esta proteína pertenece a una compleja red de regulación de la apoptosis (rotura de la membrana externa mitocondrial, activación de caspasas, fuga de citocromo C hacia el citosol...). La proteína Bax activada por STK24 es capaz de modular la salida de AIF (*Apoptosis Inducing Factor*) y EndoG (*Endonuclease G*) para que puedan migrar hasta el núcleo y fragmentar el ADN nucleosomal y condensarlo, promoviendo así la muerte celular.

4.1.2. STK24 en dinámica de membrana

Otro de los procedimientos en los que parece estar implicada STK24 es en la exocitosis, al menos en los neutrófilos cuando se desencadena una respuesta inmune aguda (Zhang et al., 2013). STK24 estaría actuando como un inhibidor de la exocitosis de las vesículas del citoplasma hacia el exterior, ya que compite con la proteína UNC13D. Cuando los neutrófilos están en reposo, STK24 está unida a las vesículas a las que UNC13D debe acoplarse para llevar a cabo la exocitosis, con lo cual se evita la liberación inoportuna de gránulos y el daño tisular. Sin embargo, en una respuesta inmune, es CCM3 el que recluta fuera de las vesículas a STK24, permitiendo que UNC13D ocupe su espacio y el proceso de exocitosis pueda finalizar. Por tanto, STK24 podría funcionar como un regulador de la cantidad de membrana plasmática que forma la célula, repercutiendo también en su morfología y tamaño (Figura 9 ③). A su vez, Zhang y colaboradores comprobaron que CCM3 estabilizaba a STK24, por lo que la proteína CCM3 también sería una pieza clave en la regulación de la exocitosis en estas células y atendería a estímulos como la concentración de Ca^{2+} para intervenir en el proceso exocítico.

Otro estudio también relacionó a las GCKIII quinasas con el manejo de membranas (Song et al., 2013). En este caso, mutantes de *Drosophila melanogaster* (*D. melanogaster*) para el gen ortólogo de las GCKII, *wheezy*, mostraban en el desarrollo de los tubos que forman el sistema traqueal respiratorio de la mosca defectos en la membrana apical, ya que los tubos resultaban más grandes y dilatados que los de los insectos normales. Este fenotipo imitaba los que le ocurría en las mismas estructuras a los mutantes de *ccm3*. Los investigadores le dieron a este gen ortólogo el papel de regulador y limitador del diámetro de los tubos traqueales cuando deben expandirse en el desarrollo. En otro organismo modelo, eliminar el gen ortólogo de las GCKIII *gck-1* en *C. elegans*, provocaba que los tubos excretores se vieran alterados imitando la morfología de los tubos de los individuos deficientes en *ccm3* (Lant et al., 2015). En 2017, Pal et al., añadieron nuevos experimentos y probaron que tendría un papel importante el complejo STRIPAK y Cdc42 en el reciclaje de la membrana, organización del citoesqueleto y polaridad celular.

Los resultados de estos estudios sobre STK24 y su regulación de eventos de membrana apuntan en una misma dirección: STK24 podría ser necesaria para que la cantidad de membrana que tiene la célula sea estable. Su eliminación deriva en un exceso de membrana, repercutiendo en el tamaño, forma y polaridad de la célula.

4.1.3. STK24 en la regulación del citoesqueleto

Además de experimentos en células en cultivo, estudiando el papel de STK24 en el desarrollo se han descubierto nuevas funcionalidades. Tang et al., (2014) observaron que, durante la embriogénesis, la falta de STK24 afectaba a la morfología y polaridad celular, repercutiendo gravemente en la capacidad migratoria radial de las neuronas durante la laminación de la corteza cerebral de ratón. Además, consiguieron establecer cuál era la vía de regulación subyacente: STK24 estaría bajo la regulación de una serina/treonina quinasa dependiente de ciclina, la *cyclin-dependent kinase 5* o Cdk5 que fosforila a STK24 en su residuo Ser79 y consigue activar su propia actividad quinasa (Figura 9 (4)).

Finalmente, consiguieron establecer la relación entre STK24 y estas desregulaciones, ya que esta GCKIII estaba habitualmente asociada a filamentos de actina, en la membrana plasmática neuronal, y se apreciaba un aumento en la actividad GTPasa de RhoA cuando STK24 no se expresaba. En este caso, STK24 se encarga de fosforilar a RhoA y regula su actividad, inhibiéndola, y la mayor acción de la GTPasa en los mutantes explicaría las alteraciones en el citoesqueleto (ver apartado 3.1), la migración y el remodelado de la morfología celular. Sería la investigación de Mardakheh et al., (2016), la que añadiría más integrantes en la regulación de RhoA por parte de STK24, ya que son necesarias proteínas adaptadoras como FAM65A para que STK24 interaccione con su sustrato.

4.1.4. STK24 en el desarrollo embrionario

El grupo de Zheng et al., (2010) comprobó, en el modelo del pez cebra, que *stk24*, junto con *stk25*, eran necesarios para un desarrollo normal. Si se inhibía alguna de sus expresiones de forma total en los estados tempranos, resultaba letal para los peces cebra que se usaban en el estudio; si no se aplicaba una inhibición tan alta, los mutantes para *stk24* y los mutantes para *stk25* no mostraban ninguna alteración morfológica en el sistema vascular y eran viables. Sin embargo, cuando se inducía una deficiencia leve en ambas quinasas a la vez, los peces cebra mostraban malformaciones en el corazón que recordaban a las que típicamente habían mostrado los mutantes para genes *Ccm* (Yoruk et al., 2012): adelgazamiento y dilatación de las paredes del miocardio, fallo cardíaco y edema pericárdico.

4.1.5. Antecedentes de STK24 en CCM

Dada su íntima interacción con CCM3, ya descrita en 2005 por Rual et al., STK24 ha sido objeto de estudio en el campo de los cavernomas cerebrales para averiguar cuál es su rol en su patogenia.

En 2010, se observó en células microvasculares que al eliminar STK24 aumentaban las fibras de estrés al mismo nivel que cuando eliminaban CCM3 o CCM2 (ver apartado 3.1), de igual manera que lo hacían al eliminarla simultáneamente con otra proteína de la familia GCKIII quinasas, STK25. Vistos estos resultados, Zheng et al., propusieron que las GCKIII estarían fosforilando y activando un intermediario en la ruta de Rho, la moesina, que acabaría inhibiendo a su vez la actividad de la vía y regulando la aparición de fibras de estrés. A pesar de que el mutante para STK24 exhibía fibras de estrés, de las dos quinasas, era STK25 la que más efecto regulador tenía sobre la moesina y la ruta de Rho (Figura 9 (5)).

En resumen, la bibliografía sobre STK24 demuestra tiene competencia en funciones celulares sospechosas de contribuir en la patología celular de las CCM, como el control del citoesqueleto o de la muerte celular; incluso directamente relacionadas con defectos en el desarrollo embrionario del sistema vascular. Sin embargo, no existe ninguna publicación que demuestre la implicación de STK24 en el desarrollo u origen de las lesiones vasculares que estudiamos.

4.2. STK25

STK25 (Serine/Threonine Kinase 25) es un gen localizado en 2q37.3 que codifica una proteína con su mismo nombre, STK25, a la que también se le conoce como SOK1 (*Sterile 20/Oxidant Stress-Response Kinase 1*) o YSK1 (*Yeast Sps1-Ste20-related Kinase 1*). Al igual que el resto de proteínas de su familia, STK25 funciona como una quinasa de residuos serina/treonina y participa en el control de ruta de señales en todos los tipos celulares (Figura 10), al tener un patrón de expresión ubicuo.

A continuación, se introducen algunas de las rutas e interacciones en las que colabora STK25 y que resultan interesantes o que justificarían una posible participación en la patogenia de las malformaciones cavernosas.

4.2.1. STK25 en la migración y polaridad celular: la regulación del aparato de Golgi

STK25 destacó por encontrarse ubicado en la membrana del aparato de Golgi, ya que en experimentos llevados a cabo por Preisinger et al., (2004), se observó que colocalizaba con la proteína de la matriz de Golgi GM130 (Figura 10 ①). Para poder alojarse en este orgánulo, STK25 usa a GM130 como proteína *scaffold* uniéndose a ella mediante su dominio quinasa del extremo N terminal. Esta se descubre como una de las grandes diferencias que guarda con la GCKIII quinasa STK24, de la que no se ha descrito ubicación en el Golgi ni interacción con GM130 en el cumplimiento de sus funciones todavía, a pesar de que sus secuencias guardan más parecido que con STK26, que sí puede encontrarse en Golgi unida a GM130.

Lejos de sólo tener el papel de proteína adaptadora, GM130 tiene un rol importante en la activación de STK25. Permite que STK25 se active al ser autofosforilada, y esto le permite fosforilar y regular otras proteínas; los autores llegan incluso a sugerir que GM130 y STK25 podrían formar heterodímeros. Otro trabajo (Fidalgo et al., 2010), demostraría que en esta interacción también sería necesaria CCM3 (ver apartado 3.4), que estabiliza a STK25, la hace menos susceptible a degradación (Zhang et al., 2012) y es necesaria para que la GCKIII pueda realizar su actividad quinasa.

Cuando se realizan experimentos en los que elimina a STK25 o se usa una STK25 sin dominio de activación con el que interaccione GM130, se observan alteraciones en la polaridad cis-trans del aparato de Golgi y mayor dispersión del orgánulo en la región perinuclear; cuando se sobreexpresa, el Golgi tiende a condensarse. Esto se traduce en deficiencias en el tráfico de vesículas dependientes del aparato de Golgi, dinámica del citoesqueleto, polaridad celular, ubicación del centrosoma y en última instancia, a funciones como la migración y la adhesión celular. Tras un *screening* de posibles sustratos, apareció la proteína 14-3-3 ζ como sustrato de STK25 tras ser fosforilada por la quinasa en su residuo aminoacídico 58, que correspondía a una serina.

Formando parte de una familia de proteínas adaptadoras con siete isoformas que interactúan con gran diversidad de proteínas (integrinas, proteínas de rutas proapoptóticas, reguladores del ciclo celular) y que pueden realizar diferentes acciones (secuestro de dianas de

fosforilación, protección frente a fosfatasa, homo y hetero dimerización, regulación de la localización subcelular), que 14-3-3 ζ sea regulado por STK25 explicaría la repercusión que tiene en los procesos de migración, adhesión y polaridad celular.

Posteriores trabajos reafirmarían el papel de STK25 en la regulación de una correcta polaridad celular de las neuronas cuando necesitan extender sus dendritas y axones en la laminación de la corteza cerebral durante el desarrollo a través su control de la dispersión del aparato de Golgi (Matsuki et al., 2010; Matsuki et al., 2013; Rao et al., 2018). A través de estas investigaciones, también se descubrió la relación de STK25 con la ruta de LKB1-STRAD, que junto GM130, regularían la polaridad celular de neuronas (Matsuki et al., 2010).

4.2.2. STK25 en apoptosis celular

La anteriormente mencionada fosforilación de Ser58 de 14-3-3 ζ por parte de STK25 no solo servía para regular la migración o la polaridad celular; también se vinculó a la activación de apoptosis desencadenada por estrés oxidativo por H₂O₂ (Figura 10 ②). Al fosforilarse dejaba libre a la proteína ASK1 para que iniciara cascadas de señal celular que remataban en procesos de muerte celular (Zhou et al. 2009). En realidad, una de las primeras funciones que se le adjudicó a STK25 fue la de intervenir en la respuesta a estrés oxidativo, ya que exponer a células a H₂O₂ producía un aumento en su autofosforilación y activación (Pombo et al., 1996).

Una de las formas en las que STK25 funcionaría induciendo la muerte de la célula sería entonces como un sensor de los niveles de estrés oxidativo alojado en el aparato de Golgi; cuando estos niveles son altos, STK25 se activa al autofosforilarse y hace lo mismo con 14-3-3 ζ en su residuo Ser58, liberando a ASK1 para iniciar la muerte celular por estrés oxidativo.

Pero la ruta de ASK1 no sería la única que STK25 usa para inducir la apoptosis. En 2008, Nogueira y Fidalgo (et al.) sometieron a diferentes tipos de células en cultivo a estrés oxidativo y osmótico y comprobaron que STK25 es necesaria para que las células mueran al exponerse a estrés. La muerte celular inducida por STK25 es la apoptosis ya que tras su sobreexpresión se produce la liberación de citocromo C. Por otro lado, la inhibición de las caspasas impide la muerte celular inducida por su activación (Figura 10 ③).

4.2.3. STK25 en la regulación del citoesqueleto

Al igual que ocurría con STK24, STK25 también se vio envuelto en la organización del citoesqueleto (Zheng et al., 2010). En células microvasculares sin STK25, el porcentaje de ellas que mostraban fibras de estrés era similar al que presentaban células sin genes *CCM*, y lo mismo al combinarla con la inhibición de STK24. Conjuntamente, las células con inhibición de STK25, o de ambas quinasas, presentaban una alta activación de la GTPasa RhoA. Finalmente descubrieron que STK25 usaba su actividad quinasa para activar a un inhibidor de la actividad de la GTPasa, la moesina, en su residuo aminoacídico Thr558. La moesina forma parte del complejo de proteínas ERM (*Ezrin/Radixin/Moesin*) asociadas al citoesqueleto; actúan modulando uniones estrechas entre células y la dinámica del citoesqueleto y con su activación tras ser fosforiladas logran impedir la formación de fibras de estrés (Figura 10 ④).



4.2.4. STK25 en el desarrollo embrionario

Al igual que hicieron con STK24, Zheng et al., (2010) estudiaron la inhibición temprana de STK25 en el desarrollo del pez cebra y reportaron embriones no viables; inhibiendo con baja eficiencia exclusivamente *STK25* no existían alteraciones, pero si al combinar ambas quinasas, al resultar en un fenotipo igual al de los individuos sin alguno de los genes *CCM*. Sin embargo,

de ratones con deficiencia en *Stk25* inducida en el periodo embrionario no se ha descrito ninguna malformación que comprometa su viabilidad y nacen en la frecuencia mendeliana esperada (Matsuki et al., 2013).

4.2.5. Antecedentes de STK25 en CCM

Siendo STK25 una de las proteínas con las que interactúa CCM3 en el complejo STRIPAK, resulta una proteína de interés en el campo de los cavernomas. Algunos trabajos (Fidalgo et al., 2010; Zhang et al., 2012) apuntan a que las relaciones de interacción entre STK25 y CCM3 son necesarias para diversas funciones celulares. Entre ellas existe una regulación de retroalimentación positiva: CCM3 ayudaría en la estabilización de la proteína de STK25 y la quinasa a su vez sería capaz de fosforilar y, por tanto, activar a CCM3.

Teniendo en cuenta en qué vías y rutas actúa STK25 y la estrecha relación que mantiene con CCM3, especialmente en la gestión de la morfología del aparato de Golgi, es comprensible que se haya especulado e investigado sobre el papel que tendría STK25 en la patogenia de las malformaciones cavernosas. Sin embargo, no existen antecedentes de trabajos científicos que relacionen directamente a STK25 con el desarrollo de CCM.

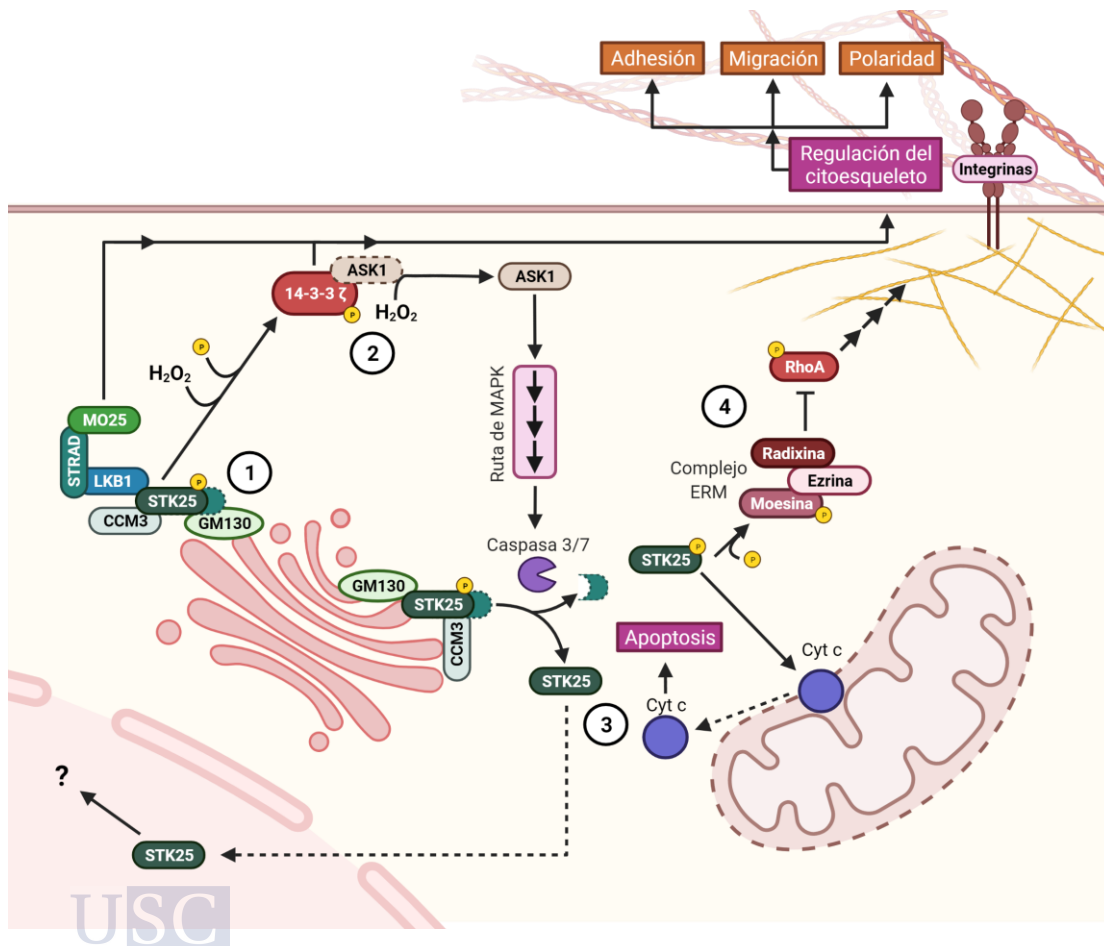


Figura 10. Principales funciones que realiza STK25 en la célula. A través de diversas ubicaciones, interacciones y fosforilaciones en orgánulos celulares, STK25 participa y regula funciones como migración, polaridad, dinámica del citoesqueleto y apoptosis. Ilustración propia creada con BioRender.com.

4.3. STK26

La proteína STK26 (*Serine/Threonine Kinase 26*, MST4 o MASK) es una molécula de 416 aminoácidos que es codificada por el gen con su mismo nombre ubicado en el cromosoma X q26.2.

En la célula, STK26 puede encontrarse en el citoplasma y en las inmediaciones al aparato de Golgi, asociada a otras proteínas para realizar sus funciones.

Se ha demostrado su interacción con CCM3 formando heterodímeros, utilizando sus secuencias de interacción y dominios reguladores; es más, el trabajo de Zhang et al., (2013) utiliza como ejemplo de GCKIII quinasa a STK26 para demostrar la relación estructural con CCM3.

Entre las tareas que se le han atribuido a STK26 está el correcto funcionamiento del aparato de Golgi junto a STK25 (Preisinger et al .2004), al estar asociada con la proteína adaptadora GM130.

También ha sido señalado un papel en la prevención de la muerte cuando las células se ven sometidas a daño oxidativo, junto a CCM3, que funciona como una proteína adaptadora. Para esto, debe desligarse de GM130 y desplazarse de la cara *cis* del Golgi a la periferia celular. Estando unida a CCM3, en la nueva localización es capaz de fosforilar las proteínas ERM (*Ezrin/Radixin/Moesin*) y promover la supervivencia (Fidalgo et al., 2012). Estas proteínas ERM no solo están implicadas en la respuesta a estrés oxidativo, también en la regulación del citoesqueleto; al activarse mediante fosforilación, reducen la actividad de Rho en las células endoteliales y contribuyen a la estabilización de las uniones entre células (ver apartado 3.1). STK26 puede, por tanto, estar implicada en rutas de señalización que ya se conocen por contribuir al desarrollo de las lesiones cavernosas.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

A pesar de que se ha recopilado mucha información acerca de las desregulaciones moleculares que contribuyen a la patogenia de las CCM, todavía no se conoce por completo el comportamiento de la célula endotelial en estas lesiones. Tampoco se sabe en profundidad cómo se desarrolla un cavernoma ni cómo podría limitarse o eliminarse en el cerebro de un paciente. Además, siendo la neurocirugía el único tratamiento utilizado hasta la fecha, es imperioso encontrar una alternativa terapéutica, idealmente basada en terapia farmacológica. Resultados previos de nuestro laboratorio indicaban que el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), una diana farmacológica bien estudiada, podía estar aumentado en algún modelo de células deficientes en CCM3.

Además de seguir analizando qué ocurre en la célula a nivel molecular al eliminar CCM1, CCM2 o CCM3, creímos que era relevante continuar investigando qué otras mutaciones y otras rutas podrían originar y contribuir a la enfermedad. Concretamente, nos interesaba la familia de las GCKIII quinasas, que ha sido relacionada múltiples veces con CCM3 y que sin embargo no se sabía qué papel podían tener en el desarrollo de cavernomas.

Por todo lo anterior, nos pusimos como objetivos:

1. Determinar cómo de general es el aumento de EGFR en ausencia de CCM3 y las causas de dicho aumento.
2. Analizar los efectos de la sobreexpresión de EGFR en células deficientes en CCM3.
3. Determinar el papel de las GCKIII en el desarrollo de las malformaciones cavernosas cerebrales, tanto en modelo *in vitro* usando células endoteliales como en modelo *in vivo* usando un modelo animal.

MATERIAL Y MÉTODOS

MATERIAL Y MÉTODOS

1. CULTIVOS CELULARES

1.1. HEK 293 (*Human Embryonic Kidney 293*)

Estas células fueron descritas por primera vez en 1977 (Graham et al., 1977). Se trata de células con morfología epitelial procedentes de riñón humano embrionario, que se transformaron por transfección de DNA de adenovirus de tipo 5. Esta línea celular se obtuvo de la *European Collection of Authenticated Cell Cultures* (ECACC) y se cultivó en *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM; Sigma-Aldrich-Aldrich #D6046) suplementado con 10% v/v de suero bovino fetal (FBS; Gibco™ #10270-106) y 1% Penicilina-Estreptomicina-L-Glutamina (GPS; Corning #30-000-CL).

1.2. A549 (*Adenocarcinomic human alveolar basal epithelial cells*)

La línea celular de adenocarcinoma de pulmón humano A549 se obtuvo de la ECACC. Se mantuvo en DMEM suplementado con FBS al 10% v/v, 100 U/ml de Penicilina y 100 µg/ml de Estreptomicina (P/S; Gibco™ #15140-163).

1.3. HuVEC (*Human Umbilical Venous Endothelial Cells*)

Las células endoteliales de la vena umbilical humana se aislaron según las indicaciones de Jaffe (Jaffe et al., 1973) de cordones umbilicales obtenidos del Hospital Clínico Universitario de Santiago de Compostela, donde se obtuvo el consentimiento informado por escrito. El procedimiento fue aprobado por el comité de ética del Hospital (Comité de ética da Investigación de Santiago-Lugo), ref 2014/493. Las HuVEC se cultivaron de forma rutinaria en medio de cultivo de células endoteliales VasuLife EnGS (LifeLine Cell Technology, #LL-0002) complementado con VasuLife® EnGS LifeFactors® Kit (LifeLine Cell Technology, #LS-1019) y 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml estreptomicina, en placas recubiertas de gelatina al 0,1% p/v (Sigma-Aldrich #G9391). Se utilizaron HuVEC entre pase 2 y pase 4 para todos los experimentos.

Adaptando el método desarrollado por Jaffe et al., (1973), procedimos de la siguiente forma para obtener las células HuVEC:

1.3.1. Recogida del cordón umbilical

Se colocó un segmento de unos 20-30 cm de cordón umbilical en un bote con unos 100-150 ml de solución estéril de *Cord Buffer* (NaCl 140 mM, KCl 4 mM, HEPES pH 7.4 10 mM, D-Glucosa 11 mM) suplementado con 1% P/S y 50 mg/ml de *Amphotericin B* (Sigma-Aldrich #A2411) y se conserva a 4°C hasta el momento de la extracción (dentro de las primeras 24 horas tras la recogida). Se procuró que los cordones estuviesen obturados con pinzas por ambos extremos.

1.3.2. Extracción de las células endoteliales de la vena

Antes de comenzar con el procedimiento, se cubrió la superficie de las placas donde se va a crecer el cultivo con la gelatina 0,1% estéril, y se pusieron en el incubador a 37°C durante al menos media hora. Usando guantes quirúrgicos estériles dentro de la cámara de cultivo, se extrajo el fragmento de cordón del bote y se manejó con la mayor asepsia posible; se limpió la sangre externa con PBS (*phosphate buffered saline*), y se revisó su integridad. Seguidamente, se colocó una aguja roma estéril en la vena (el vaso con mayor lumen de los tres presentes) y se fijó con una pinza. A través de esta aguja, se limpiaron los trombos que pudieran estar obturando la vena pasando PBS y vigilando que no existan perforaciones por las que se escapase líquido, hasta que saliera PBS limpio y sin sangre. A continuación, se pinzó el otro extremo del cordón.

Con la misma aguja, se introdujeron unos 40 ml de colagenasa tipo I 300 U/ml (Gibco #17100-017) diluida en PBS con concentración alta de $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ (CaCl_2 10 mM, MgCl_2 10 mM) y precalentada a 37°C en el incubador, llenando la vena hasta que quedase bien distendida y retirando la aguja. Se dejó incubando el cordón en un frasco con PBS previamente calentado a 37°C durante 10 minutos; más tiempo podría llevar a desprender células musculares o fibroblastos. A continuación, se retiró el cordón y masajeó con las manos para facilitar la digestión. Se cortó uno de los cierres dejando que el líquido caiga en un tubo 50 ml. Después, se introdujo con otra aguja en la vena y se fijó nuevamente con una pinza. Tras cortar el segundo cierre, se pasaron unos 15-20 ml de medio de cultivo completo para arrastrar las células endoteliales. Se centrifugó el volumen recogido a 300 x g durante 5 minutos a *room temperature* (RT; temperatura ambiente). Seguidamente, se aspiró volumen dejando unos 6 ml del contenido del tubo. El *pellet* se resuspendió gentilmente en medio completo fresco y se sembró en las placas pretratadas, tras retirar la gelatina. Se incubaron *overnight* (ON) en condiciones de 5% CO_2 a 37°C, durante lo cual las células endoteliales se pegarían al plato, mientras que los eritrocitos que podían ser arrastrados, no.

Se cambió el medio el día siguiente después de lavar bien la placa con PBS para retirar los eritrocitos. Las células HuVEC eran visibles en 1-2 días desde la extracción y en unos 5-6 días el cultivo alcanzaba la confluencia; se consideró este el pase 0.

1.4. hCMEC/D3 (*Human Cerebral Microvascular Endothelial Cell Line*)

Las células endoteliales microvasculares cerebrales humanas (hCMEC/D3) se cultivaron según lo recomendado, en placas recubiertas de gelatina al 0,1% (Sigma-Aldrich #G9391) en medio basal de crecimiento de células endoteliales-2 (EBM-2, Lonza #CC-3156) suplementado con 5% de FBS (Gibco #10270-106), 1,4 μM hidrocortisona (Sigma-Aldrich #H2270), 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ácido ascórbico (Sigma-Aldrich #A4403), 1% de concentrado de lípidos químicamente definidos (Gibco #11905-031), ácido 4- (2-hidroxietil-1-piperazinetanosulfónico) (HEPES; Sigma-Aldrich #H3375) 10 mM, factor de crecimiento de fibroblastos básico humano 1 ng/ml (*bFGF*; Gibco # 13256-029) y 100 U/ml de penicilina y 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de estreptomycin (P/S; Gibco #15140163). Se utilizaron células hCMEC/D3 entre pase 13 y pase 26 para todos los experimentos. Descrita y desarrollada por primera vez por Weksler et al., 2005, esta línea celular fue amablemente cedida por el Profesor Jaime Millán, del grupo de investigación Biología celular de la inflamación del Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (CBMSO) (Madrid, España).

El mantenimiento, subcultivo, congelación, descongelación y conteo de todas las líneas celulares se hicieron según procedimientos estándar de cultivos. Se mantuvieron en condiciones

estériles de 5% CO₂ a 37°C y se pasaron al alcanzar subconfluencia (80-90%) usando tripsina/EDTA al 0,25% (Gibco™ #25200-072).

2. FÁRMACOS Y TRATAMIENTOS

- DMSO (Sigma-Aldrich #D2650): El DMSO o dimetil sulfóxido, fue usado como solvente de algunos de los reactivos o como vehículo donde se indique.
- Lapatinib (Selleckchem #S2111): se trata de un potente inhibidor de EGFR y ERBB2, al detener su actividad quinasa. Disuelto en DMSO, se usó en la mayoría de los ensayos a 10 µM. Otras concentraciones se indican específicamente.
- Vatalanib (Selleckchem #S1101): es un inhibidor de la actividad quinasa del VEGFR2; se disuelve en DMSO y se usa a 10 µM mayoritariamente.
- BIX02189 (Selleckchem #S1531): es un inhibidor selectivo de MEK5 al detener su actividad quinasa y evitar que se fosforile ERK5 y se active su vía de señalización.
- Cloroquina (*Chloroquine*; Sigma-Aldrich #C6628): la cloroquina inhibe la maduración y fusión de endosomas y lisosomas, lo cual permite estudiar la vía lisosomal de degradación proteica. Disuelta en H₂O, se usó a 100 µM en cultivo.
- MG132 (Z-Leu-Leu-Leu-al; Sigma-Aldrich #C2211): péptido aldehído que bloquea selectivamente la actividad proteolítica del proteasoma 26 S, que posibilita el estudio de esta vía de degradación de proteínas. Disuelto en DMSO, se usó a 10 µM.
- VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*; Sigma-Aldrich #V5765): es una proteína implicada en la vasculogénesis y angiogénesis, al ser el ligando del VEGFR. En cultivo, se empleó a 50 ng/ml previamente disuelto en H₂O.
- EGF (*Epidermal Growth Factor*; Calbiochem #PHG0313): es una proteína que estimula el crecimiento y diferenciación celular al unirse a su receptor; el EGFR. Disuelto en H₂O, se usó a una concentración de 100 ng/ml.
- Calceína AM (BD Pharmingen™ #564061): se trata de una molécula fluorescente que penetra en la célula viva y que puede utilizarse para determinar la viabilidad celular en la mayoría de las células eucariotas, al ser hidrolizado intracelularmente y convertido en calceína con fluorescencia en verde (ex/em 494/517 nm). En nuestro caso, se empleó para perfilar el citoplasma de las células. Disuelto en DMSO, se usó a 0,1 µM.

3. SILENCIAMIENTO GÉNICO MEDIANTE ShRNA

La tecnología del shRNA (*short hairpin RNA*) se basa en la interferencia de la expresión de los genes de estudio, pero ofrece la posibilidad de establecer líneas celulares con esta modificación de manera constante, al usar lentivirus para entrar en la célula y producirse la integración estable en el genoma de las células de mamífero.

Para producir los lentivirus, se procedió según el siguiente protocolo:

- Día 1

Se sembraron 4·10⁶ células HEK 293 por p100 con 10 ml de medio con suero y se incubaron ON.

- Día 2

Por p100, se diluyeron 120 µl de JetPEI 1 mg/ml (Sigma-Aldrich #904759) en DMEM 0% hasta un volumen final de 500 µl, mezclándolos después. Luego, se diluyeron 25 µg DNA en DMEM 0% hasta un volumen final de 500 µl; los 25 µg se componían de la siguiente forma:

psPAX2 (Addgene #12260)	40%	10 µg
pMD2.G (Addgene #12259)	10%	2,5 µg
pLKO.1 (Addgene #8453)	50%	12,5 µg

Los plásmidos necesarios para este proceso fueron cedidos por el Dr. Miguel Ángel Fidalgo Pérez (CiMUS, Universidad de Santiago de Compostela).

El plásmido pLKO.1 contiene en su secuencia los diferentes shRNA que se insertaron, explicados en la Tabla 2. Para su manipulación, se usaron las enzimas de restricción EcoRI (New England Biolabs #R0101S) y AgeI (New England Biolabs #R0552S) bajo las condiciones óptimas recomendadas por la casa comercial específicamente para ellas. Cuando fue necesario realizar reacciones de ligación, se realizó usando el Rapid DNA Dephos & Ligation Kit (Roche #4898125001), siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Tabla 2. Secuencia de los shRNA usados en el silenciamiento génico.

shRNA	Secuencia	Secuencia 5'-3'
ShC	Sentido	CCGGCAACAAGATGAAGAGCACCAACTCG AGTTGGTGCTCTTCATCTTGTTGTTTTG
	Antisentido	AATTCAAAAACAACAAGATGAAGAGC ACCAACTCGAGTTGGTGCTCTTCATCTTGTTG
ShCCM3	Sentido	CCGGCCAGGATGTTGAATGGGATTA CTCGAGTAATCCCATTCAACATCCTGGTTTTG
	Antisentido	AATTCAAAAACCAGGATGTTGAATGGG ATTACTCGAGTAATCCCATTCAACATCCTGG

Después de mezclar los plásmidos, se añadió la solución de JetPEI (500 µl) sobre cada mix de DNA y no al revés, ya que disminuiría la eficiencia del proceso; a continuación, se incubó la mezcla 30 minutos RT. Entonces, se añadieron 1000 µl del mix gota a gota sobre las células sin cambiarles el medio y se volvió a incubar en condiciones normales de cultivo.

- Día 3

Se procedió a cambiar el medio de cultivo.

- Día 4

Se procedió a reservar el sobrenadante de la placa y a poner nuevo medio a las células. Luego, el sobrenadante se centrifugó durante 5 minutos a 300 x g a 4°C para que precipitasen los restos celulares; de esta centrifugación, se recuperó el sobrenadante y se hizo pasar por una columna Amicon® Ultra-15, membrana PLTK Ultracel-PL, 30 kDa (Millipore #UFC903024). Al centrifugarla durante 30 minutos a 3500 x g a 4°C, se consiguió la concentración de las partículas virales producidas por las células HEK 293. Se deshechó el líquido filtrado una vez terminada la centrifugación; el volumen que no atravesó el filtro se preservó en crioviales a -80 °C. Esta concentración de partículas virales también se realizó tras las 72 horas de la transfección, tras lo cual se deshechó el cultivo celular.

- Día 5

A las células que se fueran a infectar con las partículas lentivirales obtenidas, se les colocó medio de cultivo con polibreno (Sigma-Aldrich #H9268) a 8 µg/ml. Luego se añadió 50 µl del concentrado de lentivirus obtenido con los filtros Amicon®. A continuación, para obtener una mayor eficiencia, se llevó a cabo una *spinfection*, centrifugando durante 90 minutos a 500 x g a 32°C la placa de cultivo sobre la que se estuvo llevando a cabo el proceso. Luego, se dejó incubando ON en condiciones estándar de cultivo.

- Día 6

Se procedió a cambiar el medio de cultivo.

- Día 7-10

La selección de las células infectadas se llevó a cabo añadiendo el antibiótico puromicina (Fisher Bioreagents #BP2956) a 1 $\mu\text{g/ml}$. Los cultivos se mantuvieron con puromicina durante todos los pases que se hicieron para asegurar una continua selección de células infectadas.

4. TRABAJO Y MANIPULACIÓN DE MICROORGANISMOS

Los microorganismos utilizados para las transformaciones realizadas en este trabajo pertenecían a las siguientes cepas de *Escherichia coli*:

- *Subcloning Efficiency™ DH5 α ™ Competent Cells*: F⁻ ϕ 80lacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF)U169 recA1 endA1 hsdR17(r_k⁻, m_k⁺) phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1 λ (Invitrogen #18265-017).
- *One Shot™ Stbl3™ Chemically Competent E. coli*: F⁻ mcrB mrr hsdS20(r_B⁻, m_B⁻) recA13 supE44ara-14 galK2 lacY1 proA2 rpsL20(Str^R) xyl-5- λ ⁻ leu mtl-1 (Invitrogen #C7373-03); cortesía del laboratorio *Stem Cells and Human Diseases* del Dr. Miguel Ángel Fidalgo Pérez (CiMUS, Universidad de Santiago de Compostela).

4.1. MEDIOS DE CULTIVO BACTERIANO

Para el crecimiento de las bacterias se utilizó el medio LB (Luria-Bertani): triptona 1% p/v, extracto de levadura 0,5% p/v, NaCl 1% p/v en H₂O.

Para la selección de las bacterias transformadas, el medio se suplementó con antibiótico según la resistencia otorgada por el plásmido (ampicilina 100 $\mu\text{g/ml}$, Sigma-Aldrich #A9518). Las condiciones de crecimiento fueron 18 horas a 37°C y 225 rpm.

Para la preparación de placas con medio sólido se utilizó el medio LB suplementado con agar bacteriológico a una concentración de 1,5%. En estas placas, que se utilizaron para la selección de transformantes, también se añadió el antibiótico correspondiente a la misma concentración final, después de esterilizar el medio y previamente a su solidificación.

4.2. PROCEDIMIENTOS DE RUTINA EN LA MANIPULACIÓN DE PLÁSMIDOS BACTERIANOS

4.2.1. Transformación de bacterias competentes

Para transformar las bacterias con los plásmidos a amplificar, se siguió un protocolo general de transformación mediante *shock* térmico.

4.2.2. Obtención del DNA plasmídico

- Minipreps: Para la recuperación del DNA plasmídico a pequeña escala (minipreps) se utilizó el kit GenElute™ Plasmid Miniprep Kit (Sigma-Aldrich #PLN350) siguiendo las instrucciones del fabricante.
- Midipreps: Para la recuperación del DNA plasmídico a mediana escala (midipreps) se utilizó el kit PureLink™ HiPure Plasmid Filter Midiprep Kit (Invitrogen #K210015) siguiendo las instrucciones del fabricante.

4.2.3. Electroforesis en gel de agarosa

La separación de fragmentos lineales de DNA se realizó mediante electroforesis en geles de agarosa (Fisher #BP160-100) en TAE (Tris 40 mM pH 7.6; ácido acético 20 mM; EDTA 1 mM). Los geles se prepararon a concentraciones de agarosa desde 0,7% al 2%, en función del rango de tamaños que se pretendiese separar. El DNA se visualizó mediante la incorporación de bromuro de etidio 0,002% v/v (Sigma-Aldrich #E8751) al gel, usando un transiluminador de luz ultravioleta *Gel Doc 1000* (Bio-Rad). Se utilizaron marcadores comerciales de tamaños conocidos como Lambda DNA/EcoRI Plus HindIII (Thermo Scientific # SM0191).

4.2.4. Purificación de fragmentos de DNA a partir de geles de agarosa

Para la recuperación del DNA plasmídico separado por electroforesis en geles de agarosa, se purificó el DNA mediante el uso de *GenElute™ Gel Extraction Kit* (Sigma-Aldrich #NA1111), según las instrucciones del fabricante.

4.2.5. Cuantificación de la concentración del DNA

Usando el Thermo Scientific™ NanoDrop 2000, se utilizaron 2 µl de muestra para cuantificar el DNA y comprobar la pureza del extracto. También se tomó en cuenta la ratio 260 nm/280 nm de las muestras, siendo 1,8 el valor óptimo.

5. SILENCIAMIENTO GÉNICO MEDIANTE siRNA

Para silenciar la expresión de los genes de interés en cultivos celulares, también se optó por la tecnología del RNA de interferencia mediante siRNA. El mecanismo del siRNA (*small interfering RNA*) se basa en la interferencia del mRNA del gen de interés, impidiendo su expresión. Al tratarse de un método de silenciamiento génico transitorio, decidimos que fuera utilizado en células HuVEC, ya que, al tratarse de células primarias, solo se mantenían en cultivo durante pocos pases.

Para llevar a cabo el silenciamiento génico con siRNA, se siguieron los protocolos del grupo de investigación Biología Celular de la Inflamación, dirigido por el Dr. Jaime Millán en el Centro de Biomedicina Molecular Severo Ochoa, dado que también centran sus investigaciones en células endoteliales (Marcos-Ramiro et al., 2016; Colás-Algora et al., 2020).

- Día 1

Se sembraron $2 \cdot 10^5$ células HuVEC en una placa p60 en medio completo y se dejaron crecer ON.

- Día 2

Por cada p60, se preparó:

- Mix 1: 10 µl de siRNA 20 µM correspondiente + 350 µl Opti-MEM™ *Reduced Serum Medium* (Gibco #31985-047); vórtex e incubación entre 5 y 10 minutos RT.
- Mix 2: 8 µl Oligofectamina (Invitrogen #12252-011) + 30 µl de Opti-MEM™ vórtex e incubación entre 5 y 10 minutos RT.

A continuación, se pipeteó el volumen del Mix 2 sobre el Mix 1 y se incubó 30 minutos RT. En este espacio de tiempo, se lavaron las células con medio de cultivo (EBM-2 sin FBS ni antibióticos) y se dejaron 1,6 ml de EBM-2 sin FBS ni antibióticos. Luego, se añadió gota a gota el Mix con oligofectamina y siRNA en la placa y se dejó incubar 4 horas en condiciones de cultivo estándar. Después, se añadió a la placa 1 ml de medio de cultivo completo con FBS

al 12% para que quedase el FBS al 4%. Se mantuvieron entonces las células en medio sin antibiótico ON.

- Día 3

Las células se tripsinizaron y se comenzaron con los experimentos e incubaciones. En los experimentos llevados a cabo, no se excedió el tiempo de 72 horas tras la incubación con los siRNA.

La secuencia de los siRNA que se emplearon están detallados en la Tabla 3.

Tabla 3. Secuencia de los siRNA usados en el silenciamiento génico.

siRNA	Casa comercial	Catálogo
si-Non Targeting	Dharmacon™	ON TARGET plus siRNA D-001810-01
siPDCD10	Dharmacon™	ON TARGET plus siRNA J-004436-05
siSTK24	Dharmacon™	ON TARGET plus siRNA J-004872-10
siSTK25	Dharmacon™	ON TARGET plus siRNA J-004873-05

6. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GÉNICA MEDIANTE PCR A TIEMPO REAL

Para determinar el nivel de expresión de un gen a nivel de mRNA, seguimos los siguientes pasos: extracción del RNA de cultivo celular o de muestras derivadas de aislamiento de células endoteliales de ratón; retrotranscripción y *qPCR* (PCR cuantitativa a tiempo real).

6.1. EXTRACCIÓN DE RNA

Para extraer el RNA a partir de diferentes cultivos celulares, se procedió primero a lavar las células con PBS frío para eliminar restos y se aspiró; a continuación, se añadieron 42 µl de TRIzol™ Reagent (Invitrogen #15596-018) por cada cm² de superficie manteniendo las muestras siempre en contacto con hielo; se resuspende y homogeniza con una micropipeta y se deja a RT 5 minutos.

Para extraer el RNA a partir de muestras de aislamiento endotelial de cerebros de ratón, se centrifugó el pellet obtenido en el aislamiento durante 5 minutos a 300 x g a 4°C. Luego se le añadieron 41,7 µl de TRIzol por cada cerebro procesado (ver 4.14.6.6); se resuspende y homogeniza con una micropipeta y se deja a RT 5 minutos.

Después de haber incubado las muestras 5 minutos a RT (si se parte de muestras congeladas, deben descongelarse primero en hielo), se añadieron 200 µl de cloroformo por cada mililitro de TRIzol. Asegurándonos de que los tubos están bien sellados, se agitaron durante unos 15 segundos y se incubaron durante 3 minutos a RT. Después, se procedió a centrifugarlos a 11.600 x g durante 15 minutos a 4°C. Después de la centrifugación, se recuperó la fase superior transparente donde se encuentra el RNA en un nuevo tubo. Se añadieron 1250 µl de isopropanol por cada mililitro de TRIzol y 0,5 µg de glucógeno a cada muestra; el glucógeno precipita con el RNA y ayuda a visualizar el *pellet*, pero no interfiere con las demás reacciones. A continuación, se dejaron incubando las muestras 10 minutos a RT y luego se centrifugaron a 11.600 x g durante 15 minutos a 4°C. El RNA quedó en un pellet blanquecino en el fondo del tubo. El sobrenadante se desechó y se eliminaron los restos de isopropanol con la ayuda de una micropipeta. Al tubo se añadieron 2500 µl de EtOH 75% por cada mililitro de TRIzol sin deshacer el *pellet* y se centrifugó a 11.600 x g durante 10 minutos a 4°C. Se eliminó el sobrenadante por decantación, y tras dar un *spin* a las muestras, también los restos que quedasen con ayuda de una micropipeta. Luego, se dejaron los tubos abiertos 10 minutos a 35°C para que se evaporasen los restos de etanol. Se añadieron 50 µl de H₂O Milli-Q® a los *pellets*, y se

resuspendieron las muestras dando *vórtex* a los tubos cada 5 minutos mientras se mantenían a 35°C, durante un total de 20 minutos. Usando el Thermo Scientific™ NanoDrop 2000, se utilizaron 2 µl de muestra para cuantificar el RNA y comprobar la pureza del extracto. Fueron usadas las muestras cuyas ratios 260 nm/280 nm estaban entre 1,9 y 2,0.

6.2. RETROTRANSCRIPCIÓN

Una vez conseguido el RNA, se partió de 300 ng para amplificarlo y convertirlo en cDNA mediante la acción de la enzima retrotranscriptasa. Los reactivos se añadieron en dos pasos (RT-I y RT-II); para una reacción de volumen final 20 µl:

Mezcla RT-I

- H₂O Milli-Q®: 2,3 µl.
- *Random primers* 300 ng/µl (Invitrogen #48190-011): 0,7 µl.
- Mezcla de dNTPs a 2,5 mM cada uno (dTTP, dCTP, dGTP, dATP; Invitrogen #10297-018): 4 µl.
- Muestra mRNA a 60 ng/µl: 5 µl.

La mezcla RT-I se incubó durante 5 minutos a 65°C.

Mezcla RT-II

- *First Strand Buffer* 5X (Invitrogen #18057-018): 4 µl.
- DTT 0,1 M (Invitrogen #18057-018): 2 µl.
- *RNase Out* (Invitrogen # 10777-019): 1 µl.

La mezcla RT-II se incubó 2 minutos a 37°C.

A continuación, se añadió 1 µl de M-MLV *Reverse Transcriptase* (200 U/µl, Invitrogen #28025-013) y se continuó la incubación en el termociclador con las siguientes condiciones:

Paso	Temperatura (°C)	Tiempo
1	25	10 minutos
2	37	50 minutos
3	70	15 minutos

6.3. qPCR

A cada reacción de retrotranscripción de 20 µl, se le añadieron 200 µl H₂O Milli-Q® para usar en la *qPCR*.

Para cada reacción de *qPCR* de 15 µl de volumen, se añadieron:

- H₂O Milli-Q®: 2,5 µl.
- PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix (Thermo Fisher Scientific #A25778): 7,5 µl.
- Oligonucleótidos (*Forward + Reverse Primer Mix*, cada uno a 10 µM, específico para cada gen a medir): 1 µl.
- Muestra: 4 µl.

Los oligonucleótidos usados para las *qPCR* pueden ser consultados en la Tabla 4.



Para la amplificación se usó el StepOnePlus™ Real-Time PCR System, con el programa:

Paso	Temperatura (°C)	Tiempo
0	105	∞
1	50	2 minutos
2	95	10 minutos
3	95	15 segundos
4	55	15 segundos
5	72	40 segundos
6	Volver a paso 3; 40 ciclos	
7	95	5 segundos
8	65	1 minuto
9	97	15 segundos
10	4	∞

Todas las muestras se cargaron por duplicado y para cada una de ellas se incluyeron, por cada experimento analizado, 2 genes de referencia (*housekeeping*): *GAPDH* y *β-ACTIN*.

El equipo detecta la fluorescencia producida por la molécula fluorescente SYBR™ Green (ex/em 494/521 nm) tras cada ciclo de amplificación. Para analizar los resultados, se estudió el valor Ct (número de ciclos requeridos para que la señal fluorescente supere el umbral definido por los niveles de fondo o *threshold*). El valor del Ct es inversamente proporcional a la cantidad de cDNA y se normalizó a la cantidad de mRNA de cada gen contenido en la muestra con un gen de referencia, usando el programa Excel versión 2104 (Microsoft Office 365) para trabajar los datos.

Todas las muestras se cargaron por duplicado y para cada una de ellas se incluyeron, por cada experimento analizado, 2 genes de referencia (*housekeeping*): *GAPDH* y *β-ACTIN*.

El equipo detecta la fluorescencia producida por la molécula fluorescente SYBR™ Green (ex/em 494/521 nm) tras cada ciclo de amplificación. Para analizar los resultados, se estudió el valor Ct (número de ciclos requeridos para que la señal fluorescente supere el umbral definido por los niveles de fondo o *threshold*). El valor del Ct es inversamente proporcional a la cantidad de cDNA y se normalizó a la cantidad de mRNA de cada gen contenido en la muestra con un gen de referencia, usando el programa Excel versión 2104 (Microsoft Office 365) para trabajar los datos.

Tabla 4. Relación de cebadores utilizados para la realización de este trabajo.

Gen	Especie	Secuencia	Secuencia 5'-3'
CCM3	<i>Homo sapiens</i>	Sentido	GCCCCTCTATGCAGTCATGTA
		Antisentido	AGCCTTGATGAAAGCGGCTC
GAPDH	<i>Homo sapiens</i>	Sentido	GGAGCGAGATCCCTCCAAAAT
		Antisentido	GGCTGTTGTCATACTTCTCATGG
β -ACTIN	<i>Homo sapiens</i>	Sentido	CATGTACGTTGCTATCCAGGC
		Antisentido	CTCCTTAATGTCACGCACGAT
KLF4	<i>Homo sapiens</i>	Sentido	CCCACATGAAGCGACTTCCC
		Antisentido	CAGGTCCAGGAGATCGTTGAA
KLF2	<i>Homo sapiens</i>	Sentido	CTACACCAAGAGTTCGCATCTG
		Antisentido	CCGTGTGCTTTCGGTAGTG
STK24	<i>Homo sapiens</i>	Sentido	AGGCATTGACAATCGGACTCA
		Antisentido	CTGACTCAGCACTGTGATTCT
STK25	<i>Homo sapiens</i>	Sentido	CTCCGGGGATTTGCCAACC
		Antisentido	TAGGTAGGAGCCAAAGTAGCG
Gapdh	<i>Mus musculus</i>	Sentido	AGGTCGGTGTGAACGGATTTG
		Antisentido	GGGGTCGTTGATGGCAACA
β -actin	<i>Mus musculus</i>	Sentido	GTGACGTTGACATCCGTAAGA
		Antisentido	GCCGGACTCATCGTACTCC
Klf4	<i>Mus musculus</i>	Sentido	GTGCCCCGACTAACC GTT
		Antisentido	GTCGTTGAACTCCTCGGTCT
Klf2	<i>Mus musculus</i>	Sentido	CTCAGCGAGCCTATCTTGCC
		Antisentido	CACGTTGTTTAGGTCCTCATCC
Stk24	<i>Mus musculus</i>	Sentido	TAAAGCGGCCAATGTTCTGCT
		Antisentido	GGCCAGTTCTATTGCGGTGAT
Stk25	<i>Mus musculus</i>	Sentido	CACCAGCATTCTCGTGTGGA
		Antisentido	GTGTGGTTGTCGATCCCCT
Gfap	<i>Mus musculus</i>	Sentido	CGGAGACGCATCACCTCTG
		Antisentido	TGGAGGAGTCATTGAGACAA
Cdh5	<i>Mus musculus</i>	Sentido	CCACTGCTTTGGGAGCCTT
		Antisentido	GGCAGGTAGCATGTTGGGG
Pecam1	<i>Mus musculus</i>	Sentido	ACGCTGGTGCTCTATGCAAG
		Antisentido	TCAGTTGCTGCCATTCATCA

7. OBTENCIÓN DE EXTRACTOS DE PROTEÍNAS

7.1. Extracción de proteína a partir de hígado de ratón

De los ratones de estudio, se escindió un fragmento de hígado tras perfundir al animal con PBS para limpiar de sangre los capilares y se conservó a -80°C . En el momento de la extracción proteica, se pesaron 50 mg y se colocaron en un tubo de polipropileno de 2 ml con una bola de acero autoclavada dentro; durante todo el proceso las muestras se mantuvieron en hielo.

Se añadieron 500 μl de tampón de lisis para tejido por muestra y se sometieron a homogenización en el *Tissue Lyser Sample Disruption* (Qiagen #85300) durante 5 minutos a 30 Hz.

El tampón de lisis para muestras de tejido se preparó en H_2O Milli-Q® con la siguiente composición: Tris-HCl pH 7.5 50 mM; EGTA pH 7.1 1 mM; EDTA 1 mM; Tritón X-100 1% v/v; Sacarosa 0,27 M; según la receta de la Dra. Cristina Iglesias García. Además, se añadieron los siguientes inhibidores de proteasas y fosfatasas para evitar la degradación general de las proteínas de los extractos: Na_3VO_4 1 mM; NaF 50 mM; $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ 5 mM; PMSF 1 mM.

A continuación, las muestras se centrifugaron a $11.600 \times g$ a 4°C durante 30 min y se recogió el sobrenadante donde se encontraba el extracto proteico, evitando el *pellet* al fondo del tubo y la posible capa superior de grasa.

7.2. Extracción de proteína en cultivo celular

Para extraer el extracto proteico total de un cultivo celular, primero se lavaron las células con PBS frío para eliminar restos celulares y se aspiró el exceso. Luego, situando las placas sobre hielo, se añadieron 150 μl de buffer RIPA de lisis a una $p60$ (21 cm^2), repartiéndolo por toda la superficie. Se dejaron las placas 10 minutos sobre el hielo, y se procedió entonces a recoger el volumen y los restos del cultivo con ayuda de un *scraper* (BD Falcon #353086) limpio, depositándolo en un tubo previamente frío. Este volumen se centrifugó 15 min a $11.600 \times g$ a 4°C ; el sobrenadante (el extracto proteico) se guardó en un nuevo tubo para preservarlo a -80°C o llevarlo a análisis.

La composición del tampón RIPA para la extracción proteica de cultivo era la recomendada por Raviv et al., (2004): Tris-HCl pH 7.4 25 mM; KCl 150 mM; EDTA 5 mM; Nonidet P-40 1%; desoxicolato de sodio 0,5%; SDS 0,1%. Se le añadieron los inhibidores de proteasas y fosfatasas siguientes, con concentración final: DTT 1 mM; Leupeptina 2 μM ; PMSF 4 mM; Aprotinina 2,3 $\mu\text{g/ml}$ (Sigma-Aldrich # A6279); NaF 4 mM; PhosSTOP™ (Roche #PHOSS-RO) según instrucciones del fabricante.

Tras obtener el extracto proteico, se procesaron las muestras para su cuantificación y análisis de la misma forma, independientemente de si provenían de tejido o cultivo celular.

7.3. CUANTIFICACIÓN DE LOS EXTRACTOS USANDO EL MÉTODO DE BRADFORD

La cuantificación de los extractos de proteínas se hizo siguiendo el método descrito por Bradford (Bradford, 1976). Para ello, se empleó el reactivo *Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate* (Bio-Rad #5000006) y se midió la absorbancia a 595 nm con un espectrofotómetro UV/Vis Thermo Spectronic BioMate 3 (Thermo Electron Corporation). La recta de calibrado se realizó a partir de concentraciones conocidas de inmunoglobulina G (Sigma-Aldrich #I5006). Cuando fue necesario, los extractos se diluyeron en el buffer de lisis hasta que la concentración se incluyera en la recta patrón.

8. ANÁLISIS DE LOS EXTRACTOS DE PROTEÍNAS POR WESTERN BLOT

El *Western Blot* es una técnica analítica utilizada para el estudio de proteínas. Permite la detección de una sola proteína dentro de un extracto proteico total. La especificidad de *Western Blot* se logra mediante la utilización de un anticuerpo que reconoce y se une a un epítipo único de la proteína de interés. La técnica del Western Blot comprende: preparación de muestras, separación de proteínas mediante electroforesis, transferencia e inmunodetección.

8.1. Preparación de las muestras para electroforesis en SDS-PAGE

Tras la cuantificación se prepararon las muestras con el tampón de carga (tampón Laemmli) y buffer de lisis para diluir si fuera necesario. El tampón Laemmli se preparó concentrado 5X con la siguiente composición: Tris-HCl pH 6,8 400 mM; SDS 10% p/v; β -mercaptoetanol 5% v/v; glicerol 50% v/v; azul de bromofenol 0,4% p/v.

Una vez preparadas las muestras, se llevaron a 95°C durante 10 minutos para asegurar la desnaturalización que compuestos del tampón Laemmli ya habían empezado, como el SDS y el β -mercaptoetanol. Las muestras preparadas se guardaron a -20°C o se usaron directamente.

8.2. Electroforesis en SDS-PAGE

Las muestras preparadas se resolvieron usando geles desnaturalizantes de poliacrilamida (SDS-PAGE), siguiendo el método descrito por Laemmli (Laemmli, 1970). Los geles, que constaban de una parte de gel concentrador y uno separador, permitían separar el total de proteínas extraídas según su peso molecular. Según fuese conveniente para el estudio de nuestras proteínas de interés, se varió el porcentaje de acrilamida del gel separador. Además, se usó un marcador de peso molecular de proteínas (PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder, Thermo Scientific™ #26619) junto a nuestras muestras.

La electroforesis se llevó a cabo con el sistema Mini-PROTEAN Tetra Cell (Bio-Rad) y se siguieron las recomendaciones de la casa comercial para el ensamblaje y colocación del equipo. Tras añadir el tampón de electroforesis (Tris-HCl 25 mM; Glicina 190 mM, SDS 0,1% p/v), se procedió a separar las proteínas de las muestras a un voltaje de 150 V, 400 mA durante aproximadamente 90 minutos.

8.3. Transferencia semi-seca

Las proteínas separadas mediante electroforesis se transfirieron a una membrana de PVDF Immobilon-P Transfer Membrane de 0,45 μ m (Millipore #IPVH00010), mediante la utilización de un equipo de transferencia semi-seca Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell (BIO-RAD). La membrana se trató previamente a la transferencia haciéndola cada vez más hidrófila, siguiendo las instrucciones del fabricante. La composición del tampón de transferencia semi-seca fue Tris-HCl 48 mM; Glicina 39 mM, SDS 0,037% p/v, metanol 20% v/v. El proceso se realizó a un voltaje constante de 25 V, 400 mA durante 90 minutos.

8.4. Inmunodetección

La membrana de PVDF se incubó en agitación durante 1 hora RT en solución de bloqueo (TBS-Tween-20 0,1% y 5% p/v leche en polvo). A continuación, se incubó con el anticuerpo primario, según las diluciones especificadas (Tabla 5), ON a 4°C y en agitación suave.

Tabla 5. Relación de anticuerpos primarios empleados en este estudio. WB: *Western Blot*; IF: inmunofluorescencia; FC: *Flow cytometry*.

Antígeno	Origen	Casa comercial	Catálogo	Técnica	Dilución
CCM3	ratón	Proteintech Group	#66440	WB	1:1000
α -tubulin	ratón	Sigma	#T5168	WB	1:4000
EGFR	conejo	Cell Signalling Technology	#4267	WB	1:1000
EGFR	conejo	Cell Signalling Technology	#4267	IF	1:50
EGFR	ratón	Abcam	#ab30	FC	1:1000
GAPDH	ratón	Santa Cruz Biotechnology	#sc-47724	WB	1:1000
VEGFR2	conejo	Cell Signalling Technology	#2479	WB	1:1000
STK24	conejo	Cell Signalling Technology	#3723	WB	1:1000
STK25	conejo	Proteintech Group	#25821	WB	1:1000
β -catenina	ratón	BD Biosciences	#610153	IF	1:200
GM130	conejo	Cell Signalling Technology	#2296	IF	1:200
VE-Cadherina	ratón	Santa Cruz Biotechnology	#sc-9989	IF	1:50

Al día siguiente, se lavó el exceso de anticuerpo primario 5 veces durante 5 minutos cada lavado, con TBS-Tween-20 0,1% en agitación vigorosa. Luego, se hibridó con el correspondiente anticuerpo secundario conjugado a la enzima HRP (Tabla 6), durante 1 hora RT y en agitación suave. A continuación, se lavó el exceso de anticuerpo secundario 5 veces durante 5 minutos cada lavado, con TBS-Tween-20 0,1% en agitación vigorosa. Tanto el anticuerpo primario como el secundario fueron diluidos en una solución de dilución de anticuerpo: TBS-Tween-20 0,1% y 5% p/v BSA (Fisher Bioreagents™ #BP9702).

La inmunodetección se realizó con el ECL® Chemiluminescent detection reagents (Thermo Scientific #32106), exponiendo una película de autorradiografía (Fujifilm #4741019289) sobre la membrana de PVDF.

Para analizar los resultados obtenidos, se escanearon las películas de autorradiografía con el escáner Epson Perfection V550 Photo; después, usando el programa ImageJ, se cuantificaron las bandas del *Western Blotting* mediante densitometría. Estos valores se relativizaron respecto a un control de carga (GAPDH o α -TUBULINA). El valor final fue normalizado respecto al grupo control de cada experimento que recibió el valor 1.

Tabla 6. Relación de anticuerpos secundarios empleados en este estudio. WB: *Western Blot*; IF: inmunofluorescencia; FC: *Flow cytometry*; HRP: *horseradish peroxidase*.

Antígeno	Conjugado	Origen	Casa comercial	Catálogo	Técnica	Dilución
IgG Ratón (H+L) 1 mg/ml	HRP	cabra	Invitrogen	#A16072	WB	1:8000
IgG Conejo (H+L) 1 mg/ml	HRP	burro	Invitrogen	#A16035	WB	1:10000
IgG Ratón (H+L)	Alexa Fluor 488	cabra	Invitrogen	#A11001	IF; FC	1:250; 1:500
IgG Conejo (H+L)	Alexa Fluor 488	cabra	Invitrogen	#A11008	IF	1:250
IgG Conejo (H+L)	Alexa Fluor 546	cabra	Invitrogen	#A11010	IF	1:250

9. INMUNOFLUORESCENCIA

La inmunofluorescencia es un procedimiento para detectar antígenos en contextos celulares utilizando anticuerpos. La inmunofluorescencia evalúa si las células de una muestra en particular expresan el antígeno, y en caso de que exista, también permite localizar en qué compartimentos subcelulares se encuentra. En nuestro caso, se realizó con células de cultivo celular.

9.1. PRETRATAMIENTO DE LOS CUBREOBJETOS

Antes de sembrar las células sobre los cubreobjetos de 12 mm (Rogo-Sampaic France #BPD011) en pocillos de placa MW-24, estos fueron pretratados para mejorar la adherencia de las células, ya que son de cristal. Según el tipo celular, se usó:

- *Poly-L-Lysine* (Sigma-Aldrich-Aldrich #P4832) para A549: se cubrieron los cubreobjetos y se incubó durante 5-30 minutos a RT, para después aspirar el exceso y sembrar sobre los cubreobjetos.

- Colágeno tipo I (Sigma-Aldrich #C3867) para hCMEC/D3 y HuVEC: se hizo una dilución hasta 500 µg/ml en H₂O Milli-Q® y se añadieron 190 µl (100 µl/cm²) a cada pocillo, dejándolo incubar entre 30 minutos y varias horas a 37°C, para después aspirar el exceso y sembrar sobre los cubreobjetos.

- Gelatina (Sigma-Aldrich #G9391) 0,1% en H₂O Milli-Q® para hCMEC/D3 y HuVEC: se cubrió el fondo del pocillo e y se incubó entre 30 minutos y varias horas a 37°C, para después aspirar el exceso y sembrar sobre los cubreobjetos.

9.2. FIJACIÓN, TINCIÓN Y MONTAJE DE LAS MUESTRAS

Se sembraron 48000 células/cm² en pocillos de MW-24 sobre los cubreobjetos pretratados en el caso de A549 y hCMEC/D3, y 24000 células/cm² en el caso de HuVEC. Se dejaron incubar 48 horas en condiciones estándar de cultivo, en el que se trataron con diferentes fármacos si era preciso y se procedió a la fijación de las células. Todos los pasos se realizaron a RT a no ser que se indique otra condición. Los lavados (de 5 minutos cada uno), permeabilización y bloqueo se realizaron en agitación suave. Primero se aspiró el medio de cultivo y se lavaron las células con PBS Ca²⁺/Mg²⁺. El PBS Ca²⁺/Mg²⁺ es necesario para mantener las uniones entre las células intactas. Después, se fijaron las células con

paraformaldehído (PFA) al 4% en PBS pH 7.4 durante 15 minutos y su exceso se eliminó al lavar tres veces con PBS $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$. A continuación, se procedió a permeabilizar durante 4 minutos con Triton X-100 (Sigma-Aldrich #X100) 0,5% v/v en PBS $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$, tras lo cual se volvieron a lavar tres veces con PBS $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ y se siguió con el bloqueo durante 1 hora al añadir a las muestras solución de bloqueo (10% FBS en PBS $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$); también se eliminó su exceso con tres lavados con PBS $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$. Los cubreobjetos se incubaron con el anticuerpo primario (Tabla 5) diluido en solución de bloqueo ON a 4 °C en una cámara húmeda, colocando el lado del cubreobjetos donde estaban adheridas las células en contacto con el anticuerpo. Tras la incubación, se lavaron tres veces con PBS $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ y se procedió a incubar con el anticuerpo secundario que llevaba conjugado un fluoróforo (Tabla 6), durante 1 hora RT en oscuridad. Se añadió también en este paso *Hoechst* 33342 (Sigma-Aldrich #B2261) a 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, un compuesto autofluorescente a 405 nm que tiñe el DNA y *Phalloidin*-TRITC (Sigma-Aldrich #P1951) a 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, si era requerido en el diseño experimental. Luego, se eliminó el exceso lavando tres veces con PBS $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$. Los cubreobjetos se montaron sobre portaobjetos de cristal (Deltalab™ #D100004), colocando el lado con células sobre una gota de 12 μl de medio de montaje Fluoroshield™ (Sigma-Aldrich #F6182). Tras unas horas de secado en condiciones de oscuridad, se sellaron los bordes de los cubreobjetos con laca de uñas y se procedió a visualizar las muestras.

9.3. OBTENCIÓN DE IMÁGENES MEDIANTE MICROSCOPIA

Las imágenes de inmunofluorescencia fueron obtenidas con un microscopio confocal (Confocal Microscopy Leica TCS SP5) con el objetivo APO CS 63x/1.32, usando como medio de transmisión aceite de inmersión (Immersionol™ 518F, Zeiss) y microscopio Leica DM4-B con cámara Leica K5; las imágenes se procesaron con el programa LAS X, versión 3.7.0.20979 (Leica) e ImageJ, versión 1.52s (*National Institute of Health*, EE. UU.).

9.4. MÉTODOS DE ANÁLISIS DE IMÁGENES DE INMUNOFLUORESCENCIA

Para cuantificar el área ocupada por el aparato de Golgi, se usó la herramienta de selección a mano alzada para el área ocupada la proteína GM130; el valor final fue normalizado respecto al grupo control de cada experimento que recibió el valor 1.

Para cuantificar las células con fibras de estrés, se representó el porcentaje de células analizadas que presentaban al menos una fibra de estrés atravesando el núcleo, siguiendo el método descrito por Zheng et al., 2010.

Para calcular el porcentaje de β -catenina o de VE-Cadherina presente en la membrana, se seleccionó el área total que ocupaba cada célula y el área delimitada por la membrana, de las cuales se midieron las intensidades de señal de cada una, tal como habían medido en otros trabajos (Colás et al., 2020). Luego, estas intensidades de señal se analizaron mediante la fórmula:

$$\text{Porcentaje de } \beta\text{-catenina/VE-Cadherina en membrana} = \frac{\frac{\text{Intensidad Total} - \text{Intensidad Interior}}{\text{Área Total}} - \frac{\text{Intensidad Total}}{\text{Área Total}}}{\frac{\text{Intensidad Total}}{\text{Área Total}}} \times 100$$



10. ENSAYO DE FORMACIÓN DE TUBOS DE CÉLULAS ENDOTELIALES

El ensayo de formación de tubos de células endoteliales o tubulogénesis es uno de los ensayos *in vitro* más usados para estudiar la capacidad que tienen estas células para formar estructuras similares a capilares al ofrecerles una matriz extracelular en cultivo celular y sembrarlas en subconfluencia. Las células endoteliales se adhieren y generan fuerzas mecánicas en la matriz de soporte, generando vías de guía que facilitan la migración celular. Los cordones de células resultantes formarán lúmenes huecos.

Para realizar el ensayo, primero se descongeló el Geltrex™ LDEV-Free Reduced Growth Factor Basement Membrane Matrix (Gibco #A1413201) a 4°C ON para que alcanzase el estado líquido. El Geltrex™ está compuesto, entre otros, de laminina, colágeno IV, entactina, proteoglicanos que imitan la matriz extracelular. El día del ensayo, se pipetearon 30 µl de Geltrex™ por pocillo de MW-96, evitando crear burbujas en la matriz y procurando cubrir la superficie del pocillo. Tanto la placa como el Geltrex™ se conservaron en hielo mientras se depositaba. Una vez preparados los pocillos, se dejaron al menos 30 minutos incubando a 37°C, para que el Geltrex™ solidificase. Se procedió entonces a tripsinizar las células endoteliales de estudio y ponerlas a una concentración de 150.000 células/ml; se depositaron 100 µl de las células a cada pocillo, consiguiendo 15.000 células. Con esta densidad se aseguró que, al sedimentar, las células quedasen en subconfluencia. Luego se añadió VEGF a concentración final 50 ng/ml y se incubó la placa en condiciones normales ON. Al día siguiente se incubaron con calceína AM a 0,1 µM a 37° durante 30 minutos para que quedase perfilado el citoplasma de las células al formar túbulos. Para analizar los resultados obtenidos en el ensayo, se fotografiaron las estructuras usando el microscopio invertido de Fluorescencia IX51 (Olympus) y una cámara digital DP72 (Olympus), y se examinaron varios parámetros relevantes en la formación de los túbulos usando el programa de análisis *AngioTool* (Zudaire et al., 2011).

11. CITOMETRÍA DE FLUJO PARA ESTUDIO DE EGFR

Para estudiar la expresión del EGFR en la superficie de la membrana de las células y comparar diferentes poblaciones celulares, se eligió la técnica de citometría de flujo.

Se tripsinizaron células A549 según protocolo estándar y se recogieron en medio de cultivo completo (10% FBS y 1% P/S) frío. Luego se contaron las células usando el método del *Trypan Blue* para estimar el número de células viables. Las células se lavaron dos veces más con PBS frío mediante aspiración-centrifugación (300 x g, 5 minutos, 4°C). Se resuspendieron en 100 µl de formaldehído al 4% (en PBS pH 7,4) por cada millón de células; luego se mezclaron bien para disociar el *pellet*. La fijación duró 15 minutos a RT en un agitador rotacional tipo noria, tras lo cual se lavaron por centrifugación con un exceso de PBS frío dos veces más. Se lavaron dos veces más las células con PBS frío mediante aspiración-centrifugación (300 x g, 5 minutos, 4°C). Para incubar con el anticuerpo primario, se colocaron las células en tubos de 1,5 ml y después se resuspendieron en 100 µl de PBS-1% BSA a la dilución recomendada de anticuerpo primario (Tabla 5). En este caso, se usó el anticuerpo anti-EGFR (abcam #ab30), cuyo epítipo es el dominio extracelular del EGFR y que por tanto se unía solo a ese fragmento del receptor. Se llevó a cabo la incubación durante 1 hora a RT en un agitador rotacional tipo noria. Luego se lavaron dos veces por centrifugación aspiración-centrifugación con PBS. Se resuspendieron en 100 µl de anticuerpo secundario diluido, preparado en PBS-1% BSA a la dilución recomendada. En este caso, se usó el *Goat anti-Mouse IgG (H+L) Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 488* (Invitrogen #A11001) a una concentración final de 4 µg/ml. También se prepararon células a las que no se le añadió el anticuerpo secundario para que sirviesen de control negativo en el proceso de citometría. Se incubó con el anticuerpo durante

30 minutos a RT en un agitador rotacional tipo noria, protegiendo los tubos de la luz en todo momento a partir de este paso; luego, se lavó el exceso dos veces por centrifugación – aspiración con PBS. Finalmente, se resuspendieron las células en 500 μ l de PBS. Las muestras (10.000 células por muestra) se analizaron en un citómetro de flujo BD Accuri C6 (Becton Dickinson, Reino Unido). Los parámetros analizados fueron la dispersión frontal de la luz visible (*Forward scatter*, FSC) y la dispersión ortogonal de la luz visible (*Side scatter*, SSC). El programa FlowJo (versión 10.1) fue el utilizado para el análisis.

12. ENSAYO DE VIABILIDAD CELULAR POR REDUCCIÓN DE MTT

El ensayo MTT es una técnica colorimétrica que se usa para medir la actividad metabólica celular como indicador de la viabilidad, proliferación y citotoxicidad celular. Se basa la reducción de una sal de tetrazolio amarilla (*Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide*; MTT) a cristales de formazán púrpura que llevan a cabo las células que son metabólicamente activas. Los cristales de formazán insolubles se disuelven usando DMSO y la solución coloreada resultante se cuantifica midiendo la absorbancia a 570 nm usando un espectrofotómetro. Por tanto, cuanto más alta sea la absorbancia, más presencia de formazán; cuanto más formazán, mayor será el número de células viables y metabólicamente activas. De esta forma, indirectamente podemos estimar cómo afecta a la viabilidad celular los compuestos por estudiar.

Para realizar el experimento, se sembraron 10.000 células hCMEC/D3 por pocillo de MW-96 y se incubaron ON en condiciones normales de cultivo celular. Al día siguiente, se añadió el reactivo o tratamiento de estudio, a la concentración que se consideraba en el diseño experimental. Tras 48 horas con el tratamiento, se cambió el medio continuando con las mismas condiciones de tratamiento y se devolvieron las células a incubación durante otras 48 horas, habiendo pasado 96 horas en total. Tras estas 96 horas desde el inicio del tratamiento, se substituyó el medio y se añadió *Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide* (Sigma #M2128) a una concentración final de 0,5 mg/ml; se dejó incubando 4 horas en condiciones normales de cultivo celular. Después, se retiró cuidadosamente el medio de los pocillos y se añadieron 100 μ l de DMSO (Fisher Reagents #BP231-1) a cada pocillo. Se agitó vigorosamente para que se homogenizara el contenido de los pocillos y se midió la absorbancia a 570 nm; también a 690 nm, para ser considerado *background* en las mediciones.

13. ENSAYO DE DETECCIÓN DE ACTIVIDAD CASPASA 3/7

La viabilidad celular se analizó utilizando un sustrato fluorogénico de las enzimas caspasa 3 y caspasa 7. Ambas enzimas, con actividad proteasa, se activan cuando la célula recibe estímulos de muerte celular y activa la ruta apoptótica.

El *CellEvent™ Caspase-3/7 Green Detection Reagent* (Invitrogen #C10423) es un péptido conjugado con un fluorocromo que, al ser escindido por las caspasas 3/7, es capaz de unirse al DNA y producir una señal fluorogénica. Por tanto, cada núcleo que tenga señal corresponde a una célula en apoptosis y pueden ser cuantificados.

El día anterior al ensayo, se sembraron 90.000 células en pocillos de MW-24 y se incubaron en condiciones normales ON. Al día siguiente, se substituyó el medio por medio fresco con el reactivo *CellEvent™ Caspase-3/7 Green Detection* a concentración final 8 μ M y el fármaco de estudio en la concentración correspondiente. Se incubaron las células durante un total de 48 horas. Entonces se fotografiaron cada 30 minutos 4 áreas diferentes de cada condición en cada experimento independiente. Para ello, se usó el microscopio Leica DMI 6000 B acoplado a cámara Leica DFC360 FX y controlador CTR 7000 HS, que mantuvo las condiciones de

incubación estándar de cultivo celular. Las imágenes se usaron para cuantificar el número de núcleos fluorescentes (células apoptóticas) usando el plugin *Cell Counter* de ImageJ.

14. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Todos los procedimientos experimentales que utilizaron animales fueron llevados a cabo bajo la supervisión del Comité ético de la Universidad de Santiago de Compostela procedimiento del Profesor Juan Bautista Zalvide Torrente: 15010/14/003 y 15010/19/003 y siguiendo la normativa vigente:

- Directiva 2010/63/UE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 22 de septiembre, relativa a la protección de los animales utilizados para fines científicos.

- Ley estatal 32/2007, de 7 de noviembre, para el cuidado de los animales, en su explotación, transporte, experimentación y sacrificio.

- Real decreto 53/2013, de 1 de febrero, por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia.

- Decreto 296/2008, de 30 de diciembre, de protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos, incluida la docencia, y por el que se crea el Registro de los centros de cría, de suministradores y usuarios y la Comisión Gallega de Bienestar de los Animales de Experimentación.

Todos los procedimientos experimentales con animales incluidos en esta tesis fueron realizados en el centro usuario: animalario del CiMUS (Centro de Investigación en Medicina Molecular y Enfermedades Crónicas) y animalario del CEBEGA (Centro de Biomedicina Experimental de Galicia).

En cuanto al número de animales, se ha intentado evitar la duplicación innecesaria de experimentos y reducir al máximo dentro de cada grupo experimental sin llegar a comprometer la calidad de los resultados. En algunos casos se ha valorado el uso de métodos alternativos (cultivo celular), para poner a punto primero el modelo de estudio y utilizar técnicas que redujeran al máximo el estrés causado por dolor, sufrimiento o daño duradero en los animales.

14.1. ESTABULACIÓN

Los animales fueron estabulados en condiciones controladas de luz (12 horas luz/12 horas oscuridad) y temperatura (21 ± 2 °C); se mantuvieron en condiciones de estabulación SPF (*Specific-Pathogen Free*), sometidos periódicamente a exámenes sanitarios. Se mantuvieron con acceso *ad libitum* a comida y agua. Para su mantenimiento general y cría se alimentaron con un pienso sólido comercial que constituía una dieta estándar.

14.2. MODELOS ANIMALES

Los ratones utilizados tenían un fondo genético mixto de tipo 129sv/C57BL6J (*Background* (B6;129)).

En este estudio se han empleado los siguientes animales transgénicos:

- $Stk24^{em6ic}$: Se trata de una línea con delección intragénica de una región de 50 kb en el gen *Stk24*. Dos secuencias guías de RNA (Tabla 7) se usaron para dirigir la delección en el exón 2 y el intrón 10 del gen utilizando la técnica CRISPR/Cas9. El diseño de las secuencias guías necesarias para originar la línea fue realizado en nuestro grupo y se recurrió a la tecnología del *Cell Migration and Invasion Group*,

del Instituto Curie (*Institut Curie*) (París, Francia) para obtener los animales de estudio. Su protocolo ha sido publicado en detalle (El Marjou et al., 2021).

Tabla 7. Secuencia de las guías de RNA usadas para crear la línea de ratones *Stk24*^{em6ic}.

Nombre	Diana	Secuencia 5'-3'
gRNA_1	Exón 2	CCCUACGUCACCAAGUACUA
gRNA_2	Intrón 10	CCCUAAGGUU AACACCCUGU

- Tg(Cdh5-cre/ERT2)1Rha: Estos animales poseen la modificación Cdh5-Cre/ERT2, que codifica una recombinasa Cre fusionada a un dominio de unión al ligando de estrógeno mutante (ERT2) que requiere la presencia de tamoxifeno para su actividad, lo cual los convierte en mutantes condicionales. Además, la expresión de este constructo está bajo el control del promotor del gen Cdh5 (o VE-Cadherina); por tanto, los ratones que expresen Cre eliminarán secuencias de DNA flanqueadas por secuencias loxP específicamente en células que expresen Cdh5 (células endoteliales). Esta condición los convierte también en mutantes tejido-específicos. Esta línea transgénica fue cedida generosamente por el Profesor Dr. Ralf H. Adams, del Instituto Max Planck de Biomedicina Molecular (*Max-Planck-Institut für molekulare Biomedizin*) (Múnich, Alemania) y descrita en detalle en sus trabajos (Wang et al., 2010).
- *Stk25*^{tm1.1Bwh}: Se trata de una línea transgénica con inserción de sitios loxP flanqueando los exones 4 y 5 del gen *Stk25*. Fue cedida amablemente por el Profesor Dr. Brian W. Howell, de la Universidad Estatal de Nueva York (*State University of New York, SUNY*) (Nueva York, EE.UU.) y descrita en detalle en sus trabajos (Matsuki et al., 2013).

14.3. EXTRACCIÓN DE DNA Y GENOTIPADO DE LOS ANIMALES

Para obtener el DNA de los animales y su posterior uso en PCR, se utilizó el *Phire Animal Tissue Direct PCR Kit* (Thermo Scientific™ # F140WH) y se siguieron los procedimientos recomendados por la casa comercial, usando un fragmento de cola de unos 2 mm de longitud tomada a las tres semanas de vida de los animales según los procedimientos aprobados en el proyecto de investigación.

14.3.1. Genotipado de ratones *Stk24*

Para genotipar el gen *Stk24*, se usó un oligonucleótido *forward* que hibridaba en el exón 2 y dos oligonucleótidos *reverse* que hibridaban en el exón 2 o en el intrón 10 del gen para detectar el alelo *wild type* o el que carece de la región entre el exón 2 y el intrón 10 (Figura 11A). Tras realizar la correspondiente PCR usando dos combinaciones distintas de cebadores, el DNA amplificado se separó en un gel de agarosa de 1,5%. Al revelar el resultado, podían verse bandas de tamaño 488 y/o 405 nucleótidos: una única banda de 488 nucleótidos pertenecía a un animal WT (Wild Type; +/+); dos bandas de 488 y 405 nucleótidos a un animal heterocigoto y una única banda de 405 nucleótidos pertenecía a un animal con la modificación en ambos alelos (Figura 11B).

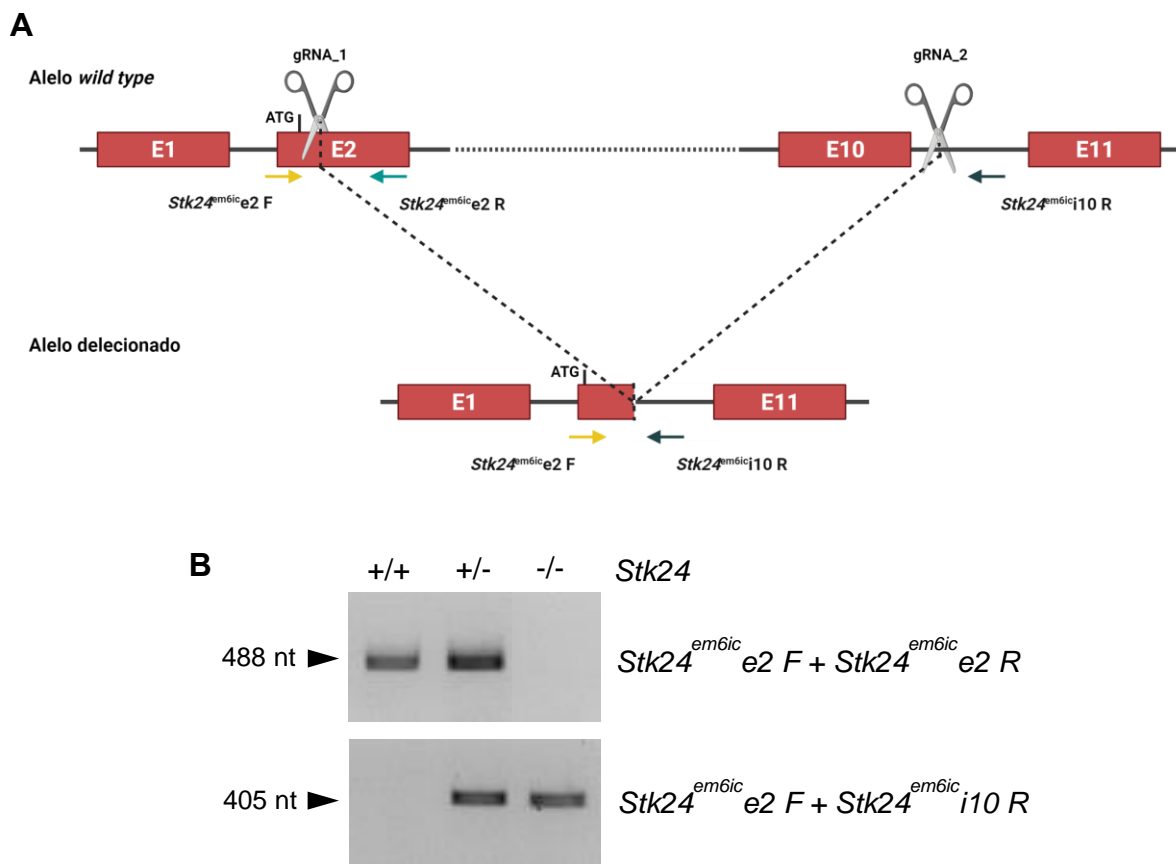


Figura 11. Caracterización génica de la línea *Stk24^{em6ic}*. A. Esquema de deleción del gen *Stk24* mediante tecnología CRISPR/Cas9; creado con BioRender.com. **B.** Resultado de PCR al genotipar.

Las secuencias de los oligonucleótidos utilizados pueden consultarse en la Tabla 8 y las condiciones de temperatura y tiempo del programa de PCR se muestran a continuación:

Paso	Temperatura (°C)	Tiempo
1	95	3 minutos
2	95	30 segundos
3	59	30 segundos
4	72	45 segundos
5	Volver a paso 2; durante 30 ciclos	
6	72	10 minutos
7	4	∞

14.3.2. Genotipado de ratones *Cdh5-Cre*

La caracterización de la línea *Cdh5-cre/ERT2* se hizo siguiendo las indicaciones de los investigadores que desarrollaron de este modelo animal, Wang et al., 2010. Al realizar la PCR podían aparecer dos resultados: presencia o ausencia de una banda de 280 nucleótidos de tamaño (Figura 12), lo cual indicaba que el animal poseía o no la capacidad de expresar la recombinasa Cre.

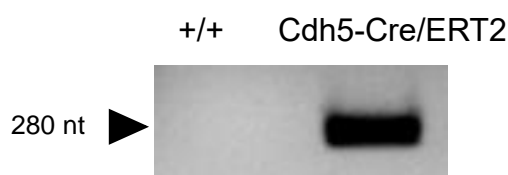


Figura 12. PCR del genotipado de Cdh5-Cre/ERT2.

Las condiciones de temperatura y tiempo del programa de PCR se muestran a continuación y las secuencias de los oligonucleótidos utilizados, en la Tabla 8.

Paso	Temperatura (°C)	Tiempo
1	95	3 minutos
2	95	30 segundos
3	59	30 segundos
4	72	45 segundos
5	Volver a paso 2; durante 30 ciclos	
6	72	10 minutos
7	4	∞

14.3.3. Genotipado de ratones *Stk25 loxP*

La caracterización de la línea se realizó siguiendo las condiciones incluídas en Matsuki et al., 2013, donde describen este modelo y su método para diferenciar un animal *wild type* (+/+) de otro que presentara el alelo condicional en heterocigosis (+/fl) u homocigosis (fl/fl) (Figura 13): una única banda de 293 nucleótidos pertenecía a un animal WT; dos bandas de 293 y 375 nucleótidos a un animal heterocigoto y una única banda de 375 nucleótidos pertenecía a un animal con la modificación en ambos alelos.

La toma de tejido para genotipar se hizo al mismo tiempo que la inyección.

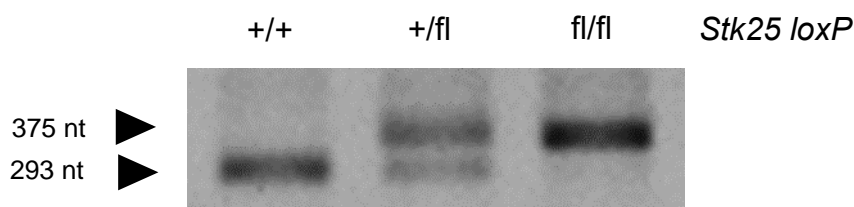


Figura 13. PCR del genotipado de STK25 loxP.

Las condiciones de temperatura y tiempo del programa de PCR se muestran a continuación y las secuencias de los oligonucleótidos utilizados, en la Tabla 8.

Paso	Temperatura (°C)	Tiempo
1	95	15 minutos
2	94	30 segundos
3	59	30 segundos
4	72	45 segundos
5	Volver a paso 2; durante 35 ciclos	
6	72	7 minutos
7	4	∞

Tabla 8. Secuencia de los oligonucleótidos usados para genotipar a los ratones de estudio.

Nombre	Secuencia 5'-3'
<i>Stk24^{em6ic}e2</i> F	TGTCATAGAAATTGGACAGCTCCT
<i>Stk24^{em6ic}e2</i> R	TTTCGGTGATAACGACGCCA
<i>Stk24^{em6ic}i10</i> R	TACACATGGCAACCCTGAGC
Cdh5-Cre F	CTGAGTGGCAGATAAAGAAGG
Cdh5-Cre R	CAAACGGACAGAAGCATTT
<i>Stk25loxP</i> F	TCAGAGAGGCCTTTTCTCCA
<i>Stk25loxP</i> R	GCCAGCCTGGTCTACAGATT

Las incubaciones se hicieron en el termociclador T-personal Thermal Cycler (Biometra).

Tras realizar las PCRs, se lleva a cabo la separación de los fragmentos de DNA mediante electroforesis en gel de agarosa. El gel se preparó a una concentración de agarosa del 1,5% en tampón de electroforesis TAE y se le aplicó un voltaje de 150 V y una intensidad máxima de 400 mA durante 40-50 minutos. Las bandas resultantes se visualizaron la incorporación de bromuro de etidio 0,002% (Sigma-Aldrich # E8751) al gel, usando un transiluminador de luz ultravioleta Gel Doc 1000 (Bio-Rad). Se utilizó el marcador Thermo Scientific™ O'GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Thermo Scientific™ #SM1163).

14.4. INDUCCIÓN DE LA EXPRESIÓN DE CRE RECOMBINASA

A los animales neonatos se les administró una única dosis de tamoxifeno 24 h tras el nacimiento (P1; día postnatal 1) a las 8:00 horas de la mañana en todos los casos. No se hizo ninguna distinción por sexo y el orden de administración de las inyecciones fue aleatorio. Para preparar la solución inyectable y lograr una correcta administración del fármaco, se siguieron las recomendaciones de Pitulescu et al., (2010), introduciendo algunas modificaciones.

14.4.1. Preparación y administración de tamoxifeno

Se añadieron 150 µl de EtOH 100% a 10 mg de tamoxifeno (Sigma-Aldrich #T5648) y se agitó vigorosamente hasta conseguir que los cristales de tamoxifeno se disolvieran. A continuación, se añadieron 850 µl de aceite de sésamo (Sigma-Aldrich #S3547) para conseguir una solución a 10 mg/ml. Esta solución se volvió a agitar para conseguir una solución lo más homogénea posible, usándose como un *stock* 10X, que, conservado a 4°C y en oscuridad, podía ser utilizado hasta 72 horas tras la reconstitución. En el momento de la administración, se diluyó el *stock* con aceite de sésamo, preparando suficiente volumen para el número de animales a inyectar; luego se llenaron jeringas de 1 ml, teniendo cuidado con las posibles burbujas que se pudieran haber formado. Colocando una aguja de calibre 27G, se procedió a la inyección.

Para evitar posteriores rechazos o canibalismo por parte de los progenitores, se frotaron las manos del manipulador en el lecho de la cubeta donde se estabulaban los animales. Luego, se colocó al ratón neonato sobre su lado izquierdo con la cabeza hacia abajo; manteniendo la cola entre los dedos medio e índice y la cabeza entre el pulgar y el dedo anular, sin ejercer mucha presión (Figura 14).



Figura 14. Representación gráfica de la posición en la que se coloca el ratón neonato para la inyección de tamoxifeno. Ilustración original de Mar García Colomer.

Una vez inmovilizado, se introdujo la aguja con el bisel hacia arriba hasta el estómago del ratón, reconocible debido a la leche blanca contenida dentro. Entonces se inyectaron 50 μ l de solución de tamoxifeno 1 mg/ml y se esperó unos segundos tras la inyección sin retirar la aguja para evitar que existieran fugas. También se evitó que quedase aceite en la piel del ratón para que, al devolverlo con sus progenitores, no quedasen olores en las crías que desencadenasen comportamientos de canibalismo. Los neonatos eran devueltos a sus padres hasta el día del sacrificio.

14.4.2. Recolección de órganos

Se esperó hasta el día postnatal 6 y 8 (P6-P8) para la recolección de los encéfalos (Figura 15). En esos momentos, se sacrificaron los animales por decapitación, se les diseccionó el cráneo y se retiró cuidadosamente el encéfalo en una sola pieza para preservar la estructura histológica, poniendo especial mimo en cerebro y cerebelo.

Aquellos destinados a fotografiarse con el microscopio estereoscópico Leica M165 FC acoplado a la cámara Leica DFC7000 Z, fueron sumergidos en una solución de formalina al 10% p/v durante al menos 24 horas antes de hacer las capturas. Luego, se usaron las mismas muestras para análisis histológico, por lo que cambiaron de formalina 10% a EtOH 70% v/v hasta el momento de procesarlos.

Aquellos que se usaron para aislar células endoteliales, se recolectaron en ECB (*Endothelial Cell Buffer*) frío y se mantuvieron en hielo hasta que se continuó con el proceso de aislamiento.

Las muestras de tejido conservadas en EtOH 70% v/v hasta el momento de su procesamiento se embebieron en parafina mediante un procedimiento estándar. En el caso de los encéfalos, se dividieron en dos mediante un corte en el eje anteroposterior, obteniendo mitad derecha e izquierda. La mitad derecha se usó para hacer cortes parasagitales de 4 μ m y teñirlos con un protocolo estándar de hematoxilina-eosina o inmunohistoquímica. Para los bazo se procesaron los órganos enteros.

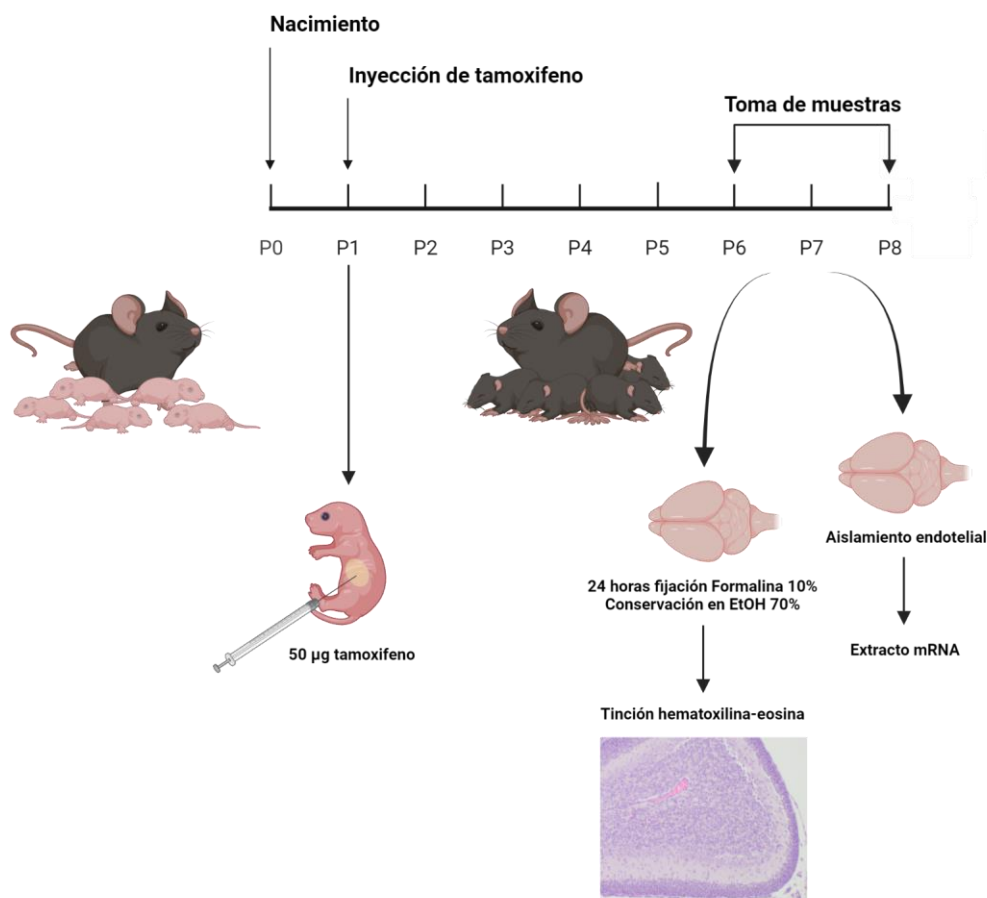


Figura 15. Esquema temporal de los experimentos llevados a cabo. El día después de nacer (P1) se le inyectan 50 µg de tamoxifeno intragástricamente a todas las crías de la camada. Después, se devuelven con los progenitores hasta el día de sacrificio; los encéfalos de los animales son recogidos y se analizan mediante tinción hematoxilina-eosina o aislamiento de células endoteliales. Ilustración creada con BioRender.com.

14.5. TÉCNICAS HISTOLÓGICAS Y ANÁLISIS

Se prepararon y tiñeron secciones de 3 µm usando un procedimiento estándar de hematoxilina-eosina (BioOptica) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las secciones fueron expuestas a soluciones alcohólicas de concentración decreciente (100°, 95° y 70°); después fueron lavadas con agua destilada, se sumergieron en solución de hematoxilina (BioOptica) durante 10 minutos, se lavaron de nuevo y fueron sometidas a alcohol ácido. Se sumergieron 30 segundos en eosina (BioOptica). Después, las secciones fueron lavadas en agua destilada, deshidratadas, secadas a 37°C durante 30 minutos y montadas en medio de montaje permanente (sin alcohol y xileno). Las preparaciones histológicas se visualizaron con un microscopio Olympus BX43F y se tomaron imágenes con una cámara SC180 acoplada.

Para la cuantificación del porcentaje de área vascular, se analizaron secciones teñidas con hematoxilina-eosina de cerebelo o corteza cerebral usando el programa ImageJ. Las mediciones se hicieron tomando en cuenta el área ocupada por el cerebelo o la corteza y se descartó el ocupado por las meninges. Utilizando la herramienta de selección a mano alzada, se seleccionó el área ocupada por los vasos sanguíneos, así como el área total del cerebelo o de la corteza cerebral; luego, el área de los vasos se dividió por el área de todo el órgano en la misma sección.

Alternativamente, se usaron secciones de parafina para la detección inmunohistoquímica de CD31 (abcam28364; Abcam) realizando una incubación ON a 4°C, usando una dilución 1:1000 después de la recuperación del antígeno usando PT Link con pH alto (Dako-Agilent). Las secciones se tiñeron utilizando una tinción automática AutostainerLink 48 Stainer (Dako-Agilent) con el sistema EnVision™ FLEX/HRP (Dako-Agilent) para la detección de señales con DAB.

Para cuantificar la señal del marcaje con CD31, se delimitaron las paredes de los vasos dilatados, evitando la señal residual que podía aportar la peroxidasa endógena de los eritrocitos contenidos en los vasos. Para ello se usó la herramienta de selección a mano alzada de ImageJ. Como muestra de señal de fondo, se seleccionó área del parénquima neuronal.

14.6. AISLAMIENTO DE CÉLULAS ENDOTELIALES DE ENCÉFALO DE RATÓN

Para realizar un análisis mediante *qPCR* y estudiar la expresión génica de las células endoteliales de los encéfalos de los ratones a los que se les inducía la formación de lesiones, se procedió a realizar un procedimiento de aislamiento de estas células en concreto.

El método de aislamiento se optimizó siguiendo las directrices del protocolo diseñada por Czupalla et al., 2018 y las recomendaciones y materiales sugeridos por el grupo *Vascular Signaling and Cancer Group* del Centro Alemán de Investigación del Cáncer (*DKFZ, Deutsches Krebsforschungszentrum*) (Heidelberg, Alemania), liderado por el Profesor Dr. Andreas Fischer. Los volúmenes indicados se referirán a un solo encéfalo de ratón de P8-P10, con un peso medio de 300 mg.

14.6.1. Incubación de las *Dynabeads*™ y el anticuerpo

El día anterior al sacrificio de los animales, se obtuvieron 10 µl de *Dynabeads*™ *Sheep Anti-Rat IgG* (Invitrogen™ #11035) que después se lavaron tres veces con 1 ml de BSA al 0,1% p/v utilizando una gradilla magnética *DynaMag*™-2 *Magnet* (Invitrogen™ #12321D). A continuación, se resuspendieron en 66,7 µl de BSA al 0,1%. Se añadieron 6,7 µl de anticuerpo de rata anti CD31 de ratón (clon MEC13.3, BD Pharmingen #550274) y se dejó incubar ON a 4°C en un agitador rotacional tipo noria.

14.6.2. Recolección de tejido cerebral

Los ratones se sacrificaron mediante decapitación y se les extrajo cuidadosamente el encéfalo del cráneo a temperatura ambiente. A continuación, se colocaron los encéfalos en un tubo Falcon enterrado en hielo y se cubrieron con ECB (*Endothelial Cell Buffer*; NaCl 153 mM; KCl 5,6 mM; CaCl₂ 1,7 mM; MgCl₂ 1,2 mM; HEPES 15 mM; BSA 1% p/v) frío conforme se fueron diseccionando.

14.6.3. Homogenización del tejidos y primera digestión.

Encéfalos enteros del mismo genotipado se lavaron tres veces agregando repetidamente ECB, seguido de una aspiración cuidadosa con una bomba de vacío. Después de la última aspiración, se trituró el tejido con dos bisturís estériles en trozos pequeños hasta que se formó una emulsión homogénea. Se agregaron 4 ml de ECB a la placa de Petri y se resuspendió el tejido pipeteando hacia arriba y hacia abajo con una pipeta de 10 ml, tratando de recuperar todo el tejido. Esta suspensión se transfirió a un tubo Falcon de 15 ml colocado en hielo y se centrifugó durante 7 minutos a 300 x *g* a 4°C; el sobrenadante se aspiró con una bomba de

vacío. Se calculó el volumen del *pellet* (para un encéfalo, aproximadamente 0,25 ml) y se agregó ECB, así como colagenasa tipo II (PanBiotech #LS0004174) precalentada a 37°C, siendo el *pellet* un tercio del volumen final y quedando la colagenasa a 2,5 mg/ml (por ejemplo: *pellet* 0,25 ml + 0,313 ml ECB + 0,188 ml colagenasa tipo II). La mezcla se incubó un baño de agua a 37°C durante 50 minutos, agitando el tubo cada 10 minutos para homogenizar la suspensión hasta que no se vieran fragmentos grandes. Después, se detuvo la digestión enzimática agregando ECB y se resuspendió cuidadosamente la suspensión, tras lo que se centrifugó durante 7 minutos a 300 x g a 4°C y se eliminó el sobrenadante con una bomba de vacío.

14.6.4. Eliminación de mielina y lisis de eritrocitos

Tras esta primera digestión, se agregaron 4 ml de BSA fracción V al 25% p/v (Fisher Chemical #A/1278/46) al *pellet* obtenido y se resuspendió. Entonces, se realizó una centrifugación de 30 minutos a 1000 x g a 4°C para separar la mielina y enriquecer el *pellet* con fragmentos capilares; la capa de mielina, junto con el sobrenadante, se aspiraron con una bomba de vacío. Este *pellet* se resuspendió en 2 ml de *Red Blood Cells lysis buffer for mouse* (Alfa Aesir #J62150) durante 90 segundos a RT con agitación ocasional, para eliminar los eritrocitos. La lisis se detuvo añadiendo ECB y se centrifugó 7 minutos a 300 x g 4°C, tras lo cual se aspiró el sobrenadante.

14.6.5. Segunda digestión

Para proceder a la segunda digestión y obtener una suspensión de células individuales, se resuspendió el *pellet* en ECB. A continuación, manteniendo la solución en un baño de agua a 37°C, se añade Colagenasa/Dispasa (Roche #10269638001) con concentración final de 10 µg/ml durante 13 minutos. Se añadió entonces 1 µg/ml de DNasa I (Roche #11284932001), pipeteando unas cuantas veces con una micropipeta, y dejando que actuase durante 2 minutos más en el baño de agua a 37°C. La digestión se detuvo añadiendo ECB, invirtiendo suavemente el tubo y centrifugándola durante 7 minutos a 300 x g 4°C. Luego, se deshechó el sobrenadante y se resuspendió el sedimento en 670 µl de ECB en un tubo de 1,5 ml.

14.6.6. Aislamiento con las *Dynabeads*™

Se recuperaron las *Dynabeads*™ que se habían dejado incubando ON y se lavaron tres veces con ECB; a continuación, se resuspendieron en 73,4 µl de ECB. Se recogió este volumen y se añadió a la resuspensión celular. Se dejó incubar en un agitador rotacional tipo noria durante 60 minutos a RT, tras lo que se centrifugó durante 10 minutos a 200 x g a 4°C. El sobrenadante resultante se aspiró y se resuspendió en PBS-BSA al 0,1% p/v. Utilizando gradilla magnética, se lavaron tres veces con PBS-BSA al 0,1% p/v las *Dynabeads*™. Del primer lavado, se recuperó el *pellet* (en el que no estaban incluidas *Dynabeads*™) para considerarlo extracto de células no endoteliales, tras centrifugarlo 5 minutos a 300 x g a 4°C. Luego se le añadieron 41,7 µl de TRizol. También se le añadió el mismo volumen de TRizol al sedimento de *Dynabeads*™, que conformaba el extracto de células endoteliales. Ambos se incubaron 5 minutos a RT y se congelaron hasta la extracción de mRNA. Luego se continuó con el protocolo general de purificación de RNA y la realización de *qPCR*.

15. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico se realizó utilizando el programa GraphPad Prism (versión 8.0.2). Cuando se compararon dos grupos, se aplicó el test *t de Student* a dos colas ya que compara las medias de dos poblaciones desapareadas asumiendo que siguen una distribución normal. Al comparar más de dos grupos, se utilizó el análisis ANOVA para determinar si había diferencia entre las medias de tres o más grupos experimentales asumiendo una distribución normal. En caso de aceptar la hipótesis alternativa que indicaba que sí había diferencias entre las medias, se realizó un test post-hoc de Bonferroni para comprobar qué medias son las que causaron significación.

Todos los gráficos representan la media \pm error estándar de la media (SEM). Los datos con $p < 0.05$ han sido considerados estadísticamente significativos (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$; ****, $p < 0.0001$). El tamaño muestral de cada grupo experimental aparece indicado en los pies de figura de los capítulos de Resultados.

RESULTADOS

CAPÍTULO I: PAPEL DEL EGFR EN LAS CCM

Este capítulo reproduce contenidos del siguiente artículo:

“High Levels of Receptor Tyrosine Kinases in CCM3-Deficient Cells Increase Their Susceptibility to Tyrosine Kinase Inhibition”

Miriam Sartages^{1,†}, Ebel Florida^{1,2,†}, Mar García-Colomer¹, Cristina Iglesias¹, Manuel Macía³, Patricia Peñas³, Pierre-Olivier Couraud⁴, Ignacio A. Romero⁵, Babette Weksler⁶, Celia M. Pombo¹; Juan Zalvide¹; *Biomedicines* 2020, 8(12), 624. Editorial: MDPI; ISSN: 2227-9059. DOI: 10.3390/biomedicines8120624

[†]Ambos autores contribuyeron igualmente en este trabajo.

¹Departamento de Fisiología, Centro Singular de Medicina Molecular e Enfermedades Crónicas (CiMUS), Instituto Sanitario de Santiago de Compostela (IDIS), Universidad de Santiago de Compostela, 15703 Santiago de Compostela, España; ²IQVIA RDS Ireland Limited, Eastpoint Business Park, Estuary House, Fairview, Dublín 3, D03 K7W7 Leinster, Irlanda; ³Servicio de Obstetricia y Ginecología Hospital Clínico Universitario Santiago, 15703 Santiago de Compostela, España; ⁴INSERM, U1016, Institut Cochin, 22 Rue Mechain, 75014 París, Francia; ⁵Departmento de Life, Health and Chemical Sciences, The Open University, Milton Keynes MK7 6AA, UK; ⁶Weill Medical College, Cornell University, 1300 York Ave, Nueva York, NY 10065, Estados Unidos

El gen *CCM3* se ha relacionado con un 40 % de los casos de malformaciones cavernosas (Craig et al., 1998) y pacientes con *CCM3* mutado presentan mayor riesgo de hemorragias cerebrales (Denier et al., 2006; Riant et al., 2013). Además, *CCM3* se une a la familia de proteína quinasas GCKIII, objeto de interés en nuestro laboratorio. Por este motivo, fue este el gen elegido como modelo de estudio.

Dado que las malformaciones cavernosas afectan principalmente a la función celular endotelial, se optó por utilizar cultivos de células de la misma naturaleza, como las células HuVEC, que son células primarias endoteliales derivadas de cordón umbilical y son ampliamente utilizadas para el estudio de patologías y funciones que les afecten (Chen et al., 2009; Macek Jilkova et al., 2014).

Las células hCMEC/D3 se usan frecuentemente como un modelo endotelial para llevar a cabo estudios de la función de la barrera hematoencefálica (Marcos-Ramiro et al., 2016; Li et al., 2019); al producirse las malformaciones principalmente en el sistema nervioso central, consideramos que podrían ser un valioso recurso, además de permitirnos usar una línea celular sin tantas limitaciones de pase como las HuVEC.

A pesar de que las células A549 son epiteliales, creímos conveniente tener otro tipo celular en el que validar nuestros resultados y saber si los mecanismos moleculares que puedan verse afectados por la ausencia de *CCM3* son independientes de la identidad celular; también lo usamos para poner a punto técnicas u optimizar aplicaciones de fármacos, como ya han sido utilizadas anteriormente (Diaz et al., 2010).

Para llevar a cabo los estudios sobre la función de CCM3, primero decidimos establecer modelos celulares deficientes en esta proteína. Procedimos entonces a infectar células A549, hCMEC/D3 y HuVEC con lentivirus defectivos obtenidos según se detalla en Material y Métodos. Se recogieron extractos de proteína y extractos de RNA, para comprobar mediante *western blot* y *qPCR* que la expresión de *CCM3* se veía reducida de manera significativa. Las células se sembraron a una densidad de 50.000 células por cm² y se recogieron tras 48 horas de incubación. La Figura 16 muestra que se alcanzaron niveles de inhibición suficientes para usar los cultivos para nuestros experimentos.

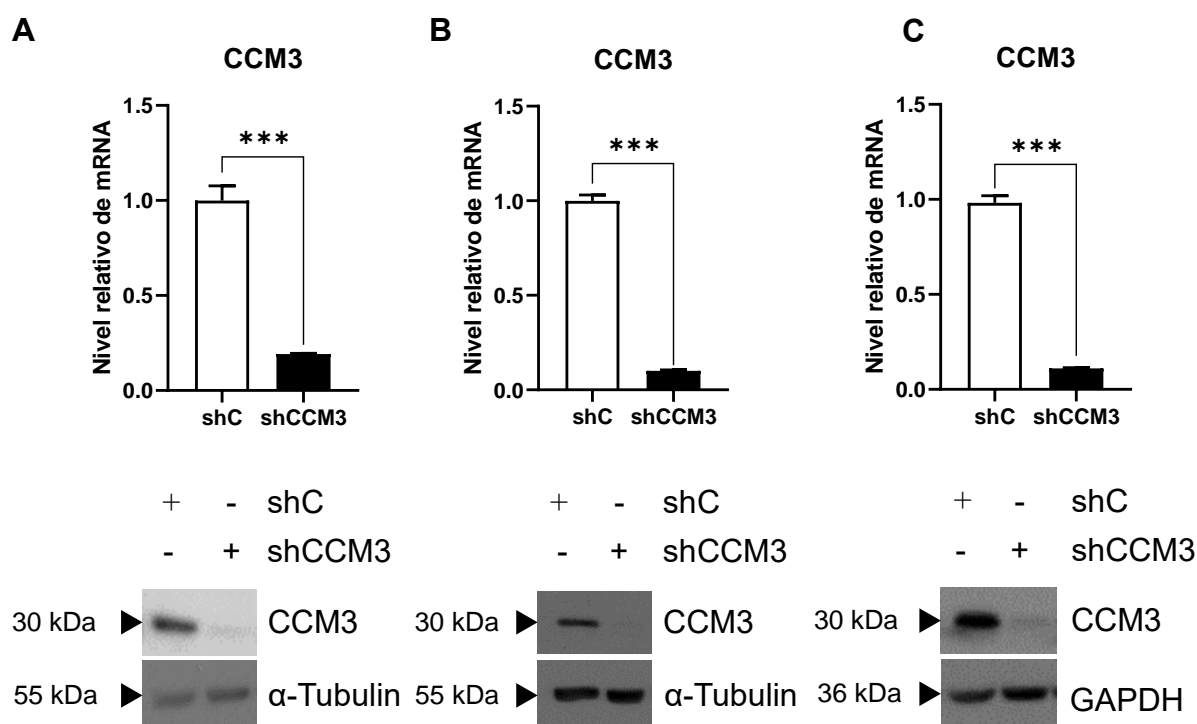


Figura 16. Silenciamiento de *CCM3* en diferentes tipos celulares. Niveles de mRNA de *CCM3*, normalizados con *GAPDH* y β -*ACTINA* como genes *housekeeping* y resultados de *western blot* usando anticuerpos contra *CCM3*, con α -Tubulin o *GAPDH* como controles de carga en células infectadas. Para los niveles de mRNA, se muestran los resultados de experimentos independientes, su media y error estándar en relación a los niveles en células shC de (A) hCMEC/D3 (n=2); (B) HuVEC (n=3) y (C) A549 (n=3). Se utilizó el test t de Student para su análisis.

1. EL SILENCIAMIENTO DE *CCM3* EN CÉLULAS ENDOTELIALES PROVOCA AUMENTO DE *VEGFR2*

Anteriormente, en la literatura científica se había advertido de que la estabilización del receptor tirosina quinasa *VEGFR2* en la membrana por parte de *CCM3* era crucial para que no se acabasen desarrollando lesiones (He et al. 2010; Renz et al., 2015; Di Stefano y Glading 2020). Se propuso que la vía de activación de este receptor, iniciada con el factor de crecimiento *VEGF*, tenía relación directa con el desarrollo de las lesiones y su estudio parecía interesante para encontrar una diana terapéutica.

Conocida esta información, quisimos replicar este resultado. Al analizar nuestras células hCMEC/D3, pudimos comprobar que las células que no expresaban *CCM3* mostraban un aumento en los niveles totales del receptor *VEGFR2* (Figura 17).

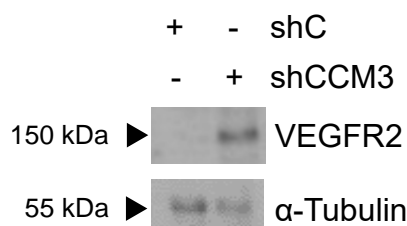


Figura 17. El receptor VEGFR2 está sobreexpresado en células hCMEC/D3 deficientes en CCM3. Utilizando la técnica de *western blot*, se midieron los niveles de VEGFR2 en células hCMEC/D3 junto a α -tubulina como control de carga.

En HuVEC, resultados obtenidos anteriormente en el laboratorio por la Dra. Ebel Florida confirmaban los niveles aumentados de proteína de VEGFR2; además, cuando se llevó a cabo *qPCR* para comprobar qué ocurría con el mRNA de este receptor, los niveles de mRNA de *VEGFR2* también estaban sobreexpresados; estos resultados están incluidos en la Tesis Doctoral de Ebel Florida (Florida, 2016) y en Sartages et al., (2020). Por tanto, el aumento de la proteína podía ser explicada por un aumento en la expresión cuando se eliminaba CCM3.

Siendo la familia de los receptores tirosina numerosa, diversa e implicada en la regulación de multitud de señales de activación celular, nos interesó estudiar qué podría estar ocurriendo en células deficientes en CCM3 con otros receptores de membrana. Esto llevó a realizar un *Proteome Profile Array* en estas células comparándolas con células control (Florida, 2016; Sartages et al., 2020). Además de las β -integrinas (proteínas de membrana que ya habían sido relacionadas en la patogenia de las CCM, como comunicaron Macek Jilkova et al., 2014 y Renz et al., 2015), la otra proteína que veía incrementada su presencia en células sin CCM3 era el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR).

2. LAS CÉLULAS SIN CCM3 PRESENTAN MAYOR CANTIDAD DE EGFR

El EGFR presentaba ciertas características que lo hacían un buen candidato a estudio: tenía gran importancia a la hora de regular funciones celulares como proliferación o diferenciación; estaban descritos varios fármacos que inhiben su capacidad de fosforilación y existía una gran cantidad de información, estudios y ensayos que lo incluían dada su relevancia en el campo del cáncer.

Quisimos entonces comprobar mediante *western blot* si las células shCCM3 tenían mayor cantidad de EGFR que las células control (Figura 18). Este resultado replicó el obtenido anteriormente (Florida, 2016) en células HuVEC y A549.

En todos los modelos celulares que teníamos, el EGFR se veía incrementado cuando se eliminaba CCM3; no solo en ambos modelos endoteliales, sino también en A549, un tipo de célula epitelial, con lo cual se mostraba que este efecto no era exclusivo de células endoteliales. Sin embargo, al analizar los niveles de mRNA del *EGFR* en células pudimos observar que al eliminar CCM3 no se elevaba la expresión del receptor a este nivel (Florida, 2016), como ocurría como el VEGFR2.

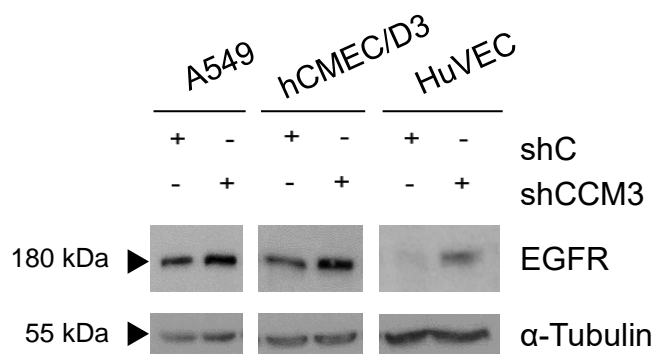


Figura 18. Las células que carecen de CCM3 tienen mayor cantidad de EGFR. Se muestra mediante *western blot* los niveles de EGFR en tres tipos celulares distintos: A549, hCMEC/D3 y HuVEC, junto a α -tubulina como control de carga.

Sospechamos entonces que los mecanismos de regulación del EGFR en ausencia de CCM3 eran postraduccionales, así que diseñamos una serie de experimentos en los que estudiar la vida media del receptor EGFR.

Un primer experimento usando cicloheximida (un inhibidor de la síntesis de proteínas en células eucariotas) en A549 había demostrado que la vida media del receptor EGFR en células deficientes en CCM3 se mantenía en los mismos niveles pasadas las horas, mientras que en las células control decaían los niveles de proteína drásticamente (Florida, 2016).

Decidimos para esta tesis centrarnos en las posibles vías de degradación que podía sufrir del receptor y comprobar si CCM3 tenía un papel determinante.

3. LA PRINCIPAL VÍA DE DEGRADACIÓN DEL EGFR ES LA VÍA LISOSOMAL

Para estudiar la vía de degradación del proteasoma, utilizamos el compuesto MG132, que inhibe esta ruta. Al aplicarlo a células A549 y comparar la cantidad de EGFR mediante *western blot* entre células shC y shCCM3, no se apreciaban diferencias entre las células tratadas o no con MG132 (Figura 19A). Al no percibir diferencias inhibiendo el proteasoma, quisimos probar si era la otra vía de degradación, la lisosomal, la que justificase las diferencias en la cantidad de receptor. Usamos en A549 un inhibidor de la vía lisosomal, la cloroquina, que impide la necesaria acidificación que las enzimas del interior del lisosoma necesitan para poder degradar proteínas (Figura 19B).

En este caso, la cantidad de receptor sí que aumentaba cuando la cloroquina estaba presente, delatando que es la vía lisosomal la que se usa para degradar el EGFR. Sin embargo, en células sin CCM3 la cloroquina no parecía capaz de aumentar los niveles de EGFR de forma proporcional a como lo hacía en células normales, indicando que la degradación ya estaba alterada en ausencia de la cloroquina.

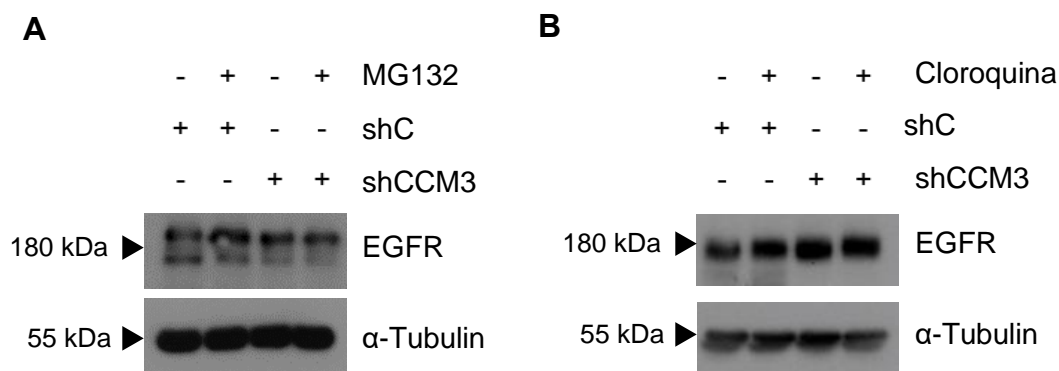


Figura 19. La ruta de degradación predominante para el EGFR es la lisosomal. **A.** Células A549 fueron simultáneamente serodeprivadas y tratadas con MG132 10 μ M durante 8 horas; durante las dos últimas, se les añadió EGF 100 ng/ml para inducir la vía de internalización y degradación del EGFR. Luego se midieron los niveles de EGFR mediante *western blot*, con α -tubulina como control de carga. **B.** Células A549 fueron simultáneamente tratadas con cloroquina 100 μ M y EGF 100 ng/ml durante 2 horas. Luego se midieron los niveles de EGFR mediante *western blot*, con α -tubulina como control de carga.

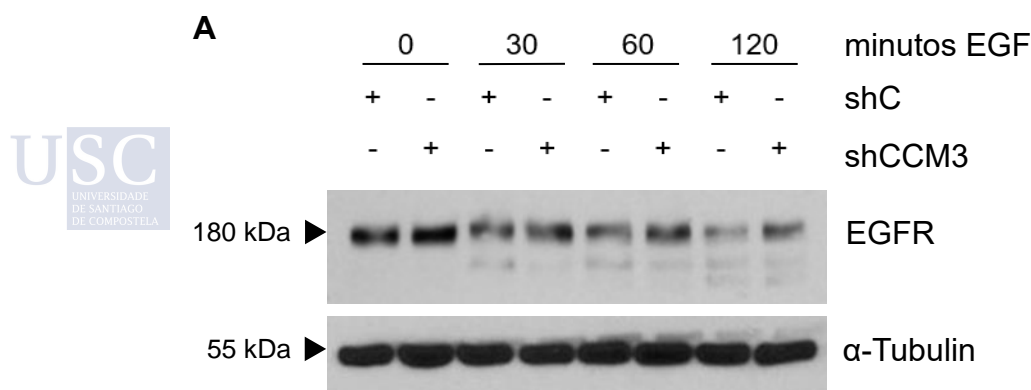
4. LA FALTA DE CCM3 NO AFECTA A LA CAPACIDAD DE INTERNALIZACIÓN DEL EGFR

Los resultados del estudio de la degradación no acababan de explicar las diferencias en los niveles del receptor, así que nos propusimos saber si era en el mecanismo de internalización donde podíamos encontrar la clave de las diferencias al eliminar CCM3. Preparamos entonces algunos experimentos que se focalizaran en este proceso.

Primero, llevamos a cabo un experimento *time-course* en el que tratábamos a células hCMEC/D3 que habían estado serodeprivadas previamente durante 8 horas a diferentes tiempos con EGF 100 ng/ml, para ver cómo se comportaba el EGFR (Figura 20A).

Una vez comprobados los niveles de EGFR, observamos que seguían siendo más altos en las células sin CCM3 a pesar de haber inducido la internalización y degradación del receptor con EGF.

Quisimos también comprobar la capacidad de endocitosis de las células. Para ello, hicimos una inmunofluorescencia marcando EGFR en células A549 que se habían mantenido serodeprivadas durante 8 horas y a las que se le había añadido EGF 100 ng/ml sólo durante la última hora antes de fijarlas (Figura 20B). Tanto las células ShC como las ShCCM3 respondían de la forma descrita en la bibliografía: sin ligando, el receptor se sitúa en la membrana plasmática y, añadiendo EGF se provocaba la endocitosis hacia el interior celular, estando inhibido o no CCM3.



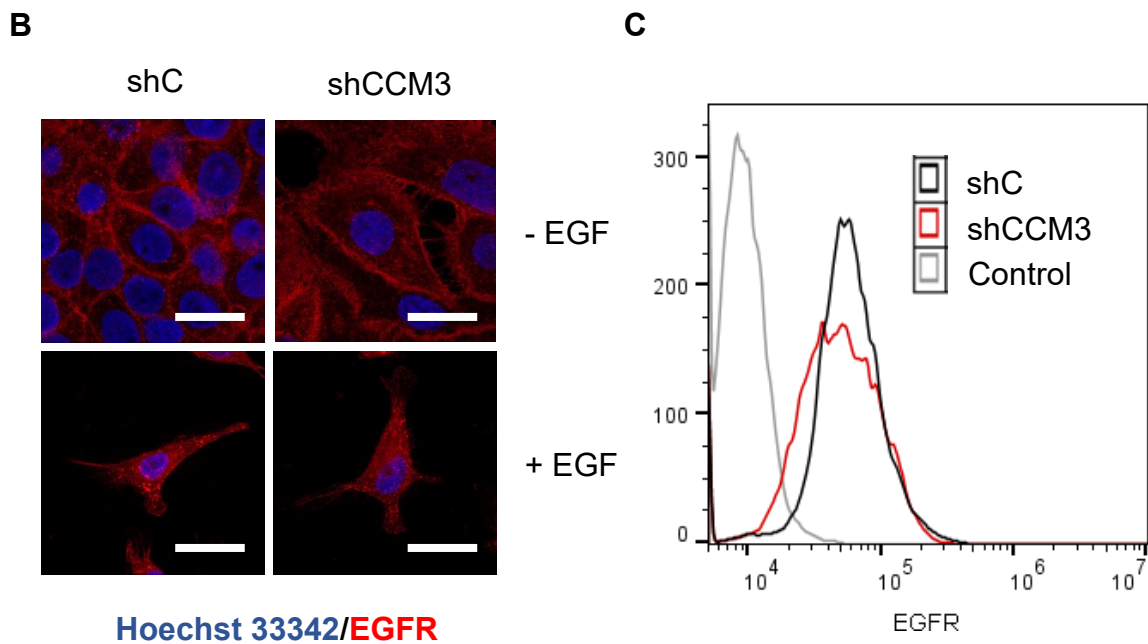


Figura 20. La internalización del EGFR no se ve afectada por la falta de CCM3. A. Se llevó a cabo un experimento tipo *time-course* con células hCMEC/D3 a las que no se les había cambiado el medio de cultivo en las 48 horas previas; se trataron con los tiempos indicados con EGF 100 ng/ml. A continuación, se realizó un *western blot* para medir los niveles de EGFR, usando α -tubulina como control de carga. B. Se marcó el EGFR en células A549 mediante inmunofluorescencia (rojo) y los núcleos con Hoechst 33342 (azul). Las células fueron serodeprivadas durante 8 horas, de las cuales fueron tratadas con cloroquina 100 μ M y EGF 100 ng/ml las 2 últimas horas. Luego fotografiadas con un objetivo 63X. La barra de escala representa 25 μ m. C. Histograma de células A549 ShC y ShCCM3 a las cuales se le midió el EGFR presente en membrana mediante citometría de flujo tras ser serodeprivadas durante 8 horas. El control consistía en células que no fueron incubadas con anticuerpo secundario.

Además, realizamos una citometría de flujo para medir la cantidad de receptor en la membrana plasmática de células A549 serodeprivadas. Como se ve en la figura 20C, no se observaban diferencias entre células control y células ShCCM3, lo que indicaba que las diferencias en los niveles de receptor en células shCCM3 no son debidas a su acumulación en la membrana plasmática de las células deficientes en CCM3.

En resumen, los resultados de estos últimos experimentos sugieren que la falta de CCM3 no afecta a la capacidad de internalizar el receptor EGFR.

5. EL TRATAMIENTO CON LAPATINIB NO REVIERTE LOS DEFECTOS DE CÉLULAS ShCCM3

Dado que el EGFR tiene gran importancia en la biología del cáncer y por tanto, en su tratamiento, existen varios fármacos que se han usado para inhibir la vía de señalización del receptor y producir un efecto antitumoral. Varios de estos fármacos se han utilizado en ensayos clínicos e incluso se están usando activamente en terapéutica, lo que supone una ventaja si llega un momento en que se quieran usar como tratamiento de los cavernomas.

El Lapatinib (o GW572016) es un inhibidor reversible de EGFR y HER2 (ErbB2) que reduce considerablemente la proliferación de células cancerosas que sobreexpresaban los receptores, *in vivo* e *in vitro* (Rusnak et al., 2001). A nivel intracelular, el Lapatinib se une de forma reversible al sitio de unión al ATP de las quinasas, evitando la fosforilación.

Sabíamos ya que en nuestro sistema el Lapatinib inhibía la ruta de activación iniciada por el EGFR, ya que hacía desaparecer la fosforilación en la posición Tyr1148 del receptor y que Erk1/2, que es fosforilado por el receptor, no mostraba fosforilación en sus residuos Thr218/Tyr220 (Florida, 2016).

Una de las desregulaciones que caracterizan a las células deficientes en CCM3 es la sobreexpresión de los factores de transcripción *KLF2* y *KLF4* (Zhou et al., 2016; Cuttano et al., 2016). Por tanto, quisimos comprobar si añadiendo Lapatinib a células, podíamos revertir la sobreexpresión de estos factores.

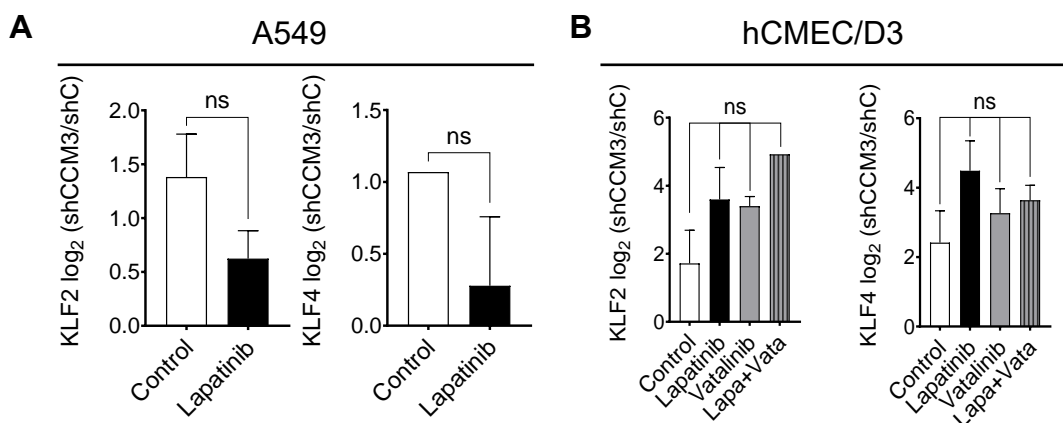


Figura 21. El inhibidor del receptor EGFR Lapatinib no es capaz de reducir los altos niveles de *KLF2* y *KLF4* de células ShCCM3. **A.** Análisis, mediante *qPCR*, de los niveles de *KLF2* and *KLF4* en células A549 tratadas con Lapatinib 10 μ M durante 8 horas; se muestran los resultados de 3 experimentos independientes, su media y error estándar, que se analizaron mediante test t de Student. **B.** Se realizó una *qPCR* para medir los niveles de expresión de *KLF2* y *KLF4* en células hCMEC/D3 que habían sido tratadas con Lapatinib 10 μ M, Vatalinib 10 μ M o ambas durante 8 horas; se enseñan los resultados de 3 independientes, su media y error estándar. Los experimentos de *qPCR* se normalizaron con *GAPDH* y β -*ACTINA* como genes *housekeeping* y se utilizó el test t de Student para su análisis.

Aplicando Lapatinib sobre células A549 (Figura 21A) no conseguimos reducir de forma significativa los niveles de *KLF2* and *KLF4*. Cuando probamos a hacer lo mismo con células endoteliales hCMEC/D3 (Figura 21B) tampoco conseguimos que se redujeran los niveles de ambos factores de transcripción. Ni siquiera pudimos reducirlos al añadir Vatalanib, un inhibidor del VEGFR2, a pesar de que sus niveles en estas mismas células cuando se elimina CCM3 son mayores (Figura 17). La combinación de ambos inhibidores tampoco logra producir algún efecto en la expresión de los factores de transcripción. Por tanto, no parece que la sobreexpresión del EGFR sea necesaria para la desregulación de los genes *KLF2* y *KLF4* inducida por la falta de CCM3.

Otro de los efectos de la falta de CCM3 en células endoteliales es la alteración de la distribución de la VE-Cadherina en la membrana y quisimos saber si la inhibición de la familia de EGFR revertía este efecto. El tratamiento con Lapatinib o con Vatalinib tampoco parecía revertir la distribución irregular de VE-Cadherina en la membrana celular que se ve afectada en células sin algún gen CCM (Boulday et al., 2011; Glading et al., 2007; Bravi et al., 2015); las células no recuperaban el patrón de unas células control (Figura 22).

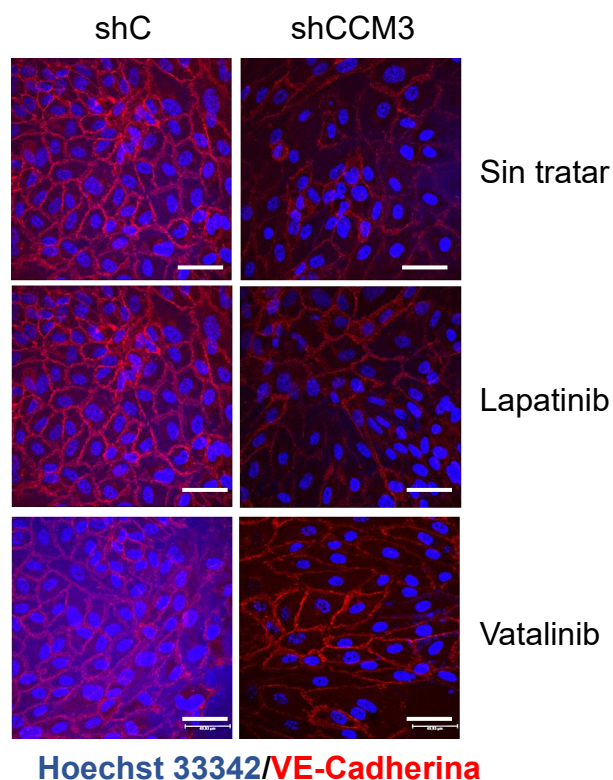


Figura 22. El Lapatinib no consigue devolver una distribución normal de VE-Cadherina en la membrana de células ShCCM3. Inmunofluorescencia de células hCMEC/D3 tiñendo VE-Cadherina (rojo) y núcleos con Hoechst 33342 (azul) tratadas con Lapatinib 10 μ M o Vatalinib 10 μ M durante 8 horas. La barra de escala representa 50 μ m.

6. LAS CÉLULAS ENDOTELIALES SIN CCM3 PRESENTAN MENOR VIABILIDAD CELULAR AL SER EXPUESTAS A LAPATINIB

Al comprobar que el Lapatinib no revertía los efectos causados por la falta de CCM3 que habían sido descritos, nos fijamos en los efectos antitumorales del Lapatinib (Diaz et al., 2010), siendo estos relacionados con arrestos en el ciclo celular y efectos apoptóticos. Por tanto, quisimos investigar si existían diferencias entre células control y ShCCM3 en respuesta al Lapatinib en esos aspectos.

Optamos primero por hacer un experimento dosis-respuesta con células hCMEC/D3 al Lapatinib. Para ello, comparamos mediante un ensayo MTT la viabilidad de células shC y shCCM3 tras 96 horas de exposición al fármaco, como se explica en Material y Métodos. La exposición a Lapatinib vino a descubrir que las células ShCCM3 endoteliales, que expresan más EGFR que las shC, presentan menor viabilidad celular a concentraciones de entre 5 y 50 μ M del inhibidor (Figura 23).

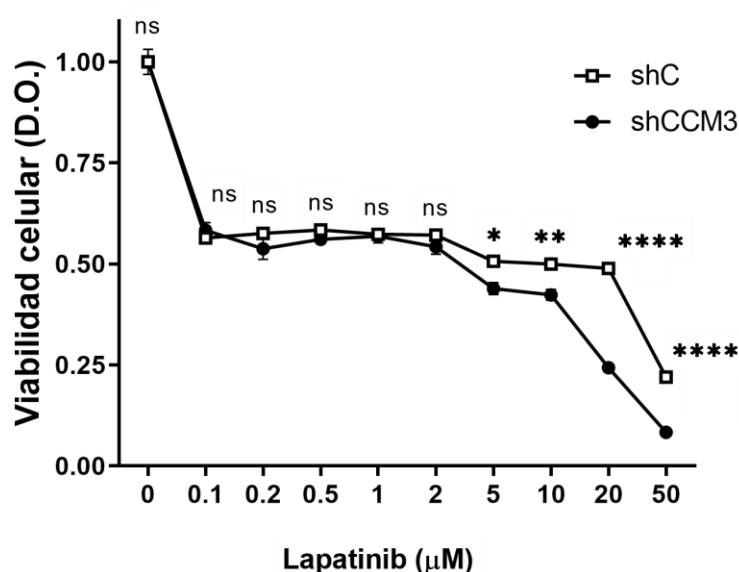


Figura 23. Las células ShCCM3 muestran menor viabilidad celular a altas concentraciones de Lapatinib. Se muestran los resultados medidos mediante espectrofotometría del MTT realizado en células hCMEC/D3 tras ser tratadas con diferentes concentraciones de Lapatinib durante 96 horas. Las mediciones (n=4) se normalizaron con las células que no fueron expuestas al fármaco y se les aplicó el test ANOVA y un test post-hoc de Bonferroni. Se muestran los resultados de experimentos independientes, su media y error estándar.

Sin embargo, cuando sometíamos al mismo tipo de células a Vatalinib, un inhibidor específico del VEGFR2, que en nuestras células también estaba sobreexpresado (Figura 17), no ocurría lo mismo; el Vatalinib no afectaba la viabilidad de las células, independientemente del estado de CCM3 (Figura 24).

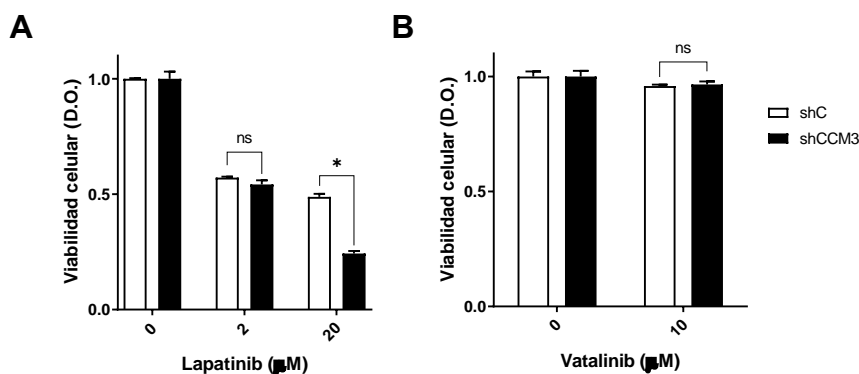
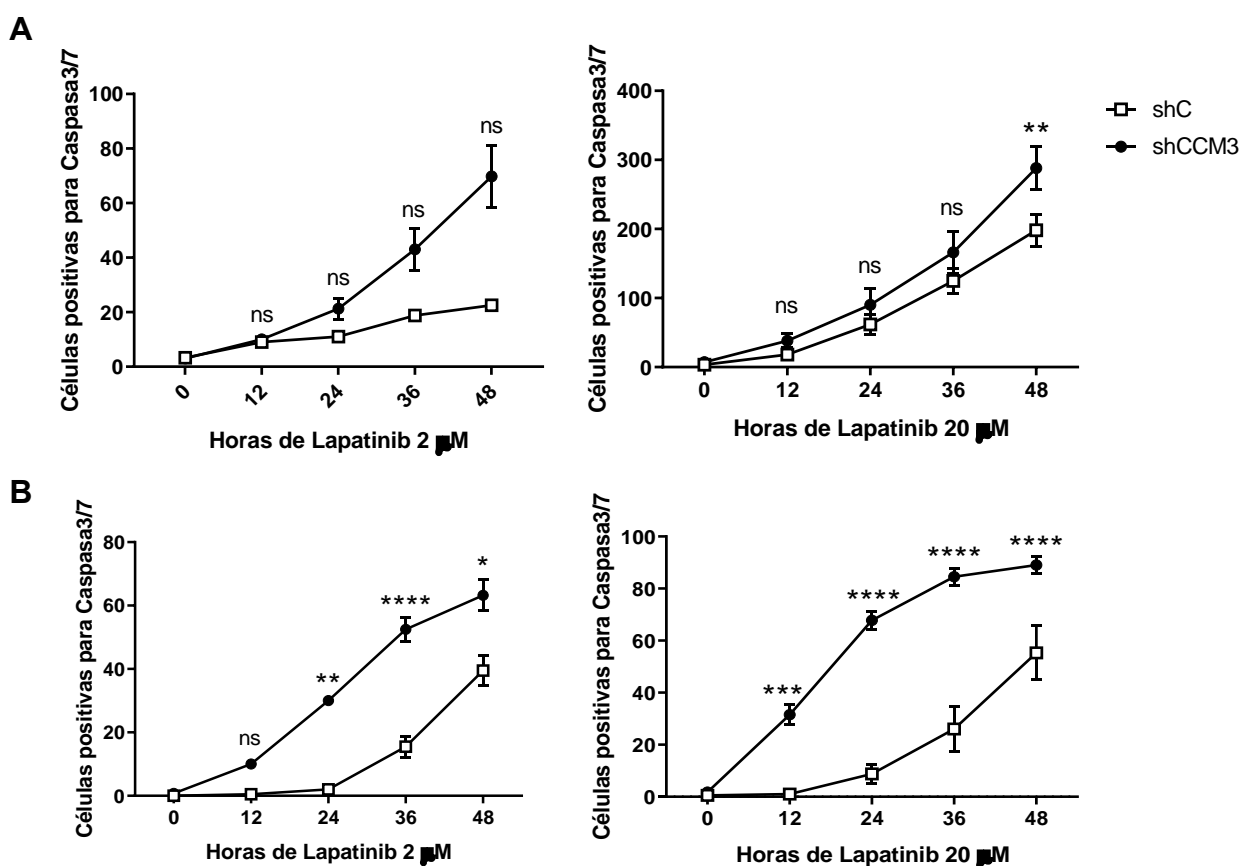


Figura 24. Comparación del efecto del Lapatinib (A) y el Vatalinib (B) sobre la viabilidad celular. Se llevó a cabo un ensayo MTT para determinar la viabilidad de células hCMEC/D3 tratadas con Lapatinib o Vatalinib durante 96 horas, con las concentraciones indicadas. Las mediciones (n=4) se normalizaron con las células que no fueron expuestas al fármaco y se les aplicó a los datos el test t de Student para su análisis. Se muestran los resultados de experimentos independientes, su media y error estándar.

Obtenidos los resultados de viabilidad celular, y conociendo la capacidad apoptótica del Lapatinib, utilizamos el reactivo *CellEvent™ Caspase-3/7 Green Detection* para analizar si las células sufrían muerte celular por apoptosis, y proceder a su análisis (Figura 25) usando el *plugin Cell Counter* del programa *ImageJ*.

Al tratar con Lapatinib a células hCMEC/D3 (Figura 25A), veíamos que las células shCCM3 parecían sufrir más apoptosis que las shC, pero que su viabilidad de las células control también se veía afectada.

Al probar las mismas condiciones en células HuVEC, obtuvimos una diferencia significativa en la susceptibilidad de las células que carecían de CCM3 en relación con las control (Figura 25B y 25C). A una concentración de 20 μM , a las 12 horas de tratamiento ya se mostraba una diferencia significativa sin apenas verse comprometida la viabilidad de las células control. Con una concentración de 2 μM , más cercana a la usada en clínica, a las 24 horas se producía una diferencia significativa sin afectar a la viabilidad de células control.



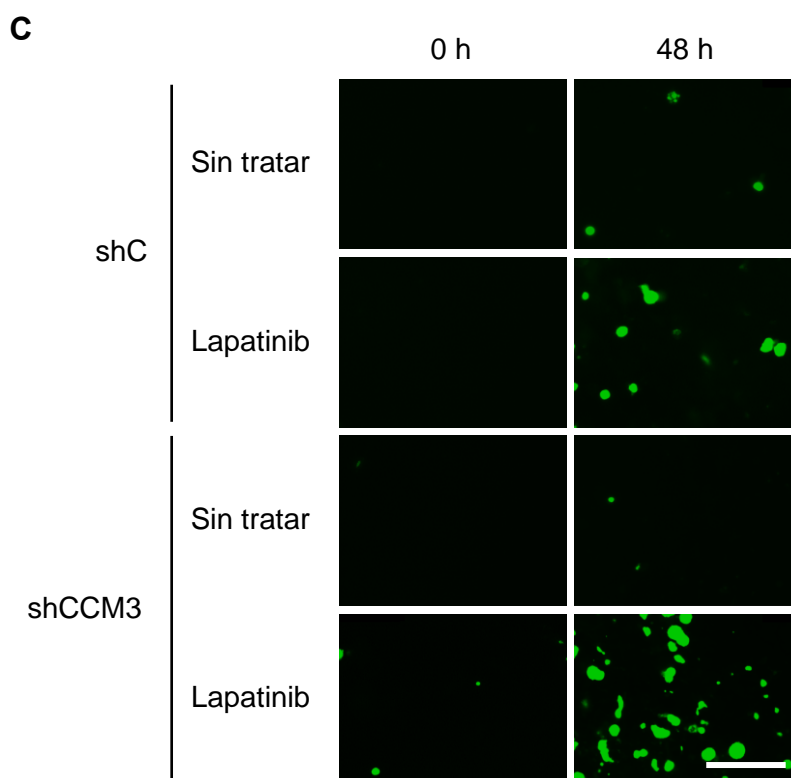


Figura 25. Las células ShCCM3 son más sensibles al efecto apoptótico del Lapatinib. **A.** Células hCMEC/D3 fueron tratadas con dos concentraciones de Lapatinib: 2 y 20 μM y se les aplicó el *CellEventTM Caspase-3/7 Green Detection* según el protocolo descrito en Material y Métodos. Se muestran los resultados de experimentos independientes, su media y error estándar y se les aplicó el test ANOVA y un test post-hoc de Bonferroni. **B.** Células HuVEC fueron tratadas con dos concentraciones de Lapatinib: 2 y 20 μM y se les aplicó el *CellEventTM Caspase-3/7 Green Detection* según el protocolo descrito en Material y Métodos. Se muestran los resultados de experimentos independientes, su media y error estándar y se les aplicó el test ANOVA y un test post-hoc de Bonferroni. **C.** Imágenes tomadas a 0 y 48 horas tras la aplicación de Lapatinib 2 μM y *CellEventTM Caspase-3/7 Green Detection*. La barra de escala representa 150 μm .

CAPÍTULO II: PAPEL DE LAS GCKIII QUINASAS EN LAS CCM

Este capítulo reproduce contenidos del siguiente artículo:

“The GCKIII kinases STK24 and STK25 inhibit cavernoma development”

Miriam Sartages¹, Mar García-Colomer¹, Cristina Iglesias¹, Brian W. Howell², Manuel Macía³, Patricia Peñas³, Celia M. Pombo¹, Juan Zalvide¹

¹*Departamento de Fisiología, Centro Singular de Medicina Molecular e Enfermedades Crónicas (CiMUS), Instituto Sanitario de Santiago de Compostela (IDIS), Universidad de Santiago de Compostela, 15703 Santiago de Compostela, España;* ²*Department of Neuroscience and Physiology, SUNY Upstate Medical University, Syracuse, New York, USA;* ³*Servicio de Obstetricia y Ginecología Hospital Clínico Universitario Santiago. 15703 Santiago de Compostela, Spain.*

Artículo Original aceptado para su publicación el 22 de Noviembre de 2021 en la revista *Stroke*. Editorial: The American Heart Association/American Stroke Association (AHA/ASA) Journals; ISSN: 0039-2499.

En esta parte de la tesis, nos pusimos como objetivo estudiar en un modelo celular endotelial los efectos que tiene la eliminación de las GCKIII quinasas y su relación con los efectos de la falta de los genes *CCM*, y de *CCM3* en particular.

1. EXPRESIÓN DE GCKIII EN CÉLULAS ENDOTELIALES

En primer lugar, quisimos conocer la expresión de los genes GCKIII en un modelo de célula endotelial. Fue la Dra. Ana Guerrero López la que obtuvo extractos de mRNA de células HCAEC (*Human Coronary Artery Endothelial Cells*) y los analizó mediante *qPCR* y microarray (Figura 26). Un análisis de estos resultados demostró que los miembros de la familia GCKIII que más se expresaban en células endoteliales son *STK25* y *STK24*. Esto se vio corroborado por nuestra propia medición en células HuVEC por *qPCR*, donde se ve una vez más que *STK24* y *STK25* son las quinasas GCKIII con mRNA más abundante en estas células endoteliales (Figura 27).

Por tanto, decidimos centrar nuestros esfuerzos en dilucidar qué papel poseían estas dos proteínas en las bases moleculares y celulares de las malformaciones cavernosas.



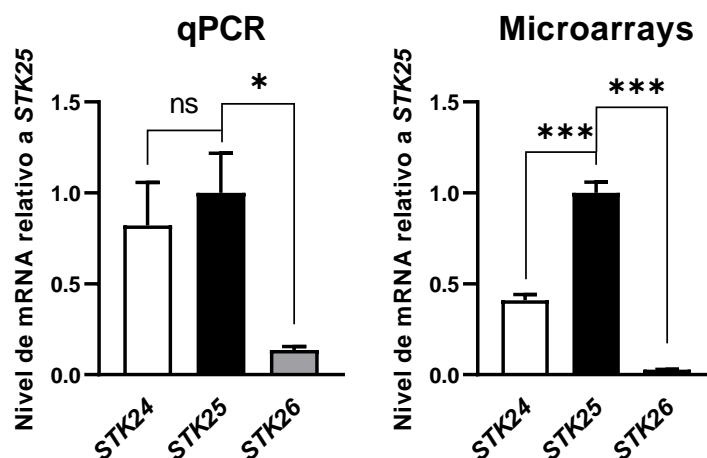
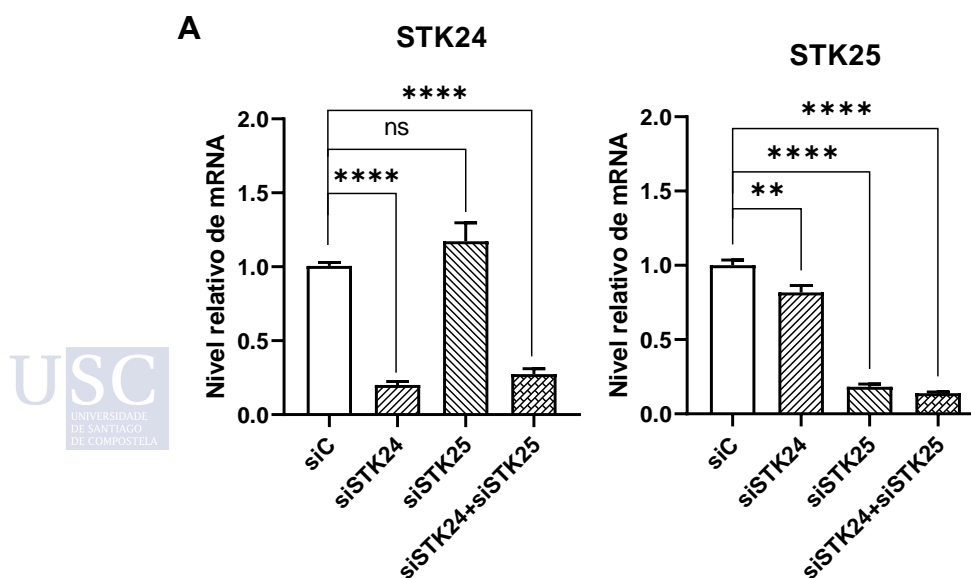


Figura 26. Expresión de genes GCKIII en células endoteliales HCAEC (Guerrero et al., 2015). Las mediciones fueron hechas mediante *qPCR* y microarrays; se muestran los resultados de 2 experimentos independientes, su media y error estándar. Se utilizó el test ANOVA y un test post-hoc de Bonferroni.

2. EFECTO DEL SILENCIAMIENTO DE *STK24* Y *STK25* EN CÉLULA ENDOTELIAL

Para estudiar el efecto que tendría la desaparición de *STK24* y *STK25* en células endoteliales, decidimos utilizar siRNA contra estos genes en células HuVEC. No sólo decidimos estudiar el silenciamiento de *STK24* y *STK25* por separado, sino también combinar ambas inhibiciones. Siguiendo el procedimiento descrito en Material y Métodos, utilizamos extractos de mRNA y proteína para comprobar la eficacia del silenciamiento. En la Figura 27 se puede observar que la inhibición que ofrecían los siRNA era significativa y que la presencia de sus proteínas apenas se detectaba en *western blot* en células transfectadas con ellos.



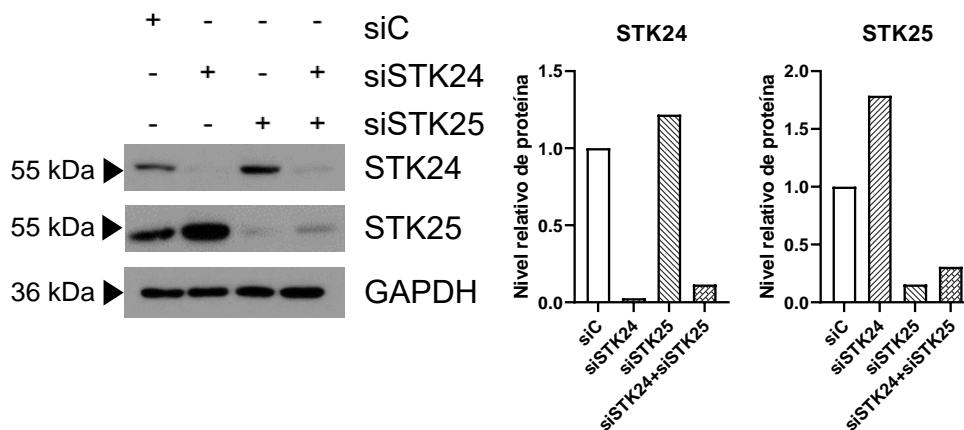
B

Figura 27. Silenciamiento de GCKIII en células HuVEC. A. Niveles relativos de expresión del mRNA de *STK25* y *STK24* analizados por *qPCR*, corregidos usando *GAPDH* y β -*ACTINA* como genes *housekeeping* y expresados con respecto a los niveles de las células siC. Se muestran los resultados de 3 experimentos independientes, su media y error estándar. Se utilizó el test ANOVA y un test post-hoc de Bonferroni. **B.** Se midieron los niveles de proteicos de *STK24* y *STK25* por *western blot* usando *GAPDH* como control de carga. Se muestran también las cuantificaciones de densitometría de las bandas obtenidas (paneles derechos) analizadas con el programa ImageJ.

Además de probar un silenciamiento eficaz, este experimento nos sirvió para estudiar qué efecto tenía el silenciamiento de una de las quinasas sobre la expresión de la otra (Figura 27). Al silenciar *STK24*, se observaba una reducción significativa aunque no muy marcada de la expresión de *STK25* a nivel de RNA (Figura 27A); sin embargo, cuando analizamos los extractos proteicos, pudimos observar un claro aumento de la proteína de *STK25* cuando eliminamos *STK24*, mayor que en células siC (Figura 27B). No ocurría lo mismo al silenciar *STK25*; la expresión del mRNA de *STK24* no estaba afectada significativamente (Figura 27A). La cantidad de proteína *STK24* aumentaba ligeramente cuando se silenció *STK25*, aunque no tanto como cuando ocurría lo contrario (Figura 27B). Estos resultados sugieren que la eliminación de una de las quinasas afecta a la otra, sobre todo a nivel de proteína.

3. LA FALTA DE CCM3 AFECTA A LAS PROTEÍNAS DE STK24 Y STK25

Como ya se indicó, trabajos previos habían descrito que al silenciar la expresión de *CCM3*, se reducían los niveles de las proteínas *STK24* y *STK25* (Fidalgo et al., 2010; Zhang et al., 2012). Quisimos analizar si esta relación también se producía en nuestro modelo de células endoteliales, así que trabajamos en un cultivo celular de HuVEC en el que inhibir *CCM3* mediante siRNA. Este modelo también serviría más adelante para comparar los efectos de la falta de *CCM3* con los de la falta de *GCKIII* en estas células.

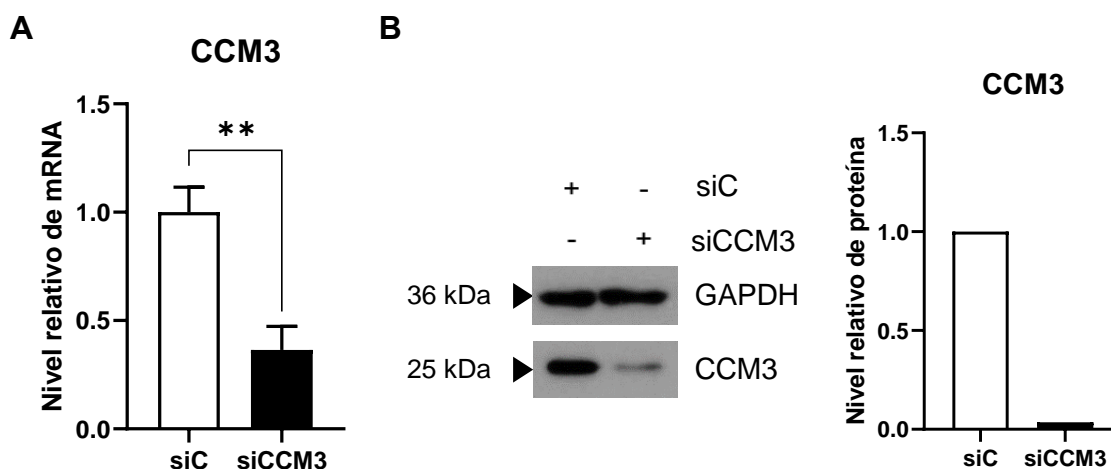
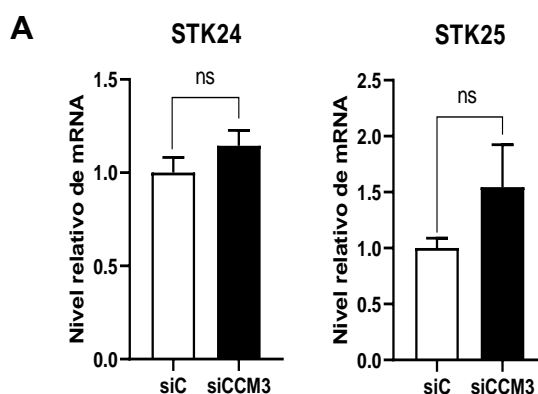


Figura 28. Silenciamiento de CCM3 en células HuVEC. **A.** Los extractos de mRNA se usaron para realizar una *qPCR* y medir los niveles relativos de expresión de *CCM3* usando *GAPDH* y β -*ACTINA* como genes *housekeeping*, normalizando también los niveles con las células siC. Se muestran los resultados de 2 experimentos independientes, su media y error estándar. Se utilizó el test t de Student (dos colas). **B.** Utilizando extractos proteicos, se realizó un *western blot* usando anticuerpos contra CCM3 y GAPDH como control de carga. Se muestran también las cuantificaciones de densitometría de las bandas obtenidas a la derecha.

Una vez conseguida una buena inhibición de CCM3 a nivel de RNA y proteína (Figura 28), analizamos los extractos de RNA y medimos los niveles de expresión de *STK24* y *STK25*. En ninguno de los genes se observaba un cambio en la expresión del gen (Figura 29A). Sin embargo, al medir la proteína mediante *western blot*, observamos una reducción de ambas proteínas (Figura 29B), lo que concordaba con las tendencias que se habían publicado anteriormente (Fidalgo et al., 2010), describiendo que CCM3 era indispensable para estabilizar a la proteína STK25.



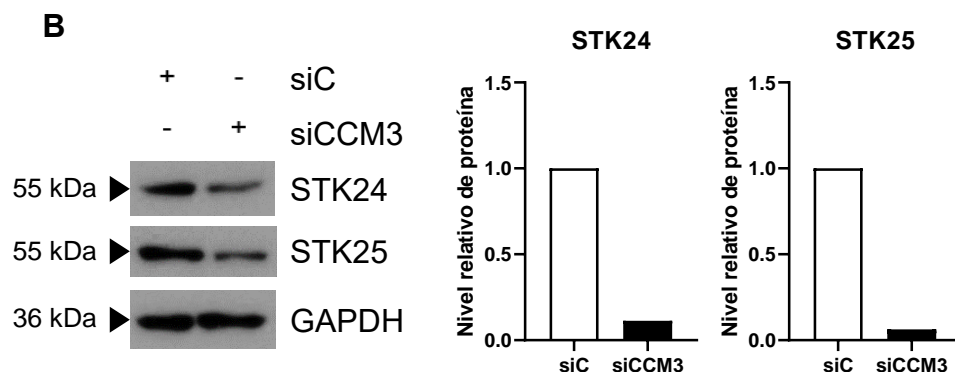
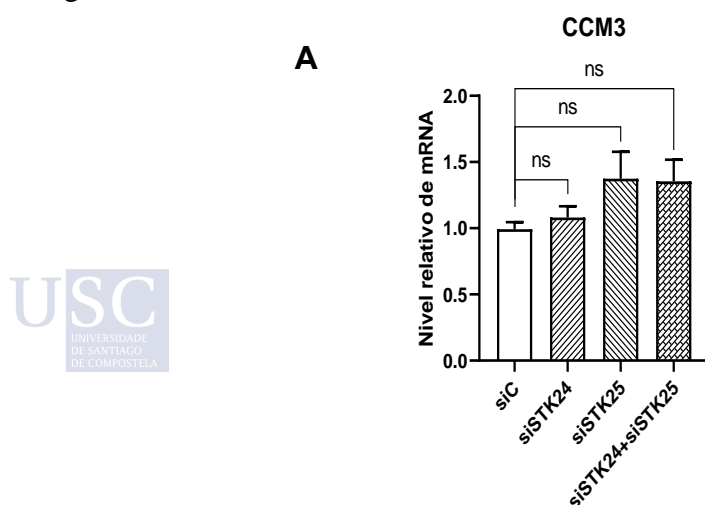


Figura 29. El silenciamiento de CCM3 afecta a las proteínas GCKIII en células HuVEC. A. Se llevó a cabo una *qPCR* para medir la expresión relativa de los genes *STK25* y *STK24* en células HuVEC, usando *GAPDH* y β -*ACTINA* como genes *housekeeping*. Se muestran los resultados de 2 experimentos independientes, su media y error estándar. Se utilizó el test t de Student. B. Extractos proteicos se analizaron mediante *western blot* para medir la proteína *STK25* y *STK24* y *GAPDH* como control de carga. También se muestra la cuantificación de las bandas mediante densitometría.

4. LA FALTA DE STK25 Y STK24 AFECTA A LA PROTEÍNA CCM3

Dado que la falta de CCM3 afecta a la función y vida media de las quinasas estudiadas, también quisimos investigar el caso contrario. Por tanto, usando células HuVEC transfectadas con siRNAs de las enzimas, medimos la expresión en extracto de mRNA de *CCM3* y también el nivel de proteínas mediante un *western blot*.

A nivel de mRNA, podemos observar que la expresión de *CCM3* no cambia con la delección de las quinasas (Figura 30A), ni siquiera al eliminar ambas. Cuando analizamos lo que ocurre a nivel de la expresión proteica de CCM3 apenas vemos diferencias entre las células control y las células deficientes en *STK25*; sin embargo, sí que desciende la cantidad de proteína CCM3 en las que se eliminó la expresión de *STK24*. Al eliminar ambas quinasas, la reducción de la proteína CCM3 es incluso mayor que cuando se eliminan individualmente (Figura 30B). Por tanto, parece que no solo CCM3 tiene un efecto sobre los niveles de *STK24* y *STK25*, sino que las quinasas tienen un efecto sobre los niveles de CCM3, lo que es consistente con que estas proteínas tengan una relación funcional estrecha.



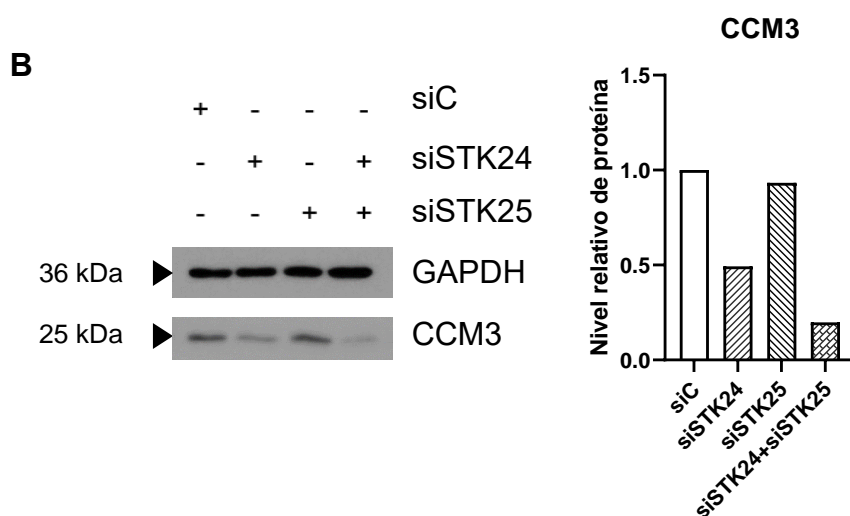


Figura 30. El silenciamiento de STK25 y STK24 afecta a la proteína CCM3. A. Se llevó a cabo una *qPCR* para medir la expresión relativa de los genes *STK25* y *STK24* en células HuVEC, usando *GAPDH* y β -*ACTINA* como genes *housekeeping*. Se muestran los resultados de 3 experimentos independientes, su media y error estándar. Se utilizó el test ANOVA y un test post-hoc de Bonferroni. B. Extractos proteicos se analizaron mediante *western blot* para medir la proteína CCM3 usando *GAPDH* como control de carga. Se muestra también la densitometría de las bandas.

5. LAS CÉLULAS ENDOTELIALES QUE NO EXPRESAN *STK25* Y *STK24* MUESTRAN AUMENTO DE *KLF2* Y *KLF4*

Durante los últimos años, se han publicado trabajos en los que se describe que en las células endoteliales de las malformaciones cavernosas se produce un claro aumento en la expresión de los factores de transcripción *KLF2* y *KLF4* (Zhou et al., 2016; Cuttano et al., 2016), aumento que parece ser debido a la falta de uno de los genes CCM.

Quisimos comprobar si en nuestro modelo experimental de células HuVEC deficientes en CCM3, ocurría lo mismo. En la Figura 31 se observa que el RNA de ambos genes aumenta en células siCCM3 con respecto a las células control.

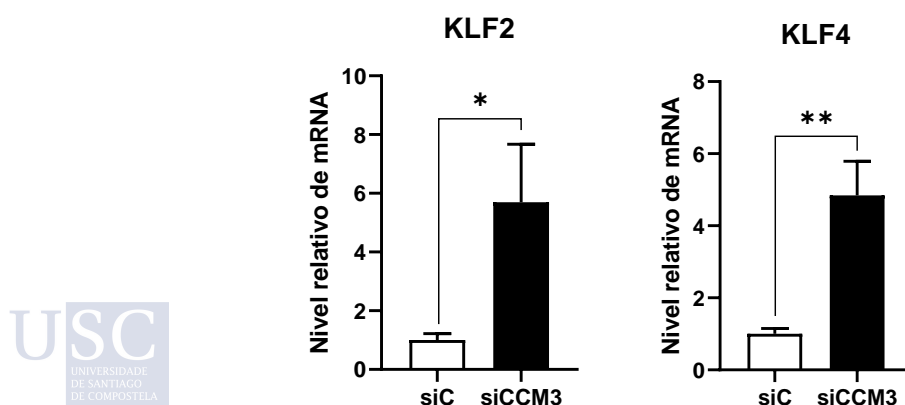


Figura 31. El silenciamiento de CCM3 con siRNA eleva los niveles de mRNA de KLF2 y KLF4. Se llevó a cabo una *qPCR* para medir la expresión relativa de los genes *KLF2* y *KLF4* en células HuVEC, usando *GAPDH* y β -*ACTINA* como genes *housekeeping*. Se muestran los resultados de 2 experimentos independientes, su media y error estándar. Se utilizó el test t de Student.

Después de confirmar estos datos de anteriores trabajos, decidimos medir los mismos genes en células deficientes en *STK25*, *STK24* y ambas simultáneamente (Figura 32).

Tanto para *KLF2* como para *KLF4*, la inhibición únicamente de *STK24* no era suficiente para elevar su expresión (Figura 32A). Sin embargo, cuando se eliminaba *STK25*, la expresión de *KLF4* aumentaba (Figura 32B). También *KLF2* mostraba una tendencia a aumentar (aunque no de forma significativa, Figura 32A). En el caso de células deficientes en ambas quinasas, el aumento de expresión era evidente, e incluso mayor que cuando solo faltaba *STK25*. Concluimos por tanto, que tanto la falta de *STK25* como la falta combinada de *STK24* y *STK25* inducía un aumento de los factores de transcripción *KLF2* y *KLF4* igual que la falta de *CCM3*.

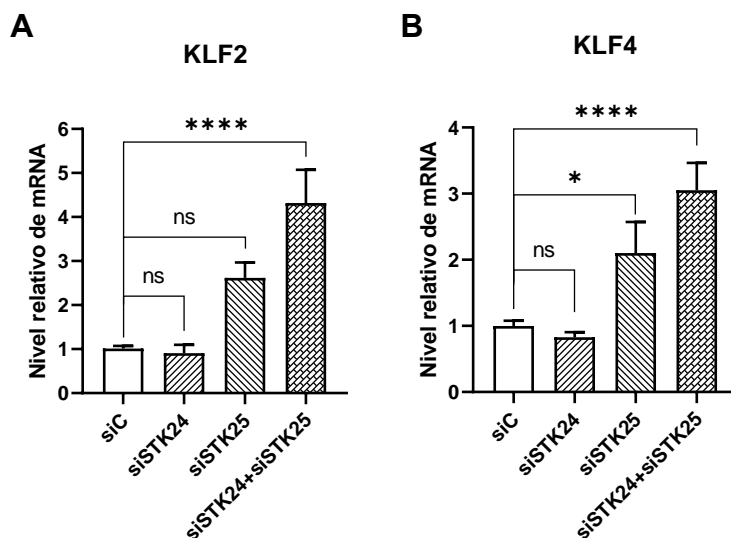


Figura 32. El silenciamiento de *STK25* y *STK24* eleva los niveles de mRNA de *KLF2* y *KLF4*. Se llevó a cabo una *qPCR* para medir la expresión relativa de los genes *KLF2* (A) y *KLF4* (B) en células HuVEC, usando *GAPDH* y β -*ACTINA* como genes *housekeeping*. Se muestran los resultados de 2 experimentos independientes, su media y error estándar. Se utilizó el test ANOVA y un test post-hoc de Bonferroni.

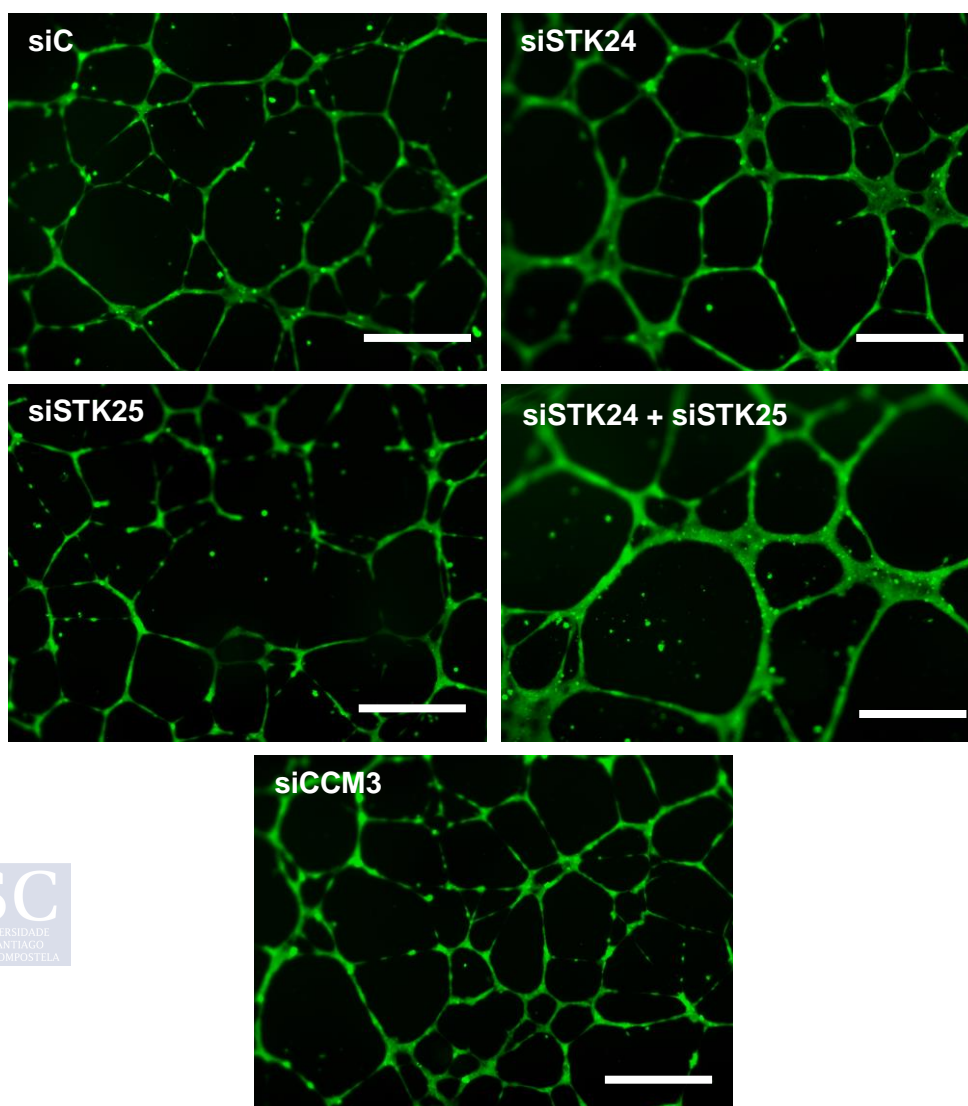
6. LA INHIBICIÓN DE *STK25* Y *STK24* AFECTA A LA FORMACIÓN DE TUBOS

El ensayo de tubulogénesis de células endoteliales había sido utilizado para estudiar el papel que tiene *CCM3* en la angiogénesis (Borikova et al., 2010; He et al., 2010; Schleider et al., 2011). Por tanto, decidimos llevar a cabo experimentos de formación de tubos con células HuVEC a las que inhibiéramos la expresión de *STK24*, *STK25* y *CCM3*. En nuestro caso, definimos tubo como el segmento entre dos nudos; también tuvimos en cuenta aquellos segmentos que parten de algún nudo pero tienen su extremo libre para más análisis.

Para inducir angiogénesis en células HuVEC las sembramos sobre Geltrex®, un producto con la misma composición que el Matrigel®, en presencia de VEGF. Después, para visualizar la morfología de los túbulos utilizamos Calceína AM. Tras una incubación de 18 horas, se tomaron fotos de los diferentes tipos celulares (Figura 33A). Observamos que los túbulos formados por las células siSTK25 y siCCM3 son similares en grosor, longitud de los segmentos y densidad y número de nudos formados, a las células siC. Sin embargo, los tubos formados por células siSTK24 y células siSTK24+siSTK25 parecían presentar mayor grosor y distancia entre nudos. Quisimos cuantificar estas posibles diferencias de forma más objetiva. Para eso empezamos por medir el ancho de diferentes tubos elegidos al azar usando ImageJ (Figura 33B). Obtuvimos correspondencia con lo que se observaban en las fotografías, ya que células siSTK24 y siSTK24+siSTK25 presentaban tubos con un grosor mayor que células siC. Sin

embargo, creímos que necesitábamos un método de medición que tuviera en cuenta toda la imagen de las células sin depender de la elección de segmentos concretos que pudieran sesgar el resultado. Decidimos pues analizar los resultados usando *AngioTool* (Zudaire et al., 2011) y representar los parámetros que usa el programa para caracterizar los tubos formados (Figura 33C-F). Al analizar el área relativa que ocupaban los tubos (Figura 33C), fueron las células deficientes en cada quinasa y las deficientes en ambas las que presentaban mayor superficie ocupada; esto es consistente con el resultado anterior de tubos más gruesos. *AngioTool* define la longitud de los tubos como la suma de las distancias euclídeas entre los píxeles de todos los tubos de la imagen que analiza; en consecuencia, pudimos comprobar también que las células sin STK24 presentaban tubos más largos (Figura 33D). Después procedimos a estudiar el número de los nudos (Figura 33E): fueron también las células siSTK24 las que presentaban más nudos. Por el contrario, al analizar el número de segmentos libres (Figura 33F), no observamos ninguna diferencia significativa entre las células estudiadas.

Concluimos por tanto que en nuestro modelo la falta de STK24 y STK25, pero no la de CCM3, afecta a la tubulogénesis de células HuVEC, con STK24 siendo la quinasa principal responsable de este efecto.

A

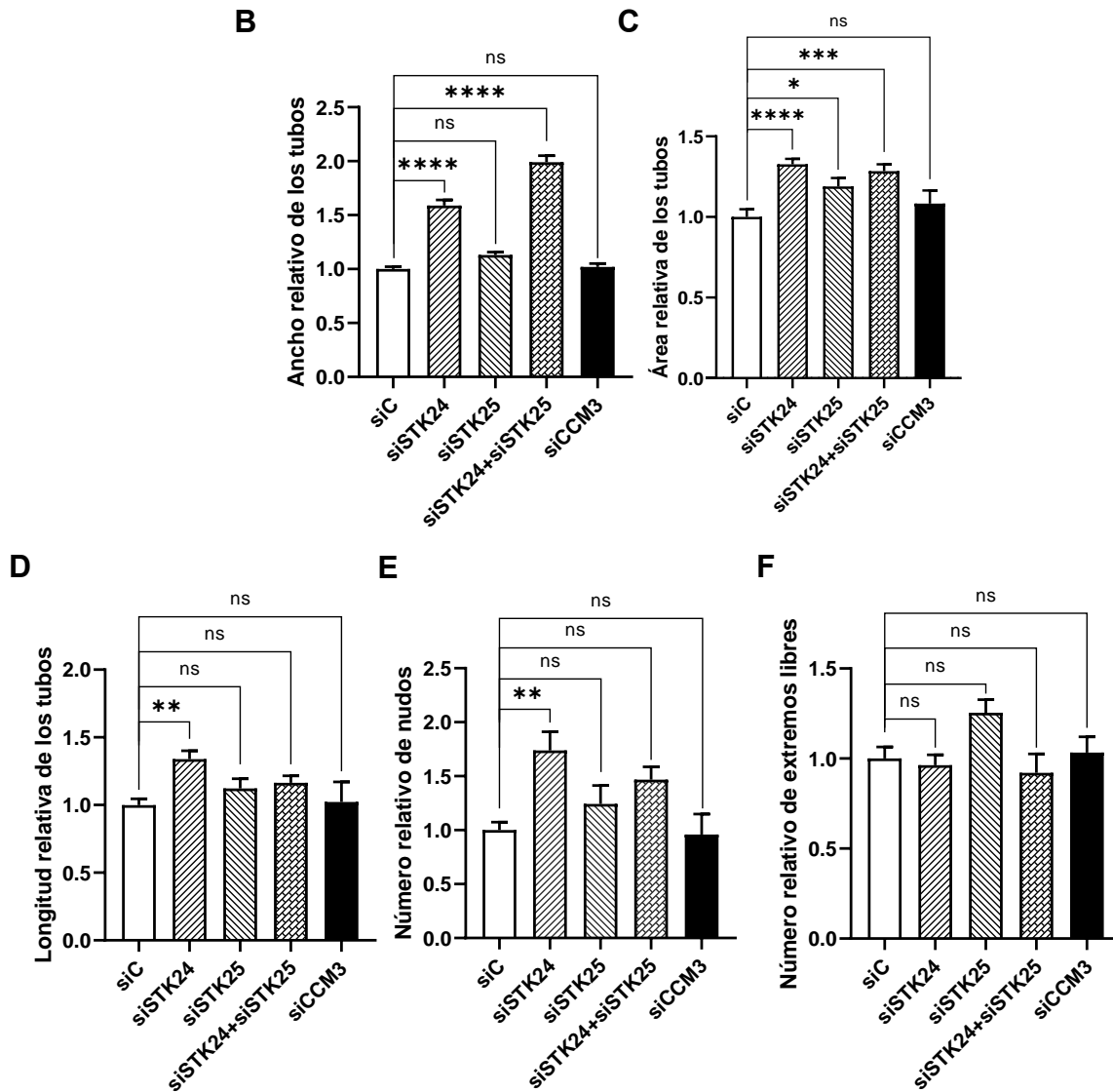


Figura 33. El silenciamiento de *STK25* y *STK24* modifica la formación de tubos *in vitro*. Ensayo de formación de tubos en Geltrex®. **A.** Imágenes de fluorescencia representativas de HuVEC transfectadas con diferentes siRNAs. La barra de escala representa 500 μ m. **B.** Utilizando el programa ImageJ, se tomaron 100 mediciones del ancho de tubos de cada uno de los experimentos independientes que se hicieron. El área y longitud relativa de los tubos (**C** y **D**), el número de los nudos (**E**) y el número relativo de extremos libres (**F**) fueron parámetros obtenidos aplicando el programa *AngioTool* a las fotografías tomadas de los ensayos. Se muestran los resultados de 2 experimentos independientes, media y error estándar; todos los resultados están normalizados con los resultados de las células siC. Se utilizó el test ANOVA y un test post-hoc de Bonferroni.

7. LA DISTRIBUCIÓN DEL APARATO DE GOLGI SE VE AFECTADA POR LA INHIBICIÓN DE AMBOS GENES *STK25* Y *STK24*

En publicaciones previas, la distribución del aparato de Golgi ya había sido objeto de atención cuando se eliminaba la expresión de *CCM3* (Fidalgo et al., 2010 en células SaOS2) o *STK25* (Preisinger et al., 2004; Matsuki et al., 2010 en neuronas hipocampales; Matsuki et al., 2013 en neuronas corticales).

Por tanto, nos pareció pertinente realizar un estudio de la distribución del orgánulo con HuVEC transfectadas con siRNAs para eliminar la expresión de las proteínas objeto de estudio. Procedimos a realizar una inmunofluorescencia en la que usamos un anticuerpo primario contra la proteína GM130, que se encuentra ubicada en la membrana del aparato de Golgi y que utilizamos como un marcador de la localización de este orgánulo (Figura 34B). Después, analizamos las imágenes obtenidas con microscopía confocal con el programa *ImageJ* para cuantificar el área que ocupaba la proteína GM130 (Figura 34A).

Los resultados muestran que los aparatos de Golgi de las células siSTK24+siSTK25 ocupaban un área mayor que las de células control; los de células siSTK24 no veían modificada el área que ocupan. Las células siCCM3 también veían aumentada el área del orgánulo significativamente, como trabajos previos (Fidalgo et al., 2010). En el caso de células siSTK25 también se observaba un incremento siguiendo la tendencia de lo publicado anteriormente (Preisinger et al., 2004). Por tanto, parece que la ausencia de STK24 y STK25 tiene un efecto mayor que la simple ausencia de STK25 sobre el grado de dispersión del Golgi. Este efecto es equiparable al de la ausencia de CCM3.

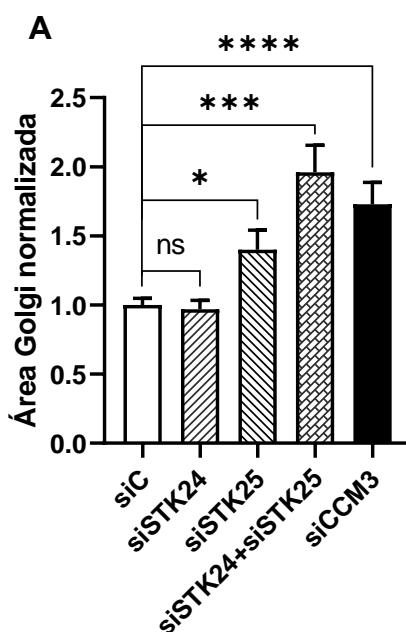
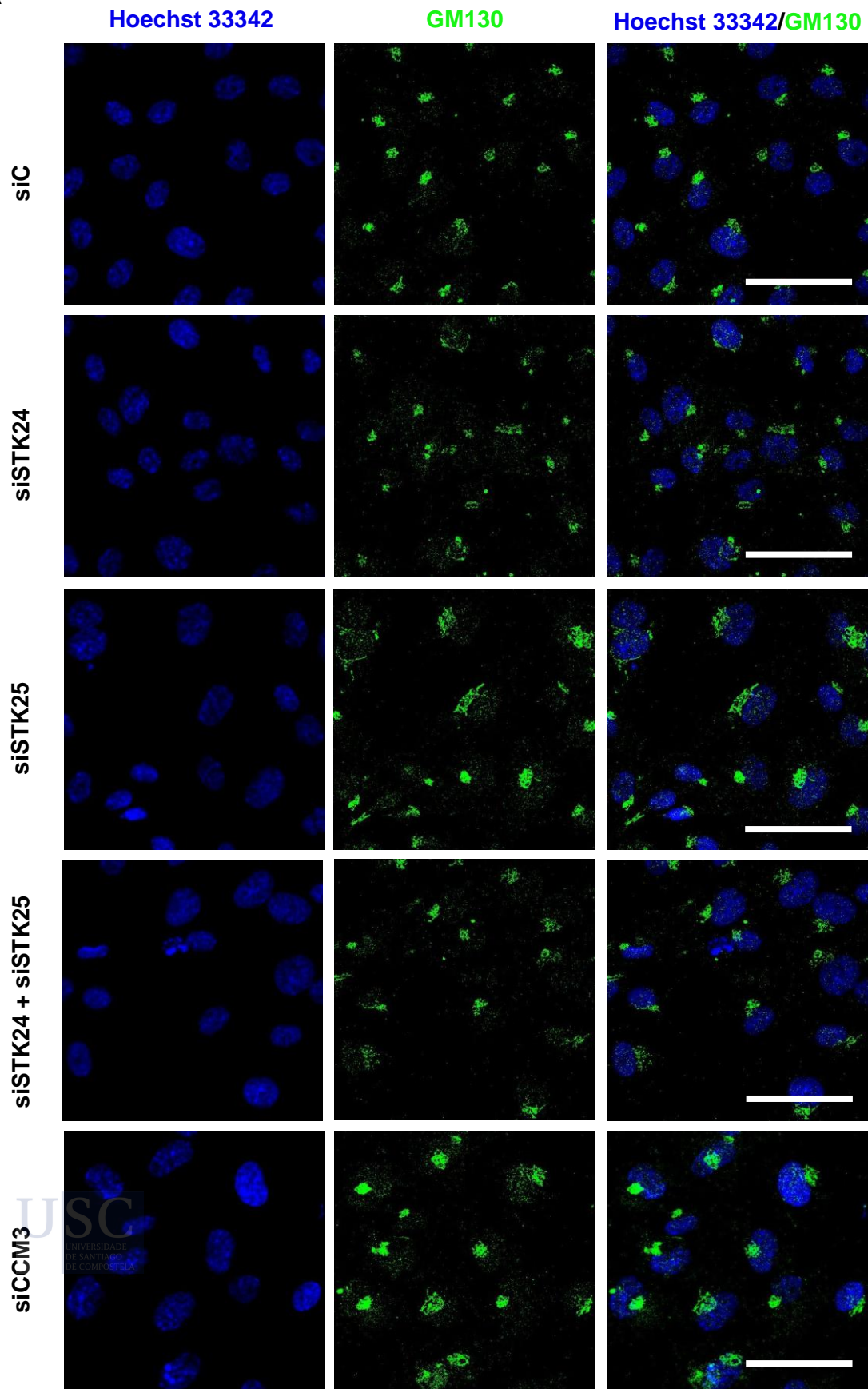


Figura 34. La distribución del aparato de Golgi en células endoteliales depende de STK25 y STK24. A. Cuantificación del área que ocupa la señal de GM130 medida en al menos 50 células, y normalizada con las células siC. Se utilizó el test ANOVA y un test post-hoc de Bonferroni para su análisis. **B.** Inmunofluorescencia llevada a cabo usando un anticuerpo contra GM130 (verde) y tiñendo los núcleos con Hoechst 33342 (azul) en células HuVEC (ver página siguiente). Se muestran imágenes de microscopía confocal de campos representativos, obtenidas utilizando un objetivo de 63X. La barra de escala representa 50 μm .

A



8. LA FALTA DE STK24 Y STK25 AUMENTA LA PRESENCIA DE FIBRAS DE ESTRÉS EN CÉLULAS ENDOTELIALES

Uno de los efectos de la falta de genes CCM en células endoteliales es el aumento en las fibras de estrés de actina. Este aumento es más llamativo en el caso de falta de CCM1 y CCM2 que cuando falta CCM3. De hecho, aunque algunos artículos describen este aumento en células sin CCM3, otros no lo detectan (Zheng et al., 2010; Chan et al., 2011; Shenkar et al., 2015; Suryavanshi et al., 2018). En nuestro caso, decidimos teñir las fibras de actina (y comprobar si estaban estructuradas como fibras de estrés) usando *Phalloidin-TRITC*, que se une específicamente a la actina en filamentos.

En la Figura 35A, se representa el porcentaje de células analizadas que presentaban al menos una fibra de estrés atravesando el núcleo, siguiendo el método descrito por Zheng et al., 2010. En la Figura 35B se muestran imágenes representativas de las fibras de actina en células siC, siSTK24, siSTK25, siSTK24+siSTK25 y siCCM3. El porcentaje de células con fibras de estrés aumentaba cuando se elimina STK25 o las dos quinasas, sin que parezca que la falta de STK24 tenga un efecto relevante. En cambio, en nuestro sistema la falta de CCM3 no parecía tener ningún efecto detectable sobre las fibras de estrés, en consonancia con algunos de los experimentos descritos en la literatura. Por tanto, STK25 parece jugar un efecto mayor que incluso CCM3 en la biología de las células endoteliales.

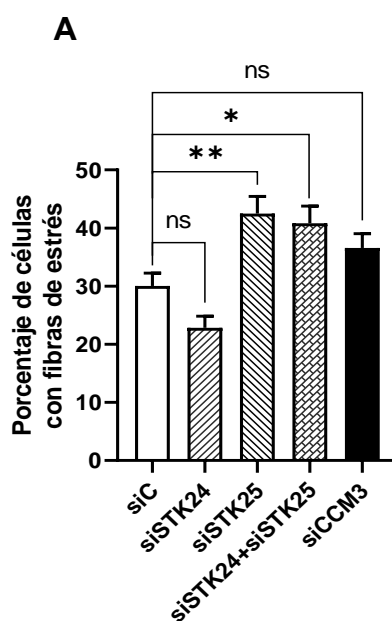
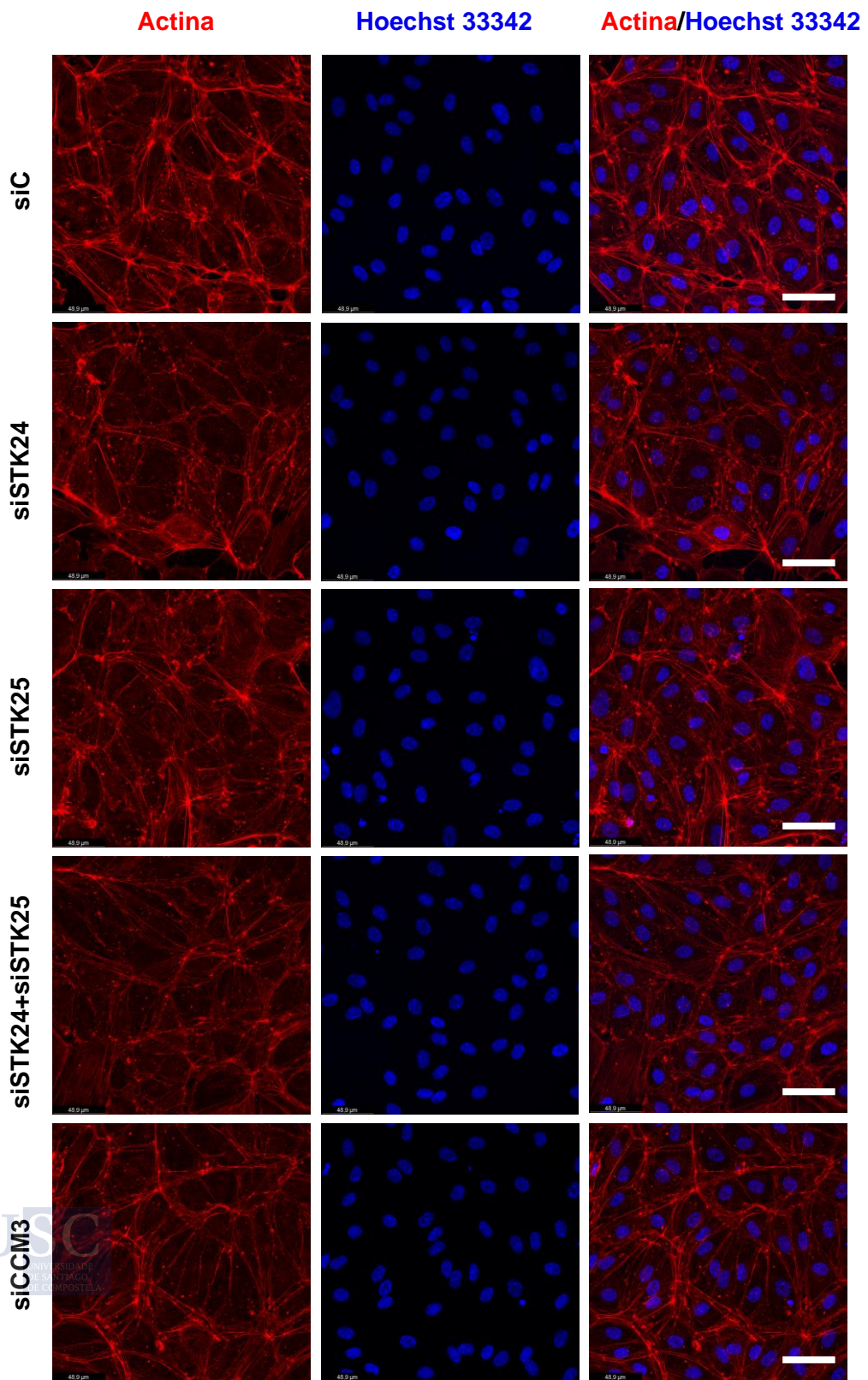


Figura 35. El porcentaje de células que presentan fibras de estrés crece cuando se eliminan STK25 y STK24. A. Cuantificación en al menos 50 células de las que presentaban al menos una fibra de estrés que cruzase el núcleo celular. Se utilizó el test ANOVA y un test post-hoc de Bonferroni para su análisis. **B.** Inmunofluorescencia tiñendo los núcleos con Hoechst 33342 (azul) y la F-Actina, al usar *Phalloidin-TRITC* para marcarla (rojo) en células HuVEC (ver página siguiente). Se muestran imágenes de microscopía confocal de campos representativos, obtenidas utilizando un objetivo de 63X. La barra de escala representa 50 μm .

B



9. LA PRESENCIA DE β -CATENINA EN LA MEMBRANA CELULAR SE REDUCE CUANDO ELIMINAMOS *STK24*, *STK25* Y AMBOS

La proteína β -catenina y su distribución celular es recurrentemente estudiada en el campo de los CCM (Glading y Ginsberg 2010; Bravi et al., 2015) dada su relación con las cadherinas de membrana y su función estabilizadora de las uniones entre células (Glading et al., 2007). Nosotros también quisimos saber el efecto de la deficiencia de *STK24* y *STK25* en esta proteína. Para ello, teñimos por inmunofluorescencia β -catenina y calculamos su porcentaje en la membrana celular.

En la Figura 36A se muestra la representación gráfica del porcentaje de β -catenina en la membrana; la Figura 36B la componen capturas de la inmunofluorescencia de β -catenina de las diferentes células HuVEC transfectadas con siRNA. Al eliminar cualquiera de las quinasas, se vio reducida la presencia de la proteína; en el caso de la inhibición de *STK24* parece que tiene más efecto sobre la catenina que la eliminación simultánea, aunque no tan reducida como en las células siCCM3.

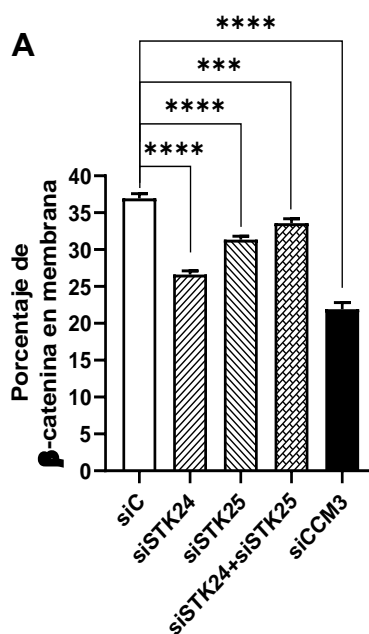
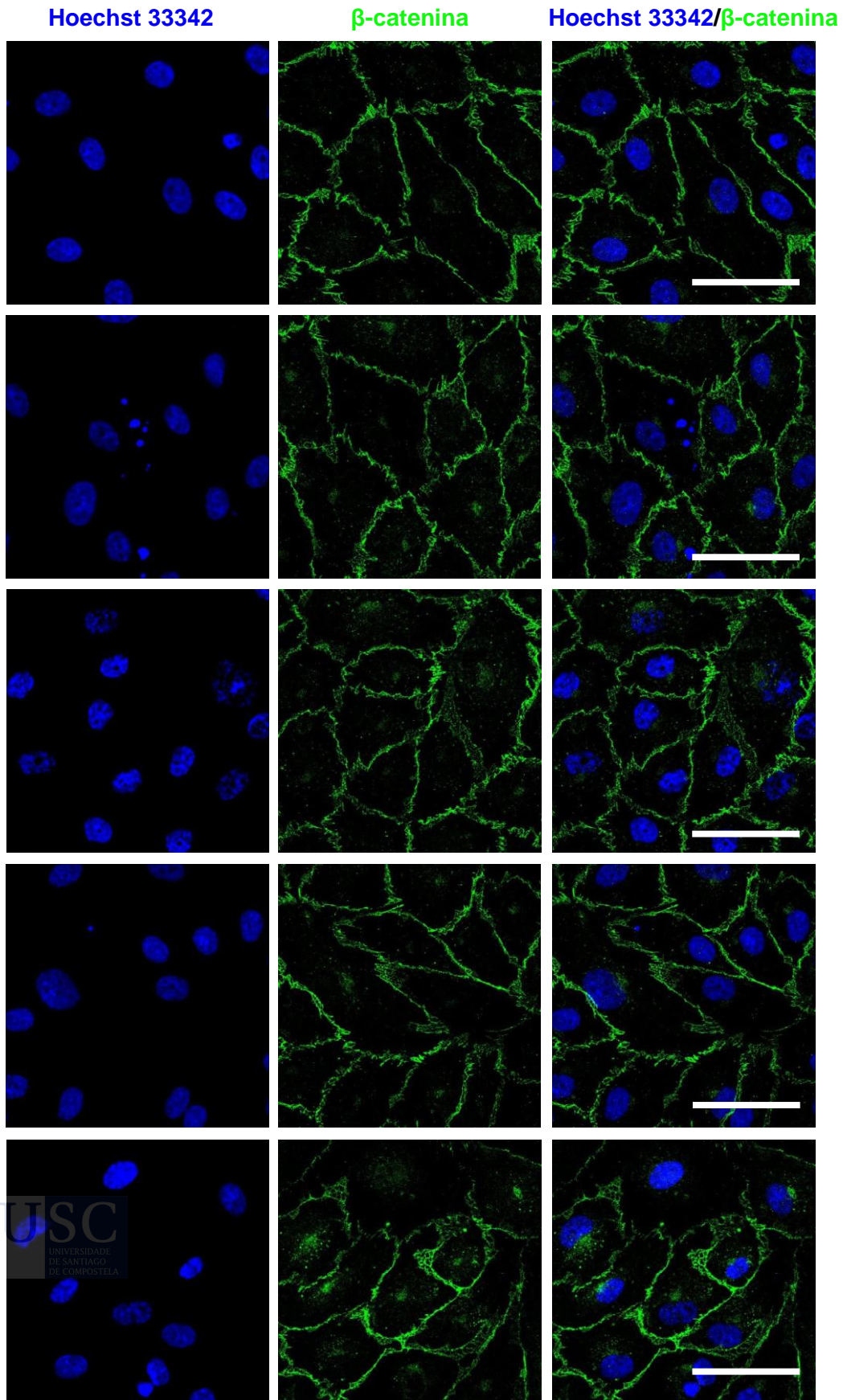


Figura 36. La presencia de β -catenina en la membrana endotelial desciende al eliminar *STK24* o *STK25*. **A.** Cuantificación en al menos 50 células de cada tipo. Se utilizó el test ANOVA y un test post-hoc de Bonferroni para su análisis. **B.** Inmunofluorescencia núcleos teñidos con Hoechst 33342 (azul) y la β -catenina total (verde) en células HuVEC (ver página siguiente). Se muestran imágenes de microscopía confocal de campos representativos, obtenidas utilizando un objetivo de 63X. La barra de escala representa 50 μ m.

B



10. LA VE-CADHERINA ESTÁ MENOS PRESENTE EN LA MEMBRANA DE CÉULAS DEFICIENTES EN STK24 Y STK25

La distribución y cantidad de la molécula de adhesión VE-Cadherina en la membrana celular se ve afectada cuando se deja de expresar alguno de los genes CCM (Boulday et al., 2011, Glading et al., 2007; Bravi et al., 2015). Nosotros quisimos saber si la falta de STK24 y STK25 tenía el mismo efecto. Para eso teñimos células HuVEC con diferentes genes inhibidos con anti VE-Cadherina y Hoechst 33342, tomamos fotografías de microscopía confocal y luego las analizamos usando el programa *ImageJ*.

La Figura 37A expone el porcentaje de VE-Cadherina localizada en la membrana. En la Figura 37B se observan fotografías de la tinción de VE-Cadherina. En este caso, era necesaria la eliminación al mismo tiempo de STK24 y STK25 para que existiese una disminución significativa de la VE-Cadherina de la membrana, mientras que la eliminación de una sola de las quinasas no tenía ningún efecto significativo en este aspecto.

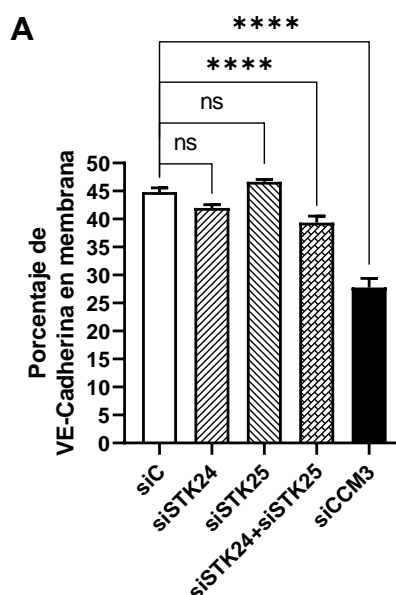
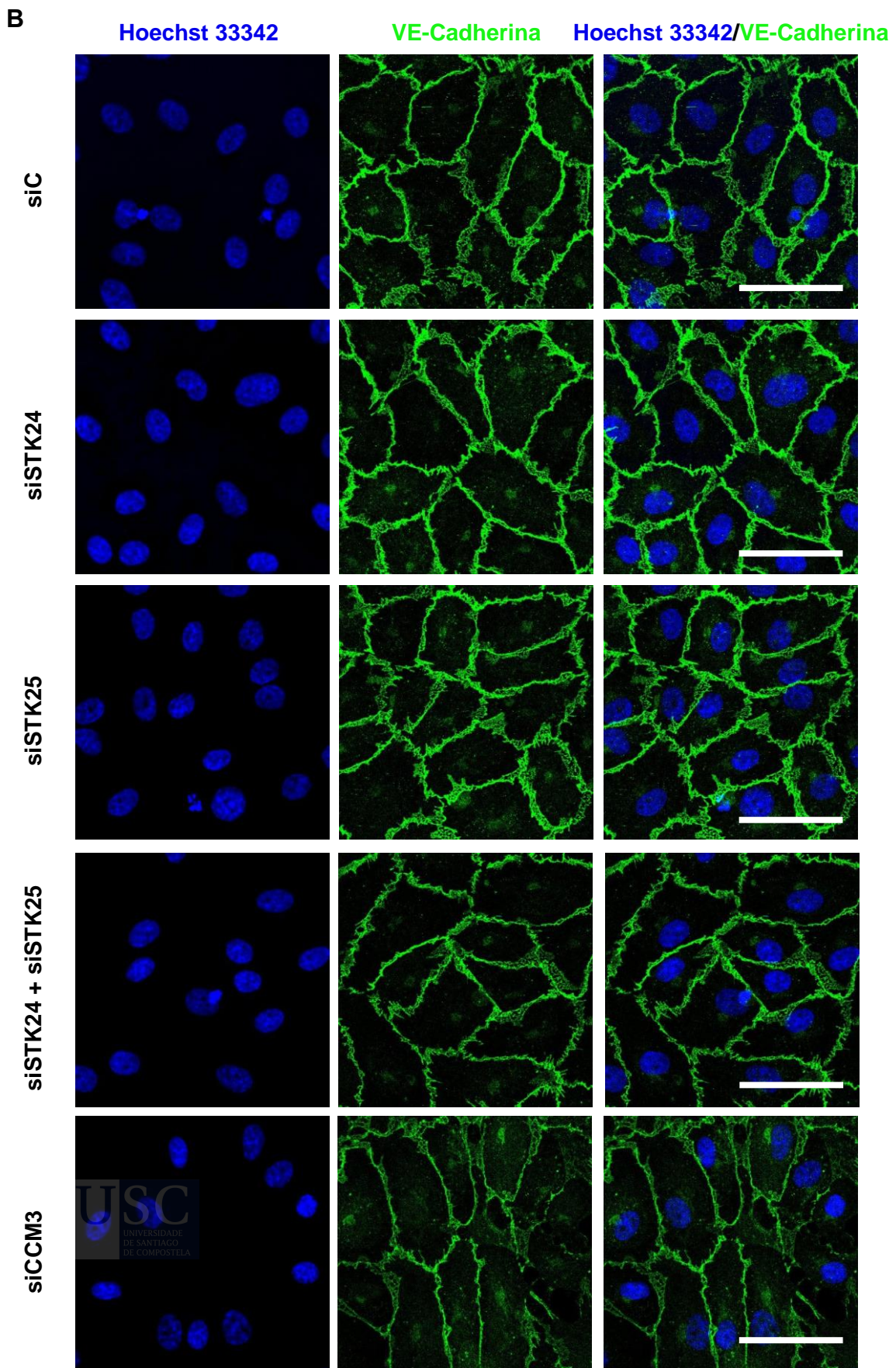


Figura 37. La presencia de VE-Cadherina en la membrana endotelial es menor en células siSTK24 + siSTK25. A. Cuantificación en al menos 50 células de cada tipo. Se utilizó el test ANOVA y un test post-hoc de Bonferroni para su análisis. **B.** Inmunofluorescencia tiñendo los núcleos con Hoechst 33342 (azul) y la VE-Cadherina (verde) en células HuVEC (ver página siguiente). Se muestran imágenes de microscopía confocal de campos representativos, obtenidas utilizando un objetivo de 63X. La barra de escala representa 50 μ m.



Haber investigado primero en líneas celulares nos permitió obtener suficientes evidencias para pensar que, eliminando STK24 y/o STK25, podría haber una alta probabilidad de que se reprodujeran estas desregulaciones celulares y que finalmente se desarrollaran malformaciones cavernosas en un organismo; consideramos que, de este modo, refinamos y utilizamos las técnicas alternativas necesarias para evitar al máximo el estrés causado por dolor, sufrimiento o daño duradero en animales. Gracias a los resultados obtenidos *in vitro*, pudimos centrar y realizar un diseño experimental con animales de experimentación teniendo en cuenta las regla de las 3 “R” para una praxis ética en la investigación biomédica.

Por tanto, para continuar la investigación, nos propusimos crear modelos de ratón que nos permitieran estudiar la relevancia de la función de dichas quinasas en el desarrollo de los cavernomas cerebrales *in vivo*.

11. LOS RATONES *KNOCKOUT* PARA *Stk24* NO DESARROLLAN MALFORMACIONES CAVERNOSAS

En primer lugar, optamos por originar una línea de ratón en la que se mutaba el gen *Stk24* mediante la tecnología CRISPR/Cas9 (ver Material y Métodos). En este caso, la mutación es constitutiva y ocurría en todas las células del individuo, no estando restringida a un tipo celular en concreto.

Además de usar los resultados de genotipado para asegurar una mutación efectiva del gen *Stk24*, quisimos también realizar un *western blot* contra STK24 de un extracto proteico de hígado de ratón para comprobar que tampoco existía expresión proteica alguna (Figura 38) y que nuestro modelo era realmente un *knockout* (KO) para *Stk24*.

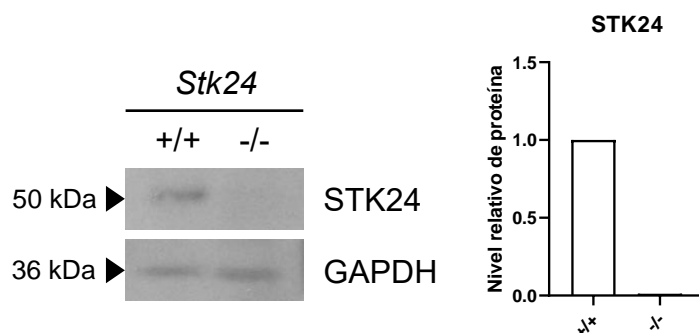


Figura 38. Los ratones homocigotos recesivos de la línea *Stk24*^{em6ic} no expresan la proteína STK24. Se realizó un *western blot* contra STK24 usando GAPDH como control de carga de un extracto proteico de hígado de ratón de cada genotipo y se cuantificó mediante densitometría.

En la literatura científica del campo ya se habían generado organismos modelo en el que se estudiaba la eliminación de *Stk24*, pero no se había relacionado esta inhibición con la formación de cavernomas cerebrales. Incorporar shRNA en el periodo embrionario en ratones afectaba a la laminación de la corteza cerebral, pero no lo hacía a la viabilidad de los individuos (Tang et al., 2014). Sin embargo, realizar una inhibición de *Stk24* en embriones de pez cebra, sí imposibilitaba que los embriones llegaran a término (Zheng et al., 2010). En otro trabajo (Iglesias et al., 2017), se habían utilizado ratones deficientes en *Stk24* con una mutación *knockdown*, y detectaban cierta expresión de STK24. En esta publicación, tampoco se reportaron lesiones vasculares ni malformaciones que comprometieran la viabilidad de los animales.

Por tanto, primero quisimos comprobar si nuestro modelo *knockout* mostraba algún tipo de letalidad o si presentaba algún tipo de lesión vascular similar a las malformaciones cavernosas

que condujera a la muerte de los individuos. Elegimos animales de 15 días de vida y procedimos a una necropsia. Cuando revisamos los encéfalos, no encontramos diferencias con los animales *wild type* en su morfología o en el área que ocupaban los vasos sanguíneos (Figura 39).

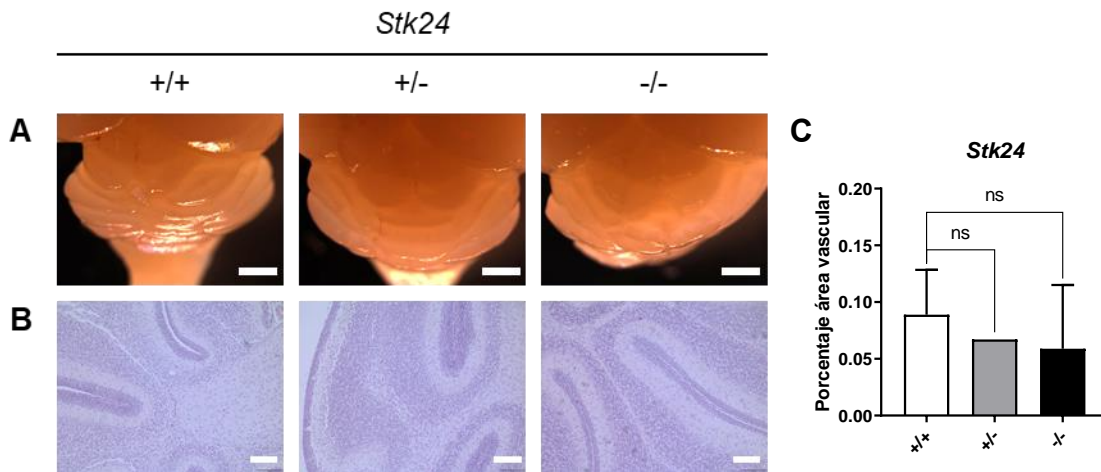


Figura 39. Los ratones mutantes para *Stk24* no muestran lesiones vasculares en el cerebelo. **A.** Imágenes de la vista superior del cerebelo de los genotipos estudiados (n=2-8) tomadas con microscopio estereoscópico. La barra de escala corresponde a 1,5 mm. **B.** Cortes histológicos parasagitales de la estructura cerebelar de ratones de los posibles genotipos. La barra de escala corresponde a 100 μ m. **C.** Cuantificación del porcentaje de área ocupada por vasos sanguíneos en cortes teñidos con hematoxilina-eosina. Se utilizó el test ANOVA y un test post-hoc de Bonferroni para su análisis.

12. LOS RATONES QUE NO EXPRESAN STK25 EN CÉLULAS ENDOTELIALES NO DESARROLLAN MALFORMACIONES CAVERNOSAS

Los datos proporcionados por la bibliografía sobre las consecuencias de eliminar *Stk25* en diferentes organismos resultaban contradictorias: mientras que la eliminación total del gen durante el desarrollo temprano de pez cebra conducía a embriones inviables (Zheng et al., 2010), en los experimentos con modelo de ratón KO para *Stk25* de Matsuki et al., (2013) no se detectaban en los embriones ninguna malformación vascular que comprometiera la viabilidad, y nacían en una frecuencia mendeliana esperada.

En nuestro caso, quisimos introducir una condición experimental más: conseguir un modelo en el que modificar la expresión de *Stk25* en un solo tipo celular, en las células endoteliales. De este modo, no solo tendríamos un modelo en ratón equivalente al que teníamos en cultivo celular al añadir siSTK25 al modelo endotelial de las células HuVEC, sino que centraríamos la mutación exclusivamente en las células en las que más se ve afectada la homeostasis celular en las malformaciones cavernosas.

Procedimos entonces a cruzar a los animales con secuencias loxP flanqueando los exones 4 y 5 del gen *Stk25* (Matsuki et al., 2013), con animales que poseyeran la modificación Cdh5-Cre/ERT2. Este transgén expresa la recombinasa Cre exclusivamente en células endoteliales, ya que *Cdh5* (o VE-Cadherina) solo se expresa en este tipo celular. Además, la recombinasa se expresa en forma de proteína de fusión con el receptor de estrógenos modificado ERT2, con lo que solo es activa cuando se trata al ratón con el análogo de estrógenos tamoxifeno. Cuando esto ocurre, el gen *Stk25* de células endoteliales con un genotipo *Stk25^{fl/fl}* se convertiría en *Stk25^{iEC/iEC}* (*inducible Endothelial Cells*), y un animal *STK25^{+fl}*, pasaría a tener células endoteliales *Stk25^{+iEC}*. Para los ratones *Stk25^{+/+}*, al no existir sitios loxP en la secuencia del gen, no se vería alterado.

Según publican Matsuki et al., (2013), para sus experimentos optaban por una inactivación aguda de *Stk25* en la etapa embrionaria de los individuos, que se adecuaba mejor a su campo de estudio. Los trabajos publicados que estudiaban malformaciones cavernosas en ratones deficientes en genes CCM que utilizaban también un método inducible con tamoxifeno, relataban que los animales solían sobrevivir entre 10 días y varios meses de edad (Mleynek et al., 2014; Boulday et al., 2011; Zhou et al., 2021), según la frecuencia de administración del fármaco y la concentración suministrada. La mayoría suministraban el tamoxifeno en el primer día de vida para conseguir las lesiones vasculares. Teniendo en cuenta esas informaciones, en nuestro caso decidimos administrar el tamoxifeno en una única dosis el primer día postnatal (P1) y esperar preliminarmente 15 días tras la inyección de tamoxifeno para analizar los animales.

Procedimos a tomar fotografías de los encéfalos y posteriormente a usarlos para realizar una tinción hematoxilina-eosina de los cortes histológicos (Figura 40): tras el análisis, no se observaron lesiones vasculares que correspondieran a malformaciones cavernosas, sugiriendo que la ausencia de STK25 en células endoteliales por sí sola no era suficiente para desarrollar cavernomas.

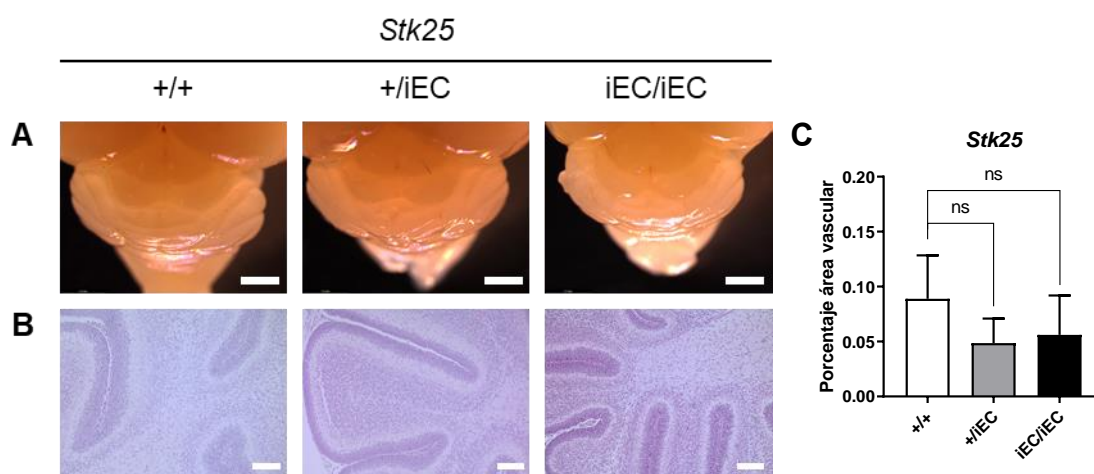


Figura 40. Los ratones mutantes para *Stk25* no muestran lesiones vasculares en el cerebelo. **A.** Imágenes de la vista superior del cerebelo de los genotipos estudiados (n=2-8) tomadas con microscopio estereoscópico. La barra de escala corresponde a 1,5 mm. **B.** Cortes histológicos parasagitales de la estructura cerebelar de ratones de los posibles genotipos. La barra de escala corresponde a 100 μ m. **C.** Cuantificación del porcentaje de área ocupada por vasos sanguíneos en cortes teñidos con hematoxilina-eosina. Se utilizó el test ANOVA y un test post-hoc de Bonferroni para su análisis.

13. LA SUPERVIVENCIA DE LOS RATONES *Stk24*^{-/-} *Stk25*^{iEC/iEC} SE VE ALTAMENTE COMPROMETIDA

Habiendo obtenido los resultados recién descritos, decidimos cruzar ambas líneas para obtener ratones deficientes en ambos genes al mismo tiempo y ver lo que ocurría cuando inyectáramos tamoxifeno.

Los cruces estaban diseñados para obtener varios genotipos distintos en una sola camada, así podríamos estudiar el efecto de los distintos genotipos en hermanos de camada tratados y criados bajo las mismas condiciones. Nuestra primera observación fue que, en el momento de sacrificar los animales a los 15 días, no conseguíamos encontrar ratones *Stk24*^{-/-} *Stk25*^{iEC/iEC}. Empezamos entonces a registrar los días en los que morían los ratones de las camadas según el genotipo (Figura 41).

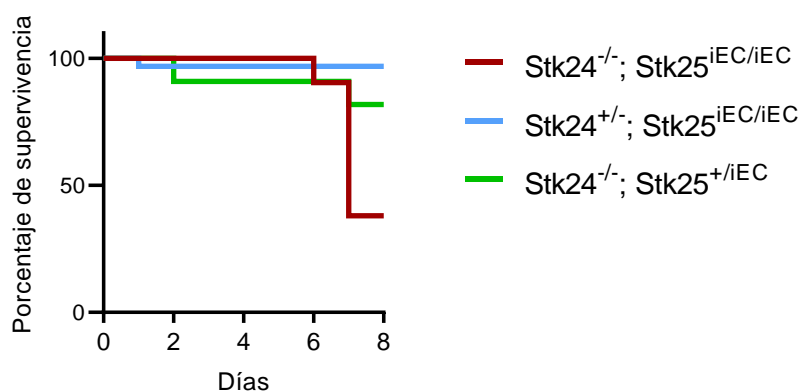
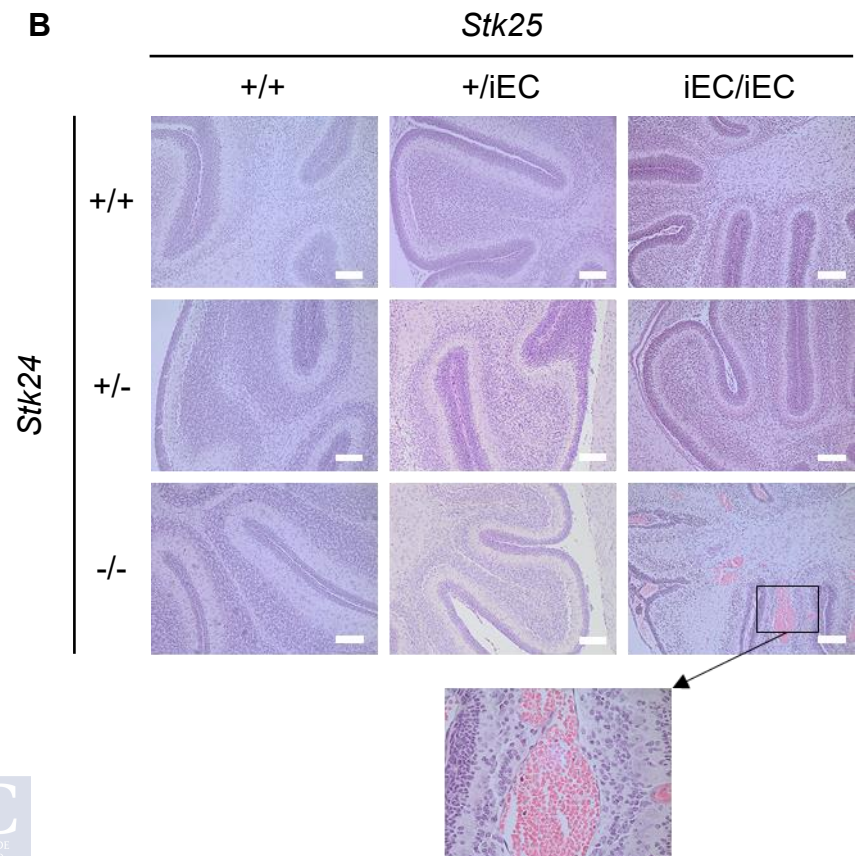
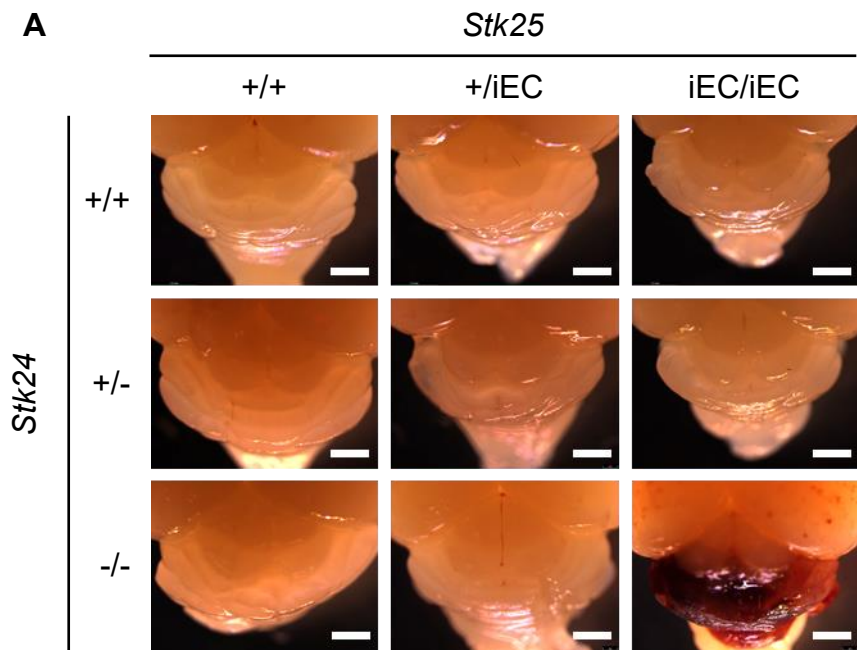


Figura 41. Curva de supervivencia de los animales de estudio tras inyectar tamoxifeno. Seguimiento diario del número de animales de cada genotipado que sobrevivía. Se utilizó el test Log-rank (Mantel-Cox) para su análisis, $p < 0,0001$. Para $Stk24^{+/-}; Stk25^{iEC/iEC}$, $n=36$; para $Stk24^{-/-}; Stk25^{+/iEC}$, $n=5$ y para $Stk24^{-/-}; Stk25^{iEC/iEC}$, $n=30$.

En nuestro modelo, la supervivencia de los ratones se veía seriamente comprometida al inducir la eliminación de *Stk25* en endotelio en ausencia de *Stk24*, con los ratones con la doble mutación mostrando una media de supervivencia de 7 días. Además, la mortalidad dependía de la inactivación de *Stk25* en célula endotelial en ausencia de *Stk24*, ya que los animales del mismo genotipo en los que no se inducía la activación de Cre sobrevivían hasta la edad adulta en las proporciones esperadas.

14. LOS RATONES $Stk24^{-/-}; Stk25^{iEC/iEC}$ PRESENTAN MALFORMACIONES CAVERNOSAS EN DIFERENTES LOCALIZACIONES

Por tanto, decidimos obtener muestras de ratones entre 6 y 8 días de edad y analizar posibles efectos en la vasculatura de diferentes órganos. Al analizar los encéfalos, observamos que existían lesiones vasculares macroscópicas en el cerebelo de los animales $Stk24^{-/-}; Stk25^{iEC/iEC}$ (Figura 42A), con signos hemorrágicos que afectaban también a ambos hemisferios cerebrales y a lo largo de la profundidad del tejido.



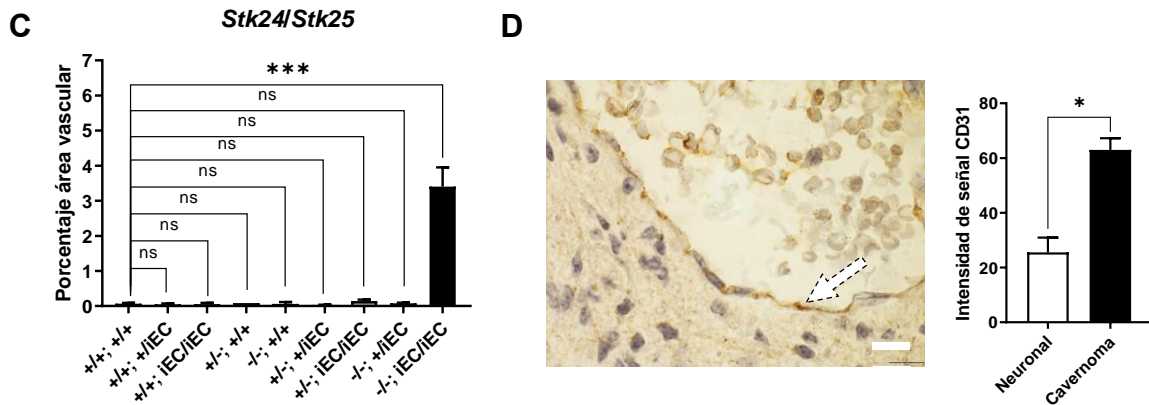


Figura 42. Los ratones mutantes para *Stk24* y *Stk25* muestran malformaciones cavernosas en el cerebelo.

A. Imágenes de la vista superior del cerebelo de los genotipos estudiados tomadas con microscopio estereoscópico. La barra de escala corresponde a 1,5 mm. **B.** Cortes histológicos parasagitales de la estructura cerebelar de ratones de los posibles genotipos; del genotipo *Stk24*^{-/-} *Stk25*^{iEC/iEC} se muestra detalle de una de las lesiones. La barra de escala corresponde a 100 µm. **C.** Cuantificación del porcentaje de área ocupada por vasos sanguíneos en cortes teñidos con hematoxilina-eosina en los genotipos de estudio. El número de ratones estudiados de cada genotipo, de izquierda a derecha es: 5, 5, 3, 1, 2, 5, 2, 3, 6. Todas las evaluaciones se realizaron a partir de dos a cinco secciones por ratón. Se utilizó el test ANOVA y un test post-hoc de Bonferroni para su análisis. **D.** Inmunohistoquímica de corte en parafina de una lesión vascular en el cerebelo usando un anticuerpo contra CD31. La barra de escala corresponde a 20 µm. Se utilizó el test t de Student para su análisis.

Al realizar tinción hematoxilina-eosina, confirmamos que eran los animales *Stk24*^{-/-} *Stk25*^{iEC/iEC} (Figura 42B) los que mostraban lesiones en tejido cerebeloso. Estas lesiones consistían en vasos dilatados (Figura 42C), redondeados y bien definidos por una fina, delgada y débil pared de células endoteliales (Figura 42D). Dispersas por las laminillas cerebelosas, las lesiones se situaban principalmente en la materia blanca, donde eran más numerosas y de mayor calibre que los que se lograban observar en las capas molecular y granular. También se localizaron grandes acumulaciones de sangre en el espacio subaracnoideo del cerebelo, que no se encontraron en ratones *Stk24*^{+/+} *Stk25*^{+/+} (Figura 43).

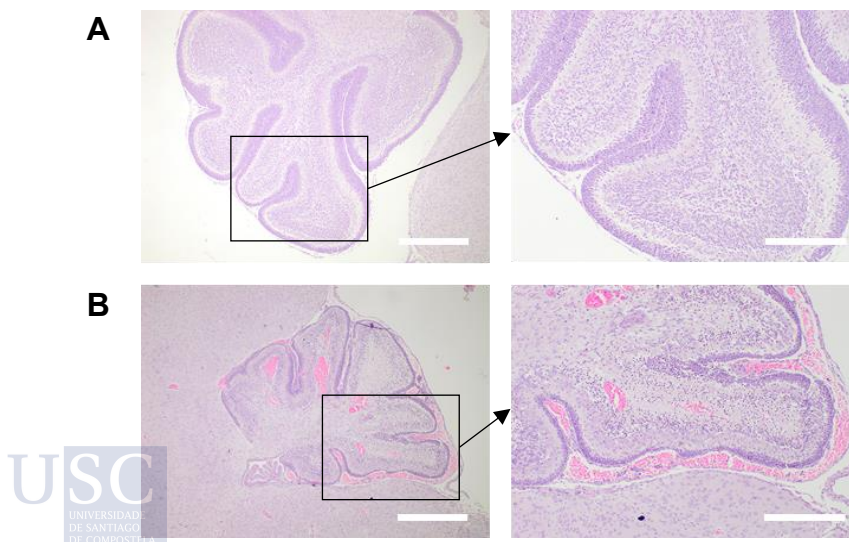


Figura 43. Los ratones mutantes para *Stk24* y *Stk25* presentan graves lesiones vasculares en el tejido cerebelar. Imágenes comparativas de cortes parasagitales del cerebelo de ratón *Stk24*^{+/+} *Stk25*^{+/+} (**A**) y ratón *Stk24*^{-/-} *Stk25*^{iEC/iEC} (**B**). La barra de escala corresponde a 400 µm en los cortes izquierdos y a 200 µm en los cortes derechos, de mayor aumento.

Revisando el resto del órgano en las preparaciones histológicas, en los ratones *Stk24*^{-/-} *Stk25*^{iEC/iEC} también pudimos observar lesiones vasculares en las capas más superficiales de la corteza cerebral (Figura 44A), captadas también en la superficie del cerebro con microscopio estereoscópico (Figura 44B). Al cuantificar el volumen que ocupaban (Figura 44C), las diferencias resultaban significativas al compararlos con animales *wild type*.

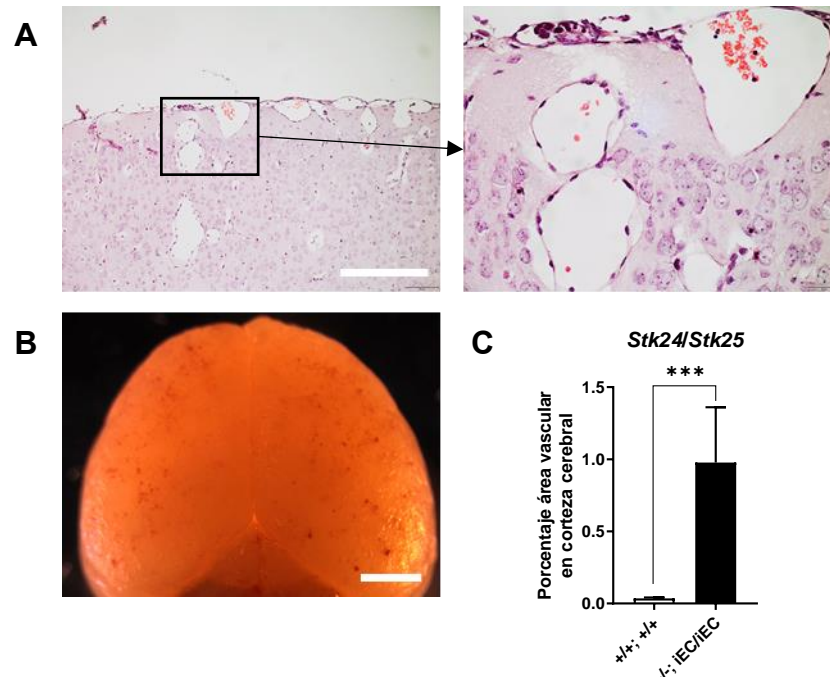


Figura 44. Los ratones *Stk24*^{-/-} *Stk25*^{iEC/iEC} también muestran cavernomas en la corteza cerebral. A. Imágenes de tinción hematoxilina-eosina de corteza cerebral representativas de ratones *Stk24*^{-/-} *Stk25*^{iEC/iEC}, con dos aumentos diferentes. Las barras de escala representan 200 μ m (izquierda) y 100 μ m (derecha). **B.** Se enseña vista superior representativa de ambos hemisferios cerebrales de un ratón *Stk24*^{-/-} *Stk25*^{iEC/iEC}; la barra de escala representa 1 mm. **C.** Cuantificación del porcentaje de área ocupada por vasos sanguíneos en cortes teñidos con hematoxilina-eosina en los genotipos de estudio (n=2-8). Se utilizó el test t de Student para su análisis.

Además, en estos animales, pudimos comprobar que las lesiones también aparecían localizadas en la fimbria del hipocampo (Figura 45). Concluimos que la ausencia de *Stk24* y *Stk25* en células endoteliales de ratones neonatos provocaba la aparición de lesiones morfológicamente indistinguibles de cavernomas en el encéfalo.

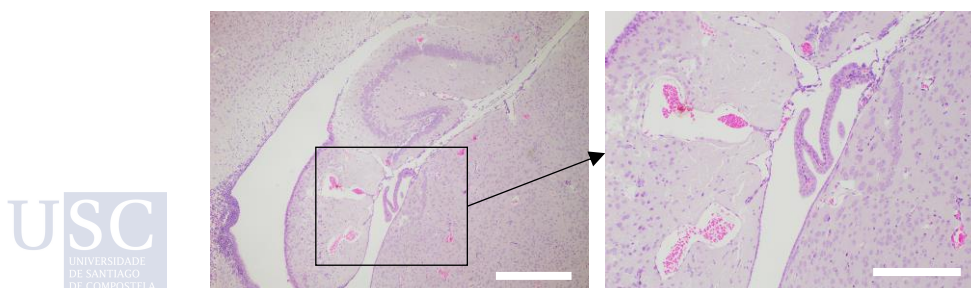


Figura 45. Ratones *Stk24*^{-/-} *Stk25*^{iEC/iEC} presentan lesiones en el hipocampo. Tinción hematoxilina-eosina del hipocampo de ratón *Stk24*^{-/-} *Stk25*^{iEC/iEC}. Las barras de escala representan 400 μ m (izquierda) y 200 μ m (derecha).

Además de ver los signos de afectación en las estructuras del SNC que indicamos, al realizar la necropsia de los animales también nos percatamos de que los bazo de los animales *Stk24^{-/-} Stk25^{iEC/iEC}* (Figura 46B) tenían una coloración más oscura que los bazo de animales *Stk24^{+/+} Stk25^{+/+}* (Figura 46A), además de presentar abultamientos. Al verlos en preparaciones histológicas, pudimos observar una gran desorganización tisular, y que la pulpa blanca y roja de los bazo normales se veían sustituidas por abundantes hemorragias y trombosis en los bazo de los mutantes (Figura 46C).

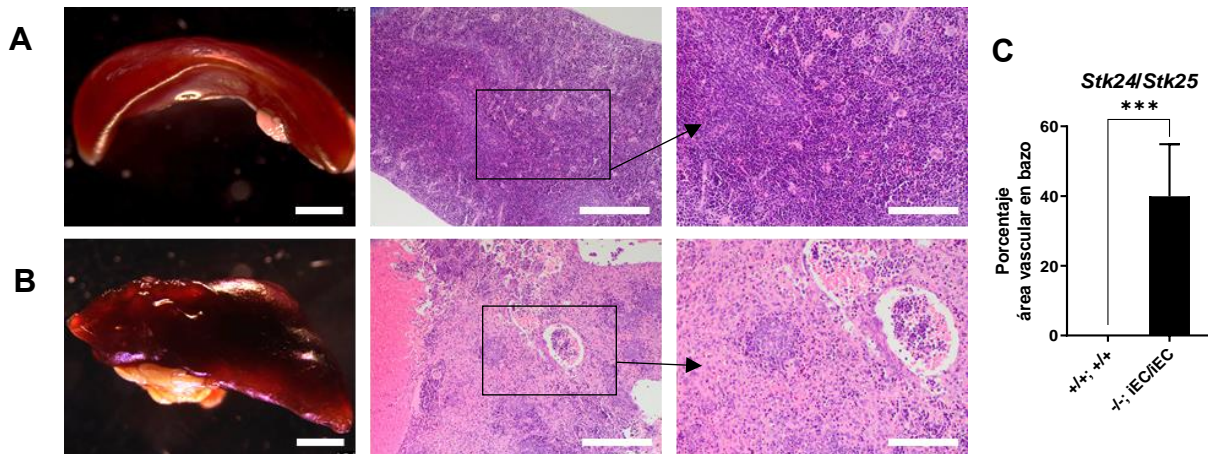


Figura 46. Los ratones *Stk24^{-/-} Stk25^{iEC/iEC}* ven afectada la estructura histológica de sus bazo. A. Vista con microscopio estereoscópico y tinción hematoxilina-eosina del bazo de ratón *Stk24^{+/+}; Stk25^{+/+}* y de ratón *Stk24^{-/-} Stk25^{iEC/iEC}* en dos aumentos (derecha a izquierda) en **B**. Las barras de escala representan 2 mm (izquierda), 200 μ m (centro) y 100 μ m (derecha). **C**. Cuantificación del porcentaje de área ocupada por vasos sanguíneos en cortes teñidos con hematoxilina-eosina (n=2). Se utilizó el test t de Student para su análisis.

15. LAS CÉLULAS ENDOTELIALES DE CEREBRO DE RATONES *Stk24^{-/-} Stk25^{iEC/iEC}* PRESENTAN UNA ALTA EXPRESIÓN DE LOS GENES *Klf2* Y *Klf4*

Además del estudio histológico de las lesiones, consideramos oportuno conocer en más detalle y caracterizar a las células endoteliales que formaban las paredes de estas lesiones vasculares. Procedimos a realizar primero un aislamiento de células endoteliales del cerebro de ratones *Stk24^{+/+} Stk25^{+/+}* y *Stk24^{-/-} Stk25^{iEC/iEC}* según se detalla en Material y Métodos, para obtener dos tipos de extractos de RNA diferentes. Uno era el extracto CNEs (células no endoteliales), que lo conformaban las células que no se habían unido al anticuerpo anti-CD31 acoplado a las *DynabeadsTM*; es decir, aquellas células CD31⁻ y que no eran células endoteliales. El otro era el extracto de RNA CEs (células endoteliales), obtenido al separar las células unidas al anticuerpo anti-CD31, es decir, CD31⁺ y de naturaleza endotelial.

Usamos primero estos dos extractos para comprobar que el aislamiento había funcionado correctamente (Figura 47A): empleando el gen *Pecam1* (o CD31) como un marcador específico de identidad endotelial y al *Gfap*, un clásico marcador de células gliales, pudimos probar que la técnica de aislamiento había funcionado correctamente: en el extracto CEs se detectaba alta expresión de *Pecam1* y baja de *Gfap*; en el extracto CNEs ocurría lo contrario. Además, comprobando los genes de estudio, también confirmamos que la expresión de *Stk24* era mínima en ambos extractos y que la expresión de *Stk25* estaba reducida en células endoteliales.

Después de estas comprobaciones, quisimos fijarnos en la expresión de los genes *Klf2* y *Klf4* de las células endoteliales aisladas (Figura 47B). Para ambos genes, su expresión se veía aumentada significativamente en los animales cuyas quinasas no se expresaban. Además, otro

gen usado como marcador endotelial y relevante en el estudio de las CCM, el *Cdh5* (o *Ve-Cadherina*) variaba su expresión al eliminar las quinasas, ya que se detectaba una reducción. Por tanto, la eliminación de ambas quinasas simultáneamente en células endoteliales conseguía estimular la expresión de *Klf2* y *Klf4*, imitando lo que ocurría en mutantes para genes *Ccm*; además, el gen codificante para VE-Cadherina veía reducida su expresión en los ratones mutantes.

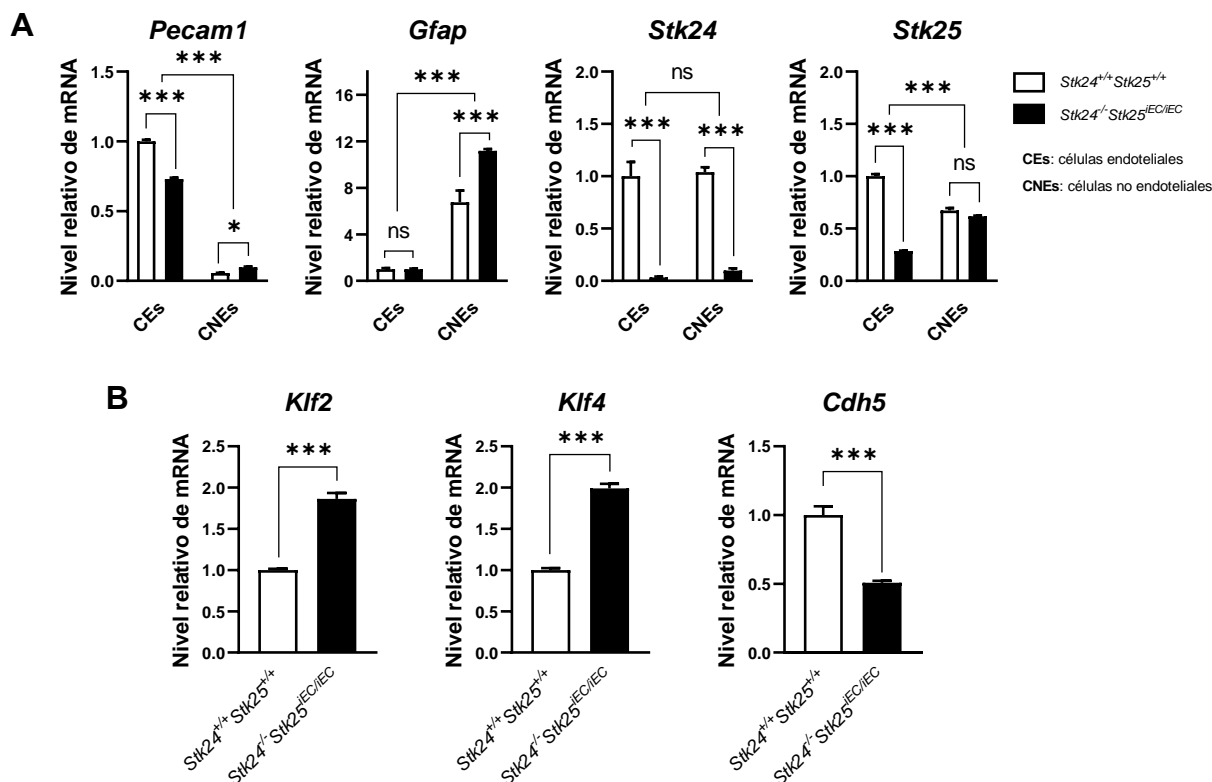


Figura 47. Las células endoteliales aisladas de cerebro de ratones *Stk24^{-/-} Stk25^{iEC/iEC}* sobreexpresan los genes *Klf2* Y *Klf4*. **A.** Resultados de *qPCR* de extractos de RNA de células aisladas del cerebro de ratón. Se enfrentan extractos de células aisladas usando el anticuerpo anti-CD31 y *Dynabeads*TM (CEs: células endoteliales) y células que se recuperaron del aislamiento y que no se unieron al anticuerpo anti-CD31 (CNEs: células no endoteliales). También se comparan los genotipos *Stk24^{+/+} Stk25^{+/+}* versus *Stk24^{-/-} Stk25^{iEC/iEC}*. Para comprobar la eficiencia del aislamiento se utilizaron genes marcadores de células endoteliales (*Pecam1*) o de naturaleza glial (*Gfap*), además de asegurar una buena inhibición de *Stk24* y *Stk25*. **B.** Resultados de *qPCR* de extractos de RNA de células endoteliales (CD31⁺) midiendo los genes *Klf2* y *Klf4*. Para animales *Stk24^{+/+} Stk25^{+/+}*, n=8; para animales *Stk24^{-/-} Stk25^{iEC/iEC}*, n=5. Se utilizó el test ANOVA y un test post-hoc de Bonferroni para su análisis.

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

Las malformaciones cavernosas cerebrales consisten en grupos de vasos en forma de cavernas de paredes delgadas sin estroma intermedio. Pertenecen al grupo de malformaciones vasculares de bajo flujo y ocurren en los lechos vasculares entre venas y capilares (Clatterbuck et al., 2001). La forma familiar de esta afección está ligada a mutaciones en los genes *CCM1*, *CCM2* y *CCM3*, a los que se ha añadido recientemente *CDC42* (Laviña et al., 2018). Son los portadores de mutaciones en *CCM3* los que presentan mayor riesgo de hemorragias cerebrales y a edades más tempranas (Denier et al., 2006; Riant et al., 2013).

A lo largo de los últimos años, muchas investigaciones se han dedicado a estudiar en profundidad cuáles son las vías de señalización que se ven alteradas en las células de los pacientes de CCM y que llevan a originar la enfermedad. El conocimiento generado sobre los componentes de estas rutas y las relaciones de activación e inhibición entre las moléculas que las componen, han ofrecido la oportunidad de probar fármacos que actúan sobre las alteraciones que presentan estas vías y que consiguen revertir o modular los defectos de las células sin genes *CCM*. Por ejemplo, inhibidores de vías como MEKK3-KLF2/4 (Choi et al., 2018) o de la β -catenina (Bravi et al., 2015) consiguen revertir el fenotipo al de una célula normal; también con muchos de los inhibidores de la ruta RhoA-ROCK (Borikova et al., 2010; McKerracher et al., 2020). De hecho, uno de los inhibidores de la ruta de RhoA-ROCK está siendo usado en el único ensayo clínico para tratar malformaciones cavernosas hasta la fecha: se trata de la atorvastatina, que se encuentra en la Fase II (Identificador <https://clinicaltrials.gov/NCT02603328>; Polster et al., 2019).

Por tanto, creemos que es importante seguir investigando qué otras proteínas o vías celulares se ven modificadas en las células sin genes *CCM*, ya que podrían encontrarse nuevas estrategias de tratamiento farmacológico que pudieran cambiar la historia natural de la enfermedad y de su tratamiento.

Actualmente, la neurocirugía es el único tratamiento propuesto para tratar a los pacientes. Como ya comentamos, este procedimiento no siempre está recomendado y presenta una serie de riesgos y complicaciones que no todos los pacientes pueden tolerar o que incluso está contraindicado. Una solución farmacológica que impida que aparezcan nuevas lesiones, que pueda detener el desarrollo de los cavernomas ya presentes, o que elimine selectivamente las células defectivas de las lesiones pueden ser buenas estrategias para ensayar.

1. LA CANTIDAD DE VEGFR2 Y EGFR EN CÉLULAS ENDOTELIALES SIN CCM3 SE REGULA DE DIFERENTE FORMA

Resultados previos del laboratorio (Tesis Doctoral de la Dra. Ebel Florida) que ya teníamos antes de esta tesis eran que, a pesar de que los dos receptores de factores de crecimiento VEGFR2 y EGFR se sobreexpresan en células deficientes para *CCM3*, lo hacen por mecanismos distintos. Mientras que los efectos de la falta de *CCM3* sobre VEGFR2 están

mediados por un aumento de su mRNA, los de EGFR dependen de un aumento de su vida media, sin que sus niveles de mRNA estén alterados. En este aspecto, hemos replicado los resultados que se habían obtenido con respecto al papel que el VEGFR2 jugaba en la patogenia de las CCM (He et al., 2010; Renz et al., 2015; Di Stefano y Glading 2020). Así, usando un modelo endotelial que no se había valorado, comprobamos que las células hCMEC/D3 también presentaban un aumento de la proteína de VEGFR2 en ausencia de CCM3. Este resultado también concordaba con los que Floridia (2016) describía en su trabajo con células HuVEC. El receptor del factor epidérmico de crecimiento (EGFR o ErbB1) es uno de los receptores tirosina quinasa más estudiados. Pertenece a la familia de receptores ErbB y pueden unírsele hasta 7 ligandos distintos, pero el más conocido es el EGF.

Como ocurría con VEGFR2, nuestros modelos celulares endoteliales, HuVEC y hCMEC/D3, y epiteliales, las A549, presentaban un aumento de la proteína total del EGFR (Floridia, 2016). En los tres modelos, el EGFR mostraba mayor cantidad cuando se eliminaba CCM3. Como ya se comentó, Floridia había descrito que la cantidad de proteína EGFR era mayor en ausencia de CCM3. También, que había una diferencia notable con el caso del VEGFR2: al analizar la expresión del gen *EGFR*, no veía diferencias a nivel de mRNA para receptor entre células control y células sin CCM3. Tras un experimento inhibiendo la síntesis de proteína *de novo* concluyó que era la diferencia en la vida media de la proteína EGFR lo que provocaba su acumulación en ausencia de CCM3. Nos interesamos entonces por las vías de degradación que regulaban la cantidad de EGFR en la célula.

2. EL EGFR SE DEGRADA PREFERENTEMENTE POR VÍA LISOSOMAL

Estudiando los mecanismos de degradación del EGFR en células sin CCM3, llegamos a la conclusión de que EGFR se degrada preferentemente por vía lisosomal, y que esta vía está alterada cuando CCM3 es defectivo. Estos resultados concuerdan con lo que se sabe sobre la degradación de EGFR.

Como indica Bakker et al., (2017), la vida media y funcional del EGFR depende de sus ratios de internalización, reciclaje, degradación y expresión génica, y esto, a su vez, depende del tipo celular. Aunque esté en su forma inactiva, el EGFR se acumula en la membrana celular, para tener la máxima accesibilidad a sus ligandos, mediante una endocitosis lenta y un reciclaje de vuelta a la membrana rápido desde endosomas positivos para la proteína Rab11. Una vez que se une el ligando, el complejo receptor-ligando pasa a las rutas endocíticas. En este caso, la señal para activar las rutas de transducción de membrana continúa hasta que los receptores sean devueltos a la membrana o degradados en los lisosomas. Los principales eventos de activación, como las uniones de las proteínas adaptadoras u otras enzimas, ocurren mientras el receptor se encuentra en las vesículas, ya que los dominios tirosina quinasa están expuestos al citoplasma. El destino de los receptores endocitados dependerán de los niveles de ligando que esté recibiendo la célula.

Cuando los niveles de EGF son bajos, el EGFR es endocitado mediante una endocitosis dependiente de clatrina: el receptor activado atrae proteínas adaptadoras que reclutarán clatrina para que la endocitosis sea rápida, convirtiéndose la estructura en un endosoma temprano (Sigismund et al., 2018).

Dependiendo de cómo continúe la señal de EGF, este endosoma puede tomar dos caminos: con una baja concentración de EGF, el receptor acabará siendo inactivado (por fosfatasa, por ejemplo) y volverá a la membrana mediante un endosoma de reciclaje. Si la señal ha aumentado o es continuada en el tiempo, será marcado para su degradación mediante vía lisosomal. Cuando la señal de ligando es intensa, o la ruta mediada por clatrina está saturada, se opta por endocitar al receptor mediante endocitosis independiente de clatrina, que se produce

con mayor rapidez. Además, bajo estas condiciones, una de las proteínas que se acoplan al receptor activado, Grb2, también va a servir como anclaje para la E3 ubiquitina ligasa CBL, resultando en el receptor marcado para su degradación. Este es un ejemplo de que es la propia activación del receptor la que inicia las rutas de señales necesarias para finalizarla y que su funcionamiento esté regulado (Avraham y Yarden, 2011).

Una vez endocitado mediante la vía independiente de clatrina y marcado para degradación, pasa a endosomas tempranos y, dado su marcaje de ubiquitina, convertido en un endosoma tardío. También puede terminar dentro de un cuerpo multivesicular, lo cual terminaría también con la señalización. Finalmente, se fusionará con un lisosoma y se degradará.

Conocida esta información sobre la regulación de la vida media y localización del receptor mediada por su ligando, quisimos saber si al eliminar CCM3 en células A549 alterábamos la forma de degradación del receptor.

En nuestro caso, al usar un inhibidor de la vía de degradación del proteosoma, el MG132, no vimos ninguna diferencia entre las células tratadas, tanto control como mutadas, por lo que concluimos que esta ruta de degradación continuaba inalterada. Sin embargo, sí que existía una diferencia notable cuando inhibíamos la vía lisosomal, ya que observamos acumulación del EGFR, lo cual como hemos dicho, concordaba con lo que había sido descrito en la literatura. No solo eso, sino que en células sin CCM3 la cloroquina no parecía capaz de aumentar los niveles de EGFR de forma proporcional a como lo hacía en células normales, indicando que la degradación ya estaba alterada en ausencia de cloroquina.

Publicaciones anteriores (Guerrero et al., 2015; Marchi et al., 2015) describían modelos celulares sin CCM3 o sin CCM1, respectivamente, que manifestaban problemas de autofagia, ya que células sin estos genes acumulaban ciertas proteínas en el citoplasma, lo que es consistente con nuestros resultados.

3. LA FALTA DE CCM3 NO AFECTA A LA INTERNALIZACIÓN DEL EGFR

Utilizando diferentes técnicas, pudimos determinar que las células que no expresan CCM3 son capaces de internalizar el EGFR.

Sabíamos que el EGFR se internalizaba cuando se le unía su ligando como proceso regulatorio. Nos planteamos si la falta de CCM3 podía tener un papel importante en este mecanismo y producirse un defecto en la internalización del receptor, además de los efectos que acabamos de describir sobre su degradación. Diseñamos una serie de experimentos en los que medíamos y observábamos la cantidad de receptor en relación con el tiempo expuesto al EGF y a su presencia en membrana mediante diferentes técnicas. Exponer a las células hCMEC/D3 a EGF a diferentes tiempos no representaba ninguna diferencia en su internalización, ya que las células sin CCM3 eran sensibles a la presencia de EGF y también disminuían sus niveles de EGFR en presencia del ligando. Tampoco había acumulación de receptor en la membrana de células A549 sin CCM3.

CCM3 había sido relacionado en diferentes trabajos con el manejo y dinámica de las endomembranas celulares (Zhang et al., 2013; Lant et al., 2015; Zhou et al., 2016; Pal et al., 2017) en diferentes organismos. Generalmente en ausencia de CCM3 se presentaban problemas en procesos de exocitosis y endocitosis. Sin embargo, nuestros resultados apuntan a que el receptor no se acumula en la membrana, que su internalización es independiente de la presencia de CCM3 y que no explican la diferencia en la cantidad de receptor.

4. EL TRATAMIENTO CON LAPATINIB NO REVIERTE LOS DEFECTOS DE CÉLULAS ShCCM3

Cuando usábamos el inhibidor de EGFR Lapatinib sobre cultivos celulares, no percibimos que rutas alteradas como la de MEKK3-KLF2/4 o la distribución de VE-Cadherina en la membrana se normalizaran.

El conocimiento sobre el EGFR nos hizo hipotetizar que fuera una buena diana para el tratamiento de las CCMs. Ha sido descrito como regulador de procesos angiogénicos, de proliferación y diferenciación asociados a tumores. Al ser tan relevante en la investigación del cáncer, también ha sido muy estudiado y existe una gran cantidad de información y estudios clínicos sobre él. Además, existe una amplia colección de fármacos inhibidores de su fosforilación y de su activación de cascadas de señalización celular.

En ausencia de ligando, el EGFR existe en forma monomérica inactiva; cuando hay unión al ligando, alcanza una conformación dimérica, pero no siempre formado por dos unidades iguales (homodímeros); el EGFR o ErbB1 es capaz de unirse a otros monómeros de la familia erbB, como el ErbB2 o HER2 y funcionar como heterodímeros (Uribe et al., 2021). Cuando su ligando se une al EGFR, el dominio tirosina quinasa se autofosforila y se activan las vías de transducción de señales que regulan funciones como la migración, la proliferación o la supervivencia celular (Figura 48).

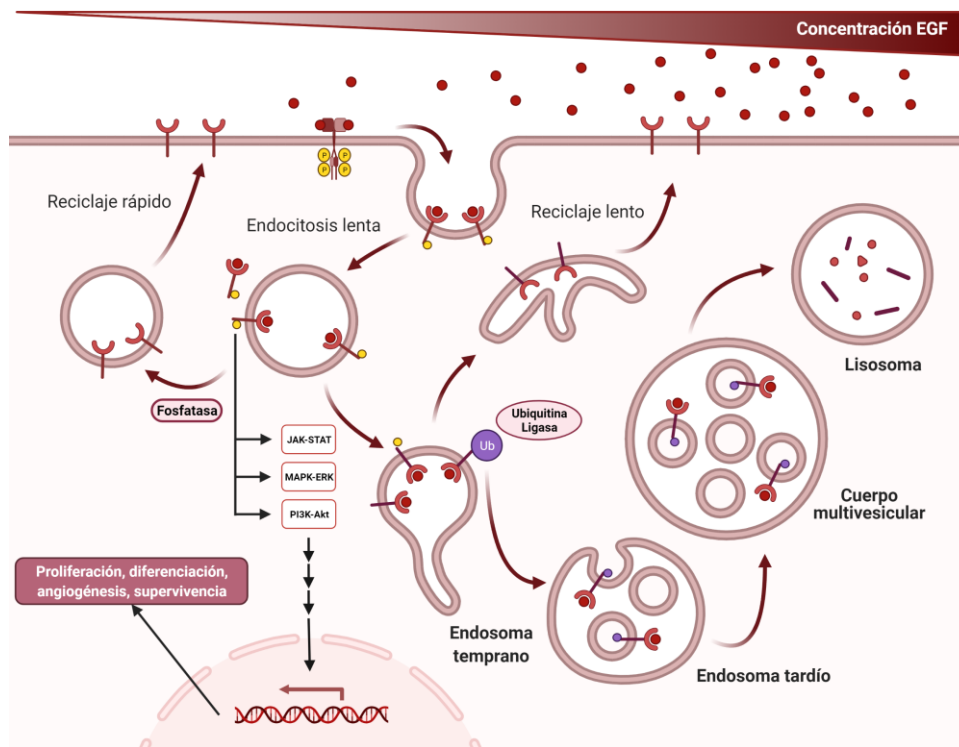


Figura 48. Rutas de regulación de la actividad, endocitosis y degradación que puede seguir el EGFR. La homodimerización del EGFR al activarse inicia rutas de transducción de señales. Estas vías regulan múltiples procesos biológicos, como la expresión génica, la proliferación celular, angiogénesis e inhibición de la apoptosis, que contribuyen al desarrollo de malignidad en procesos cancerosos. A concentraciones bajas de EGF, el receptor activado es endocitado mediante estructuras de clatrina; posteriormente, es llevado a los endosomas tempranos y puede volver a la membrana siguiendo una ruta de reciclaje. Si la concentración de EGF es alta, es endocitado rápidamente sin necesidad de la clatrina, marcado para su degradación y llevado mediante diferentes endosomas al lisosoma. Ilustración creada con BioRender.com; basada en Bakker et al., (2017) con permiso de *Company of Biologists Ltd.*

Aunque está presente en células normales, el EGFR está sobreexpresado en líneas tumorales celulares y en la mayoría de los tumores sólidos, incluyendo cáncer de mama, cáncer de cabeza y cuello, renal, de ovario, de colon o cáncer de pulmón de células no pequeñas (Herbst y Langer, 2002). También en células endoteliales de tumores se ha detectado expresión del EGFR (Amin et al., 2006).

Esta sobreexpresión o sobreactivación genera una señalización más intensa y prolongada en el tiempo de las rutas controladas por el receptor que deriva en procesos tumorales. También pueden producirse en la secuencia del receptor alguna mutación que acabe con activación constitutiva.

Para tratar el cáncer asociado a las alteraciones del EGFR, se utilizan inhibidores del receptor (Quatralé et al., 2011). Uno de los existentes es el Lapatinib.

Como se ha mencionado anteriormente, el Lapatinib (o GW572016) es un inhibidor reversible de EGFR y HER2 (ErbB2) que reduce considerablemente la proliferación de células cancerosas que sobreexpresan los receptores, *in vivo* e *in vitro* (Rusnak et al., 2001). A nivel intracelular, el Lapatinib se une de forma reversible al sitio de unión del ATP al dominio tirosina quinasa, evitando la fosforilación.

Conocido el potencial terapéutico del Lapatinib y que se confirmara su capacidad de inhibir la fosforilación activadora del residuo Tyr1148 en células A549 (Florida, 2016), probamos a tratar células A549 y hCMEC/D3 con Lapatinib. En concreto, quisimos observar si el fármaco era capaz de inhibir una de las rutas más relevantes en la patogenia de las CCM, la ruta MEKK3-KLF2/4. Después de aplicar Lapatinib en cultivos, medimos la expresión de KLF2 y de KLF4 que usamos como readouts de la vía. En ninguno de los tipos celulares se conseguía reducir la sobreexpresión de los factores de transcripción. Lejos de parecer extraño, se había descrito un caso similar previamente.

En concreto, la inhibición farmacológica del VEGFR2 (cuya cantidad de proteína y mRNA estaba aumentada en células sin CCM3) usando su inhibidor específico Vatalinib, tampoco reducía la expresión de KLF2 y KLF4. Este efecto sobre VEGFR2 se había publicado (Renz et al., 2015), descrito en peces cebra sin *ccm2* a los que trataban con un inhibidor. Al medir *klf2*, no registraban descenso a niveles de animales control y concluían que VEGFR2 no actuaba upstream *klf2*. En nuestro caso, probablemente ocurra algo similar y el EGFR no actúe sobre la ruta de MEKK3-KLF2/4.

Además, el EGFR tampoco estaría actuando sobre la regulación de VE-Cadherina. Al usar Lapatinib, no se percibía recuperación en la distribución ni en la cantidad de esta cadherina en las células hCMEC/D3 sin CCM3, así que la anormal cantidad de EGFR no supondría ningún cambio sobre la VE-Cadherina y las uniones adherentes.

5. LAS CÉLULAS ENDOTELIALES ShCCM3 SON MÁS SUSCEPTIBLES A MUERTE CELULAR AL TRATARLAS CON LAPATINIB

Al aplicar el Lapatinib a cultivo de célula endoteliales, nos percatamos de que las células que no expresaban CCM3 presentaban una marcada susceptibilidad a sufrir apoptosis cuando se inhibe la actividad del EGFR.

Al conocer que no existía relación entre la cantidad excesiva de EGFR en células sin CCM3 y la regulación de vías como MEKK3-KLF2/4 y de la VE-Cadherina en las uniones adherentes, nos enfocamos sobre los efectos antitumorales del Lapatinib (Díaz et al., 2010), relacionados con el arresto del ciclo celular y efectos apoptóticos.

Primero quisimos realizar un acercamiento a la muerte celular en células hCMEC/D3 al testar diferentes dosis de Lapatinib en células con y sin presencia de CCM3. Ensayos de MTT mostraron una interesante diferencia en la viabilidad celular: las células endoteliales sin CCM3

mostraban una mayor susceptibilidad a la muerte celular al tratarlas con Lapatinib e inhibir al EGFR. Esto ocurría al inhibir el receptor de EGFR en particular, y no al inhibir el VEGFR2, además, en el rango de concentración para el Lapatinib usada en clínica (Burris et al., 2005), representando una ventaja.

Para afinar todavía más la información sobre la viabilidad, el ensayo detectando la actividad de la caspasa 3/7 confirmaba en células endoteliales que las deficientes en CCM3 era más susceptibles a morir por apoptosis usando Lapatinib. Aunque es verdad que su aplicación a células hCMEC/D3 control repercutía también en su viabilidad, esto era más evidente cuantas más horas se trataran. Sin embargo, la diferencia en el número de células muertas entre las control y las que no expresaban CCM3 se percibía en pocas horas. Además, las células HuVEC son células primarias y se consideran un modelo más próximo a las células endoteliales que podríamos encontrar en los pacientes de CCM; por tanto, los resultados en HuVEC nos parecieron más trascendentes.

En cuanto al mecanismo molecular subyacente a estos resultados, podemos sospechar que CCM3 tiene un papel regulador de la actividad quinasa y en el reciclaje del receptor, directa o indirectamente.

Por un lado, parece que CCM3 no tiene influencia en la regulación del receptor mientras está en la membrana ni al internalarlo, ya que esos mecanismos permanecen intactos incluso en ausencia de la CCM3. Sin embargo, debemos considerar que los principales eventos de activación del EGFR ocurren mientras el receptor se encuentra en las vesículas, ya que los dominios tirosina quinasa están expuestos al citoplasma.

Es posible que CCM3 interactúe directamente sobre EGFR, promoviendo su inactivación. Ya que habitualmente tiene un papel de proteína adaptadora o facilitadora, podría también reclutar a fosfatasa para actuar sobre receptor o servir de proteína andamio de proteínas inhibitoras de las cascadas de señalización que desencadena el EGFR.

El EGFR está descrito como elemento *upstream* de la vía PI3K-Akt, que termina por estimular la proliferación. Curiosamente, esta misma ruta ha sido relacionada con el empeoramiento en tamaño y gravedad de las lesiones originadas en un principio por la mutación de los genes CCM, al activarse simultáneamente por mutación activadora del gen PIK3CA (Ren et al., 2021). Podría ocurrir que la alta cantidad de EGFR en las células sin CCM3 explique la sobreactivación de la vía de PI3K, y que sea la inhibición de esta vía lo que subyazca a la susceptibilidad de las células deficientes en CCM3 al Lapatinib.

Las posibilidades que tiene el Lapatinib como terapia ofrecen una serie de ventajas e inconvenientes. Una de las ventajas que ofrece es que se ha utilizado previamente en el tratamiento del cáncer de mama en combinación con otros fármacos en varios ensayos clínicos (NCT00470704; Lin et al., 2015; Medina y Goodin, 2007 o NCT01782651) y otros tipos de cáncer (NCT00044343) y que fue aprobado por la *US Food and Drug Administration* (FDA) en 2007 para tratar el cáncer de mama. Esto facilitaría la cuestión de seguridad clínica y tramitación de su uso para otra dolencia como las CCM. Su administración suele ser por vía oral y supondría una alternativa a la neurocirugía.

Sabiendo que produce la apoptosis de las células sin CCM3, podemos suponer que actuaría en las células endoteliales de los cavernomas que los pacientes ya presenten, matando estas células, evitando que crezcan en tamaño y se agraven. También evitaría que aparezcan en lesiones nuevas.

Sin embargo, antes de poder pensar en el Lapatinib como terapia farmacológica, deben efectuarse experimentos en modelos animales probando diferentes concentraciones, aplicación

y estrategias temporales de administración del fármaco para comprobar su efectividad sobre las lesiones. También podrían considerarse replicar nuestros resultados sobre la viabilidad celular usando otras drogas inhibitoras del EGFR, como el Afatinib o el Erlotinib, usados experimentalmente y que también se usan en el tratamiento de cáncer de mama (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT04158947) o carcinoma de pulmón (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT03460678).

Además, aunque las células mutadas estén formando cavernas y se puedan producir hemorragias en el transcurso natural de la enfermedad, eliminar estas células endoteliales con el tratamiento podría llevar a hemorragias severas que agraven la patología. En todo caso, si esto es así el describirlo sería importante para saber cómo les afectaría a los pacientes con CCMs si se tratan con estos fármacos.

Sin embargo, nos hace ser optimistas el hecho de que en la bibliografía podemos encontrar un ejemplo exitoso de uso de un fármaco que produce la muerte de células endoteliales en una malformación vascular. Es el caso de los hemangiomas infantiles, un tipo de tumor benigno, que se tratan utilizando el fármaco β -bloqueante propranolol (Leaute-Labreze et al., 2008). El mecanismo de actuación del propranolol (Li et al., 2015) se basa en promover la apoptosis de las células endoteliales del hemangioma. A pesar de ello, no se registran sangrados ni daños en los pacientes, y se considera en tratamiento más efectivo para eliminar el tumor.

Como ya hemos señalado, la forma familiar de las malformaciones cavernosas cerebrales está ligada a mutaciones en los genes *CCM1*, *CCM2* y *CCM3*. El estudio de las alteraciones que aparecían en la célula al eliminarlos hizo posible conocer en qué rutas estaban implicadas las proteínas CCM, con qué otras moléculas interactuaban o diseñar maneras de abordar tratamientos farmacológicos. Sin embargo, se sabe que un 22 % de los casos esporádicos no se detectan mutaciones en ninguno de los 3 genes CCM (Haasdijk et al., 2012). Este hecho indica que pueden existir mutaciones en otros genes que todavía no se conocen y que dan origen a la misma patología; su búsqueda y observación pueden enriquecer el conocimiento que ya se tiene de los cavernomas.

Por ejemplo, Laviña et al., (2018) presentaron a CDC42, una proteína GTPasa, como una molécula relevante en el campo de las CCM, ya que su mutación resultaba en la misma sobreactivación de la vía MEKK3-KLF2/4 que la que mostraban las células sin CCM, además, los ratones mutantes para *Cdc42* presentaban lesiones muy similares a los animales sin algún gen *Ccm*. En este caso, CDC42 colaboraba con las proteínas CCM en la regulación del citoesqueleto, migración y en la represión de la ruta de MEKK3.

Este hallazgo constató que, además de seguir analizando qué ocurre en la célula a nivel molecular al eliminar CCM1, CCM2 o CCM3, es también importante continuar explorando qué otras mutaciones y que otras rutas podrán originar y contribuir a la enfermedad.

En nuestro caso, la familia de las GCKIII quinasas presentaban una buena oportunidad para abordar la investigación de otras proteínas relacionadas con las CCM. Además de haber sido objetivo de estudio en nuestro grupo con anterioridad y contar con información sobre sus papeles en la biología celular y la fisiología de primera mano (Nogueira et al., 2008; Fidalgo et al., 2010; Iglesias et al., 2017; Zalvide et al., 2020), presentaban otras características que las hacían interesantes en este campo.

En primer lugar, funcionan como enzimas serina/treonina quinasas. Las enzimas quinasas tienen como principal función la transducción de señales, la modulación de estructuras de

muchas proteínas celulares y la regulación de procesos celulares complejos. Por ser quinasas, las GCKIII tienen bases para intervenir en la regulación de las vías que se alteran en las CCM.

Ya en 2005, Rual et al., descubrieron que CCM3 y las GCKIII interactúan en levaduras. Desde entonces, otros han reportado que la deficiencia en alguna de las GCKIII (Preisinger et al., 2004; Zheng et al., 2010; Fidalgo et al., 2010) provoca desregulaciones similares a las que se observaban cuando faltaba alguno de los genes CCM (como dispersión anormal del aparato de Golgi o un aumento de fibras de estrés) o que era necesario que exista una interacción entre CCM3 y las quinasas para que la célula mantenga su homeostasis tras estrés oxidativo (Fidalgo et al., 2010; Zalvide et al., 2013). Además, adicionalmente a la necesidad de colaborar para llevar a cabo sus funciones, otros trabajos (Fidalgo et al., 2010; Zhang et al., 2012) han apuntado al efecto estabilizador y activador que tendrían unas sobre otras en la vida media de sus formas proteicas.

La familia de las GCKIII quinasas ha sido relacionada múltiples veces con CCM3. Además de formar parte de un mismo complejo como el STRIPAK (Shi et al., 2016), ya había evidencias previas de que debían existir interacciones y regulaciones específicas de CCM3 sobre estas quinasas y viceversa. Es posible que exista una relación de acción conjunta o que se apoyen estructuralmente para funcionar.

Sin embargo, no han sido explorados a fondo cuáles de los efectos de los genes CCM sobre el desarrollo de las malformaciones cavernosas cerebrales dependen de su interacción con las quinasas. En experimentos en *D. rerio* se ha demostrado su relevancia en el desarrollo de un sistema vascular normal y la viabilidad embrionaria (Zheng et al., 2010; Yoruk et al., 2012), pero no se ha demostrado todavía en ningún modelo celular endotelial ni en un modelo *in vivo* una relación directa con la patología de las malformaciones cavernosas cerebrales.

6. EFECTOS DEL SILENCIAMIENTO DE STK24 SOBRE STK25 Y VICEVERSA

Utilizando un modelo endotelial celular y suprimiendo la expresión de STK24 y STK25 con siRNA, comprobamos que la ausencia de la expresión de STK24 repercute en la cantidad de proteína STK25. En concreto, se produce un aumento en la proteína de STK25; sin embargo, la eliminación de STK25 apenas modifica la cantidad de proteína de STK24. Este aumento de proteína de STK25 no se acompaña de un aumento en el nivel de mRNA, lo que nos sugiere que ocurre a nivel post transcripcional. Probablemente, este hecho se deba a un aumento de la vida media de STK25, aunque esto es algo que habría que comprobar de forma directa. Este comportamiento puede ser debido a un mecanismo de compensación genética, que en eucariotas ocurre a nivel los procesos transcripcionales y post transcripcionales. En nuestro caso, teniendo en cuenta los niveles de expresión de mRNA de las quinasas, esta regulación debiera ocurrir después de la síntesis proteica.

La compensación genética se basa en cambios en la expresión de RNA o cambios en los niveles de una proteína que puede compensar funcionalmente la pérdida de función de otro gen, generalmente de la misma red de interacción; se intentaría así suplir la función de la proteína eliminada para que la supervivencia de la célula o del individuo no se vea afectada (El-Brolosy y Stainier, 2017). Ya otros grupos de proteínas habían manifestado este fenómeno: se han reportado en la familia de las ciclinas (Ciemerych et al., 2002) o, en un caso similar al de STK24 y STK25, en la familia de las actinas (Tondeleir et al., 2012). En el caso de las actinas, los ratones mutantes para β -actina aumentaban los niveles de otras actinas, como la α -actina y la γ -actina, en un ejemplo de la compensación genética que sucede en familias de proteínas con estructuras y funciones similares.

7. EFECTO DEL SILENCIAMIENTO DE CCM3 SOBRE STK24 Y STK25 Y VICEVERSA

Al querer saber cómo se relacionaban CCM3 con las GCKIII quinasas y viceversa, comprobamos que, aunque sus expresiones a nivel de mRNA no variaban al eliminar alguna, ocurría algo distinto en el nivel proteico. Mientras que eliminar CCM3 hace reducir la cantidad de proteína de STK24 y STK25, eliminar STK24 también causaba una reducción en la proteína de CCM3. Esto último no ocurría al eliminar STK25; la proteína de CCM3 se mantenía en el mismo nivel sin la presencia de STK25.

En 2010, Fidalgo et al., ya habían llamado la atención sobre el papel estabilizador que CCM3 tenía sobre STK25 en células SaOS2, lo que concuerda con nuestros datos en células HuVEC. Sin embargo, también publicaban que los niveles de STK24 se mantenían estables a pesar de la falta de CCM3. Sin embargo, en nuestros cultivos de células endoteliales, se aprecia una reducción de la proteína STK24 al silenciar CCM3. Parece pues que el efecto estabilizador recíproco de CCM3 y proteínas GCKIII depende en parte del tipo celular en el que ocurra.

8. LAS CÉLULAS ENDOTELIALES SIN STK24 Y STK25 SOBREEXPRESAN *KLF2* Y *KLF4*

Examinando los niveles de expresión de *KLF2* y *KLF4*, constatamos que al eliminar simultáneamente *STK24* y *STK25* aparecían los niveles de mRNA elevados, como ocurre en las células sin CCM3. También las células sin *STK25* tenían un aumento de *KLF4*.

Esto nos indicaba que las células deficientes en ambas quinasas mostraban la misma característica que las que no expresaban algún gen *CCM*, al menos con respecto a la vía de MEKK3-KLF2/4. Es relevante que las células sin las quinasas también muestren estas sobreexpresiones porque la hiperactivación temprana de la ruta contribuye de forma decisiva a que las lesiones se agraven. Además, la mutación activadora de MEKK3 se ha encontrado en cavernomas espontáneos (Weng et al., 2021).

9. LA TUBULOGÉNESIS DEPENDE DE STK24

Los ensayos de tubulogénesis nos indicaban que para obtener túbulos finos, alargados y maduros era necesario que *STK24* se expresara. Cuando *STK24* era inhibido, los túbulos eran más anchos y largos que los formados por células control, lo cual se replicaba con las células a las que eliminábamos también *STK25*.

Para construir estos túbulos, las células endoteliales necesitan activar funciones como la migración, modificar el citoesqueleto o reestructurar las membranas, funciones en las que ya se ha descrito la implicación de *STK24*. Sin embargo, que los túbulos fuesen más gruesos era novedoso en la literatura. Según nuestros datos, las células sin *STK24* y sin ambas quinasas presentaban defectos en estas funciones necesarias para la formación de túbulos.

Además, en nuestro modelo, las células sin CCM3 también eran capaces de formar túbulos similares a las células control, lo cual no concordaba con los resultados de otros experimentos; en estos casos, las células sin CCM no conseguían formar ninguna estructura (Borikova et al., 2010), a pesar de que usaban una matriz extracelular semejante e inhibían la expresión de CCM mediante una tecnología parecida a la que usábamos, los shRNA.

10. LA DISPERSIÓN DEL APARATO DE GOLGI DEPENDE DE STK25

Otra de las características alteradas en células endoteliales al eliminar las quinasas es la mayor dispersión de aparato de Golgi. Esto no solo ocurre cuando se eliminan ambos genes,

sino también cuando solo se suprime STK25, repitiéndose los mismos resultados en las células sin CCM3.

Anteriormente, otros trabajos habían documentado esta dispersión regulada por STK25 (Preisinger et al., 2004) y por CCM3 (Fidalgo et al., 2010); en estas células, veían seriamente comprometida la migración celular. Nuestros datos también sugieren que estas células pueden tener este defecto, aunque serán necesarios otros procedimientos, como ensayos de *wound healing*, para confirmarlo en células sin STK24 y STK25. En este sentido, se había comentado anteriormente que defectos en la migración celular mediada por la orientación del Golgi podía llegar a contribuir en la patogenia de las CCM en células endoteliales deficientes en *Cdc42* (Laviña et al., 2018); esto refuerza la idea de que las células sin STK24 y STK25 imitan el fenotipo de las que no expresan genes CCM o CDC42.

11. LAS CÉLULAS ENDOTELIALES SIN STK24 Y STK25 PRESENTAN GRAN CANTIDAD DE FIBRAS DE ESTRÉS

Además de las alteraciones ya comentadas, las células HuVEC sin ambas quinasas mostraban un fenotipo igual a las que carecían de CCM3 con respecto a la presencia de fibras de estrés. Zheng et al., (2010) habían demostrado que inhibiendo la expresión de las quinasas por separado y conjuntamente, se elevaba el número de células que mostraban fibras de estrés, lo cual se repite en nuestros resultados. Por tanto, estas células verían desregulado el manejo de su citoesqueleto, probablemente a consecuencia de una sobreactivación de la ruta de RhoA-ROCK. Tanto STK24 como STK25 habían sido vinculadas directamente con la regulación de elementos del citoesqueleto (Tang et al., 2014; Mardakheh et al., 2016), por lo que era probable que su participación fuese esencial para un correcto funcionamiento.

12. LAS CÉLULAS ENDOTELIALES SIN STK24 Y STK25 TIENEN UNA DISTRIBUCIÓN Y PRESENCIA DEFECTIVAS DE VE-CADHERINA Y β -CATENINA

La distribución de la VE-Cadherina y la β -catenina en la membrana también se veía afectada en estas células. Mientras que la ausencia de VE-Cadherina se produce con mayor magnitud en las células sin ambas quinasas, para que la presencia de β -catenina se vea afectada, solo es necesario que falte una de las quinasas.

Ambos resultados coincidían con la literatura anterior (Boulday et al., 2011; Glading et al., 2007; Bravi et al., 2015) sobre células sin genes *CCM*: la falta de VE-Cadherina comprometería seriamente la estabilidad de las uniones adherentes de las células endoteliales, y por tanto, los vasos afectados manifestaban mayor permeabilidad. Además, que existiera menos β -catenina en la membrana podría deberse a que la β -catenina abandone la membrana hacia otro orgánulo. Debemos recordar que la β -catenina colabora en la estabilidad de las uniones adherentes al ser retenida por la propia VE-Cadherina, pero que también tiene la capacidad de migrar al núcleo y funcionar como un factor de transcripción y regular la expresión de genes relacionados con la migración y proliferación (Dejana, 2010). Por tanto, no solo el abandono de las uniones entre células se vería perjudicada, sino que la β -catenina podría estar activando rutas que contribuyeran a la enfermedad. Pudiera ser que STK24 y STK25 funcionaran como anclajes para ayudar a retener y mantener en la membrana sobre todo a la β -catenina, que parece más susceptible a desaparecer sin la presencia de las quinasas.

Curiosamente, una investigación de 2018 presentaba un caso parecido al nuestro. El grupo de Suryavanshi et al., (2018) también estudió el rol de dos proteínas, STRIP1 y STRIP2

(*Striatin-interacting protein 1/2*), conocidas también como FAM40A y FAM40B. Además de ser proteínas estructural y funcionalmente muy similares, fueron reconocidas como parte del complejo STRIPAK en el trabajo de Goudreault et al., (2009), lo cual ocurre también con *STK24* y *STK25*. Referente a sus funciones en la célula, quedó clara la relación de STRIP1/2 con el citoesqueleto, la morfología celular y la migración: al eliminar estas proteínas el área de células de mamífero se veía reducida y presentaban un aumento de fibras de actina (Bai et al., 2011). Otros trabajos posteriores, confirmaron la importancia de STRIP1 en la organización del citoesqueleto en la migración durante la embriogénesis (Bazzi et al., 2017) o el papel de STRIP2 en proliferación, invasión y migración de células cancerosas (Qiu et al., 2020). Pudieron confirmar que ambas proteínas interactuaban con CCM3 y que, al eliminar cualquiera de ellas, aumentaban las fibras de estrés en HuVEC, la densidad VE-Cadherina que estabilizaba las uniones entre células descendía y a estas células les costaba formar redes en experimentos de tubulogénesis. Observando este incremento en las fibras de estrés, quisieron comprobar si esto ocurría mediante la vía de RhoA-ROCK. Al añadir el inhibidor de la vía Y-27632 en ensayos de tubulogénesis de HuVEC carentes de STRIP1 y STRIP2 observaban una recuperación parcial de los túbulos. Suryavanshi et al. acaban concluyendo que eliminar estas dos proteínas imitaba en fenotipo de las que no tenían CCM3 y que debían estudiarse más en profundidad las interacciones de los componentes del complejo STRIPAK y su intervención en la patogenia de las CCM.

En nuestro caso, no parece que solo sea el citoesqueleto el que se ve afectado al eliminar dos proteínas que forman el STRIPAK, sino que funciones como el control de la dispersión del Golgi o la sobreexpresión de *KLF2* y *KLF4* también se ven alteradas. Esto sugiere que las consecuencias de que *STK24* y *STK25* se inhiban en célula endotelial perjudica a varias vías clave en la patogenia de las CCM a la vez.

También destacamos que en la mayoría de los estudios moleculares que hemos realizado, solo es necesaria la falta de *STK25* para que las células muestren las mismas características que las que no expresan genes CCM: sobreexpresión de *KFL4*, mayor dispersión del aparato de Golgi, mayor presencia de fibras de estrés y disminución de β -catenina en la membrana; mientras que inhibiendo únicamente *STK24* se altera la tubulogénesis y la presencia de β -catenina en la membrana. Estas diferencias podrían ser explicadas si *STK25* tiene un papel regulador más dominante; o, ya que sabemos por nuestros propios resultados que la proteína de *STK25* aumenta en ausencia de *STK24*, que en las células deficientes para *STK24* la proteína de *STK25* esté compensando la falta de su compañera, como hemos explicado anteriormente. Como esta compensación no parece recíproca, las células sin *STK25* mostrarían más alteraciones que las que carecen de *STK24*.

Al obtener estos indicios en el modelo celular, pasamos a estudiar la deficiencia de las quinasas en un modelo animal.

13. LOS RATONES *KNOCKOUT* PARA *Stk24* Y LOS QUE NO EXPRESAN *Stk25* EN CÉLULAS ENDOTELIALES NO PRESENTAN LESIONES VASCULARES

Centrando nuestras observaciones en el encéfalo, ni el modelo de ratón mutante para *Stk24* y ni el que no expresaba *Stk25* en células endoteliales mostraban ningún tipo de alteración vascular. Tampoco detectábamos ningún tipo de mortalidad que difiriera con los animales *wild type* o control; esto concordaba con resultados anteriores publicados.

En el caso de *Stk24*, nuestros ratones tenían una mutación constitutiva que no afectaba a la viabilidad embrionaria y que permitía que los ratones homocigotos nacieran en la proporción esperada. Tampoco en ninguno de los otros estudios en ratones sin *Stk24* observaban letalidad

o lesiones en el encéfalo (Tang et al., 2014; Iglesias et al., 2017), aunque en estos trabajos los animales tenían mutaciones *knockdown*, y no *knockout* como los usados en esta tesis.

Sin embargo, a los embriones de pez cebra a los que se les inhibía la expresión de *stk24* sí que veían comprometida su viabilidad (Zheng et al., 2010).

Para *Stk25*, ocurre la misma situación: la inactivación en embriones de pez cebra resulta en la muerte de los mutantes (Zheng et al., 2010), pero no si una inactivación aguda se producía en la etapa embrionaria de un modelo de ratón (Matsuki et al., 2013). Nuestros resultados replicaban los que Matsuki et al., (2013) obtenía al quitar *Stk25* en neuronas, aunque en nuestro caso, la mutación se reducía a células endoteliales.

14. LOS RATONES *Stk24*^{-/-} *Stk25*^{iEC/iEC} PRESENTAN CAVERNOMAS EN DIFERENTES LOCALIZACIONES Y RESULTA EN LETALIDAD

Tras cruzar nuestras líneas de estudio, observamos que los ratones *Stk24*^{-/-} *Stk25*^{iEC/iEC} no sobrevivían más de seis u ocho días tras la inducción neonatal de la Cre recombinasa; sin embargo, sus hermanos de camada con genotipos distintos y tratados con las mismas condiciones de inducción de la Cre recombinasa no presentaban problemas de supervivencia. Esto nos sugería que eliminar ambas quinasas al mismo tiempo en células endoteliales comprometía severamente la vida en nuestro modelo.

La necropsia de los animales descubría que los animales mutantes para ambas quinasas presentaban severas lesiones vasculares en el cerebelo que imitaban a las producidas por la falta de genes *Ccm*. Estas lesiones no solo se encontraban en el cerebelo, sino que estaban presentes también en el área hipocampal, la corteza cerebral y fuera del SNC, en el bazo. Debido a la severidad de las lesiones, concluimos que eran las causantes de la mortalidad de este genotipo.

Estos resultados sobre la supervivencia también se encontraban en distintos trabajos que inhibían algún gen *Ccm* en periodo neonatal: los animales sobrevivían aproximadamente en el mismo rango de tiempo que nuestro modelo (Boulday et al., 2011; Mleynek et al., 2014; Zhou et al., 2016), aunque, al tratarse de diferentes modelos, método de inducción y mutaciones, no son estrictamente comparables.

Sabiendo que la inducción postnatal ya afecta a la supervivencia, es probable que animales mutantes para ambas enzimas de forma constitutiva no consigan pasar del estado embrionario, como ocurre en modelos de pez cebra (Zheng et al., 2010).

Una explicación a la alta mortalidad es que la mutación de *Stk24* es constitutiva y afecta todos los tipos celulares, incluidas células que participan muy estrechamente con las células en la barrera hematoencefálica, como astrocitos, pericitos, microglía y neuronas. Es más, han sido publicados artículos en los que relatan las alteraciones moleculares que sufren estos tipos celulares sin genes *Ccm* (Louvi et al., 2014; Diéguez-Hurtado et al., 2019).

En el caso de Louvi et al. (2011), la deficiencia de *Ccm3* en astrocitos provocaba lesiones vasculares parecidas a las lesiones cavernosas típicas. En este caso, los datos sugerían que los genes *Ccm* jugaban un papel en las células vasculares y no vasculares dentro del SNC, señalando la importancia de la comunicación entre las células que componen la unidad neurovascular, y que podía explicar en parte la gravedad y restricción de las lesiones CCM al SNC.

La importancia de este enfoque se evidencia en el trabajo de Zhou et al. (2021). En este caso, probaron a eliminar CCM3 en dos modelos diferentes: uno en el que inducían la mutación de *Ccm3* en todas las células endoteliales del animal y otro en el que la mutación solo afectaba a las células endoteliales del encéfalo en concreto. En el primer caso, aparecían las lesiones en estructuras nerviosas y en bazo; la supervivencia de estos animales no superaba los 15 días de vida. Sin embargo, cuando se eliminaba *Ccm3* exclusivamente en las células endoteliales del

encéfalo, no aparecían las lesiones en el bazo y la esperanza de vida de los animales aumentaba hasta los dos a seis meses. Por tanto, los autores concluyeron que la alta mortalidad perinatal que suelen presentar los animales deficientes en genes *Ccm* no podía ser solo atribuida al daño ocasionado por el desarrollo de cavernomas, sino a daño sistémico.

Por tanto, es posible que, limitando la deficiencia de ambas quinasas a las células endoteliales del encéfalo, se logre aumentar la supervivencia de los animales y la severidad de las lesiones en nuestro modelo. Además, parece que la deficiencia debe restringirse particularmente a células endoteliales o, quizás a células que colaboran con ellas en la unidad neurovascular, ya que eliminar *Stk24* y *Stk25* en las células tubulares del riñón no afectaban a la vasculatura ni causaban lesiones vasculares (Wang et al., 2021).

También la de Zhou et al. (2021) fue la primera publicación que detallaba la aparición de lesiones vasculares en el bazo, lo cual ocurre también en nuestro propio modelo. Suponemos que, al corresponder a un órgano tan vascularizado, es especialmente sensible a las deficiencias endoteliales que tienen los animales *Stk24^{-/-} Stk25^{iEC/iEC}*.

15. LAS CÉLULAS ENDOTELIALES DE RATONES *Stk24^{-/-} Stk25^{iEC/iEC}* TIENEN ALTERADA LA EXPRESIÓN DE *Klf2* Y *Klf4*

El análisis de las células endoteliales del cerebro de ratones *Stk24^{-/-} Stk25^{iEC/iEC}* reveló que sobreexpresaban los factores de transcripción *Klf2* y *Klf4*, y que la expresión del gen que codifica la VE-Cadherina, el *Cdh5*, veía reducida su expresión.

Nuestros resultados replicaban todavía más el fenotipo de las células sin *Ccm*, esta vez en células extraídas directamente de animales y no de células en cultivo. Que existiera este aumento en los *Klf* nos confirmaba que la vía MEKK3-KLF2/4 en modelos vivos también estaba sobreactivada, al igual que mostraban otras publicaciones para genes diferentes (Zhou et al., 2016; Laviña et al., 2018).

Curiosamente, también descubrimos que la expresión del gen *Cdh5* estaba disminuida en las células endoteliales del cerebro de los mutantes para ambas quinasas, y esto podía tener relación con resultados obtenidos en nuestro modelo endotelial en cultivo celular. El gen *Cdh5* codifica a la molécula de adhesión VE-Cadherina, que en ausencia tanto de las quinasas como de *Ccm3*, veía reducida su presencia en la membrana de las HuVEC. Por tanto, estos resultados nos sugieren que las células endoteliales de las lesiones también presenten poca VE-Cadherina, ya no solo presente en la membrana, sino que su expresión esté siendo reducida. La pérdida de expresión de un típico marcador endotelial es representativa de un fenómeno denominado transición endotelio-mesénquima (Bravi et al., 2016). Las células endoteliales sin *Ccm* experimentan un cambio de identidad celular, de célula con características endoteliales a características mesenquimales. Este proceso conlleva la pérdida de expresión de típicos marcadores endoteliales, como *Cdh5*, y la aparición de nuevos genes expresados, como *Klf4*; ambos cambios se dan en nuestro modelo. Serían necesarios experimentos de localización celular que ayuden a conocer el comportamiento de la VE-Cadherina en estas células y observar si también se reduce la presencia en la membrana.

Al pensar en qué mecanismos moleculares podrían explicar por qué STK24 y STK25 inhiben la aparición de cavernomas, existen diferentes posibilidades.

Una de ellas tiene que ver con la participación de las GCKIII quinasas en el complejo STRIPAK. Tanto CCM3 como STK24 y STK25 residen mayoritariamente en conjunto en este complejo, desde el cual regulan y cumplen sus funciones celulares. Probablemente, la estabilidad del complejo dependa de que los componentes estén presentes. Esta posibilidad se apoya en el conocimiento de que eliminando otras dos proteínas que constituyen el STRIPAK,

STRIP1 y STRIP2, se consigue alterar la vía de RhoA-ROCK, lo cual imita a las células sin proteínas CCM. Por tanto, la falta de las quinasas de estudio perjudicaría la homeostasis y regulación de diferentes rutas mediante STRIPAK, entre las que pueden estar presentes las que se ven alteradas en las células sin CCM. De esta forma, la falta de STK24 y STK25 emularía a lo que ocurre al eliminar STRIP1 y STRIP2.

Otra explicación se refiere a las propias capacidades reguladoras que tienen ambas quinasas. Entre ellas se engloban muchas funciones y ubicaciones de vías ya descritas como contributivas a la formación de cavernomas: organización del citoesqueleto y de las uniones adherentes, manejo de la membrana celular, migración... Nuestros datos ya señalan que por separado provocan alteraciones en la célula, por lo que probablemente tengan una función moduladora en la homeostasis celular que se rompe al eliminarlas y que influya en la patogenia. En particular, cabe recordar que ambas tienen la capacidad enzimática de fosforilación, una de las más relevantes y cruciales en la regulación de cascadas de señalización celular. Con ella podría estar inhibiendo activamente vías como la MEKK3-KLF2/4, por ejemplo.

Además, la estrecha relación entre CCM3 y las quinasas STK24 y STK25 debe tener una especial trascendencia. Hemos visto que la cantidad de proteína depende unas de otras. Existe por tanto, la opción de que sin STK24 ni STK25, desaparezca CCM3 y se imiten las alteraciones que ocurre en una célula sin CCM3. De igual modo, eliminar CCM3 afecta la cantidad de proteína presente de las quinasas. Puede pasar que alguna de las alteraciones celulares adjudicadas directamente a la actividad de CCM3, en realidad ocurre por la desaparición de las quinasas a consecuencia de eliminar CCM3. Para investigar cual es la jerarquía de acción de CCM3 y las quinasas, sería interesante realizar experimentos de rescate.

En resumen y reuniendo los resultados de este capítulo, demostramos que la deficiencia combinada de STK24 y STK25 en células endoteliales en modelos *in vitro* e *in vivo* origina malformaciones cavernosas cerebrales en modelo animal y que se copia el fenotipo de las células que no expresan CCM1, CCM2, CCM3, y CDC42 (Figura 49). Presentamos a STK24 y STK25 como nuevos genes a considerar para la patogenia de las CCM y un modelo *in vivo* e *in vitro* para seguir estudiando nuevas interacciones y posibilidades de encontrar dianas farmacológicas para tratar las lesiones.

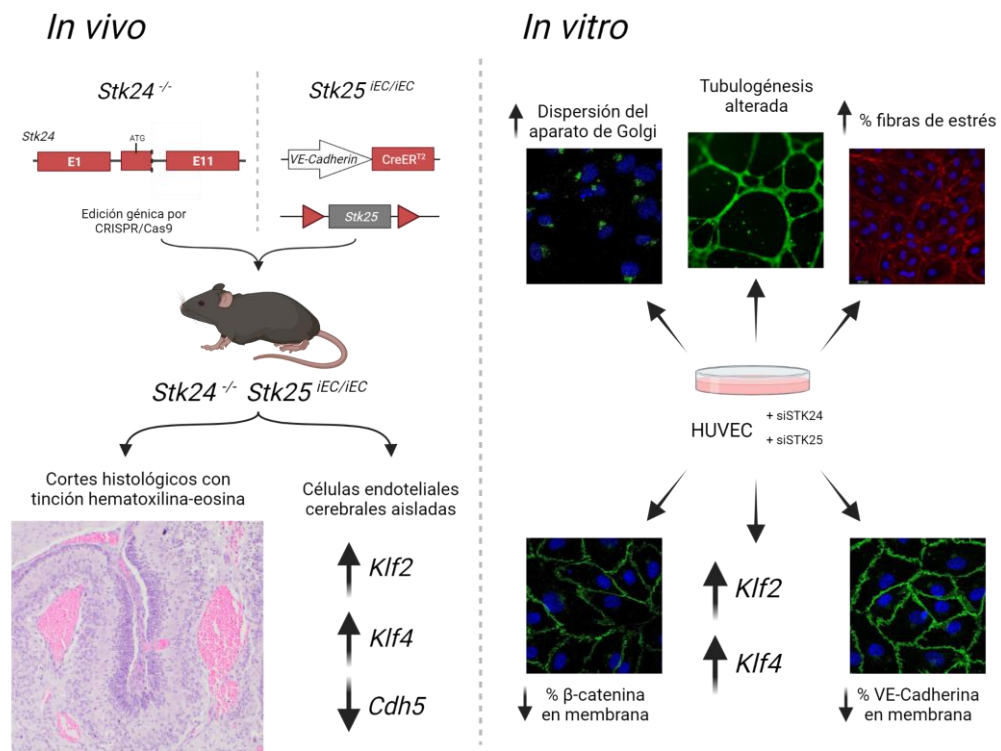


Figura 49. Resumen de los resultados obtenidos en experimentos *in vivo* e *in vitro* eliminando la expresión de *STK24* y *STK25* simultáneamente. Los resultados en el modelo animal concluyen con la aparición de lesiones vasculares en el cerebro y el bazo semejantes a las que aparecen en ratones sin algún gen *Ccm*. Además, las células endoteliales afectadas en estos animales sobreexpresan *Klf2* y *Klf4*, al mismo tiempo que ven reducida la expresión de *Cdh5*. En experimentos *in vitro*, las células HUVEC que no expresan a *STK24* y *STK25* presentan alta dispersión del aparato de Golgi, una tubulogénesis alterada, mayor porcentaje de fibras de estrés, menor presencia de VE-Cadherina y β-catenina en la membrana y sobreexpresión de *KLF2* y *KLF4*, imitando el fenotipo de las células sin algún gen *CCM*. Ilustración propia creada con BioRender.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

Esta tesis muestra que la falta de STK24 y STK25 provoca el desarrollo de malformaciones cavernosas cerebrales y que la inhibición de EGFR por Lapatinib ofrece la posibilidad de tratar las CCM de forma farmacológica.

En concreto:

1. El silenciamiento de CCM3 aumenta la expresión de EGFR en dos modelos de células endoteliales, HuVEC y hCMEC/D3
2. El silenciamiento de CCM3 no afecta a la capacidad de internalizar al EGFR, en células A549 y hCMEC/D3, tras su unión al ligando.
3. La inhibición farmacológica de la actividad quinasa del EGFR no reduce los niveles altos de expresión de *KLF2* y *KLF4* ni restaura la escasa presencia y la distribución de VE-Cadherina de células hCMEC/D3 sin CCM3.
4. El Lapatinib disminuye la viabilidad celular y aumenta la apoptosis de las células endoteliales con CCM3 silenciado.
5. Las células endoteliales con STK24 y STK25 silenciados reproducen el fenotipo de las células que carecen de algún gen CCM.
6. Los ratones *Stk24*^{-/-} *Stk25*^{iEC/iEC}, pero no los deficientes en uno solo de los genes, desarrollan lesiones vasculares en el cerebro, la corteza cerebral, el hipocampo y el bazo, lo que aumenta su mortalidad.
7. Las células endoteliales del cerebro de los ratones *Stk24*^{-/-} *Stk25*^{iEC/iEC} tienen aumentada la expresión de *Klf2* y *Klf4*, y reducida la expresión de *Cdh5*.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

Abdelilah-Seyfried S, Tournier-Lasserre E, Derry WB. Blocking signalopathic events to treat cerebral cavernous malformations. *Trends Mol Med*. 2020; 26: 874-887.

Akers A, Al-Shahi Salman R, Awad IA., Dahlem K, Flemming K, Hart B, Kim H, Jusue-Torres I, Kondziolka D, Lee C, Morrison L, Rigamonti D, Rebeiz T, Tournier-Lasserre E, Waggoner D, Whitehead K. Synopsis of guidelines for the clinical management of cerebral cavernous malformations, consensus recommendations based on systematic literature review by the angioma alliance scientific advisory board clinical experts panel. *Neurosurgery*. 2017; 80: 665-680.

Amin DN, Hida K, Bielenberg DR, Klagsbrun M. Tumor endothelial cells express epidermal growth factor receptor (EGFR) but not ErbB3 and are responsive to EGF and to EGFR kinase inhibitors. *Cancer Research*. 2006; 66: 2173-2180.

Avraham R, Yarden Y. Feedback regulation of EGFR signalling: decision making by early and delayed loops. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2011; 12:104-117.

Bai SW, Herrera-Abreu M, Rohn JL, Racine V, Tajadura V, Suryavanshi N, Bechtel S, Wiemann S, Baum B, Ridley AJ. Identification and characterization of a set of conserved and new regulators of cytoskeletal organization, cell morphology and migration. *BMC Biology*. 2011; 9: 54.

Bakker J, Spits M, Neefjes J, Berlin I. The EGFR odyssey - from activation to destruction in space and time. *J Cell Sci*. 2017; 130: 4087-4096.

Barrow DL, Schuette AJ. Cavernous malformations, a paradigm for progress. *Neurosurgery*. 2011; 58: 27-41.

Bazzi H, Soroka E, Alcorn HL, Anderson KV. STRIP1, a core component of STRIPAK complexes, is essential for normal mesoderm migration in the mouse embryo. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2017; 114: E10928-E10936.

Béraud-Dufour S, Gautier R, Albiges-Rizo C, Chardin P, Faurobert E. Krit1 interactions with microtubules and membranes are regulated by Rap1 and integrin cytoplasmic domain associated protein-1. *The FEBS journal*. 2007, 274, 5518-5532.

Borikova AL, Dibble CF, Sciaky N, Welch CM, Abell AN, Bencharit S, Johnson GL. Rho kinase inhibition rescues the endothelial cell cerebral cavernous malformation phenotype. *J Biol Chem*. 2010; 285: 11760-11764.

Boulday G, Blécon A, Petit N, Chareyre F, Garcia LA, Niwa-Kawakita M, Giovannini M, Tournier-Lasserre E. Tissue-specific conditional CCM2 knockout mice establish the essential role of endothelial CCM2 in angiogenesis, implications for human cerebral cavernous malformations. *Dis Model Mech.* 2009; 2: 168-177.

Boulday G, Rudini N, Maddaluno L, Blécon A, Arnould M, Gaudric A, Chapon F, Adams RH, Dejana E, Tournier-Lasserre E. Developmental timing of CCM2 loss influences cerebral cavernous malformations in mice. *J Exp Med.* 2011; 208: 1835-1847.

Bradáč O., Skalický P., Beneš V. Surgery of Brainstem and Cerebellar Cavernous Malformations. In: Bradáč O., Beneš V. (eds) *Cavernomas of the CNS*. Springer, Cham. 2020; 143-163.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976; 72: 248-254.

Bravi L, Malinverno M, Pisati F, Rudini N, Cuttano R, Pallini R, Martini M, Larocca LM, Locatelli M, Levi V, Bertani GA, Dejana E, Lampugnani MG. Endothelial cells lining sporadic cerebral cavernous malformation cavernomas undergo endothelial-to-mesenchymal transition. *Stroke.* 2016; 47: 886-890.

Bravi L, Rudini N, Cuttano R, Giampietro C, Maddaluno L, Ferrarini L, Adams RH, Corada M, Boulday G, Tournier-Lasserre E, Dejana E, Lampugnani MG. Sulindac metabolites decrease cerebrovascular malformations in CCM3-knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015, 112, 8421-8426.

Bremer L, Carson NB. A case of brain tumor (angioma cavernosum), causing spastic paralysis and attacks of tonic spasms. Report of operation. *The American Journal of the Medical Sciences (1827-1924).* 1890; 100: 219.

Burriss HA, Hurwitz HI, Dees EC, Dowlati A, Blackwell KL, O'Neil B, Marcom PK, Ellis MJ, Overmoyer B, Jones SF, Harris JL, Smith DA, Koch KM, Stead A, Mangum S, Spector NL. Phase I safety, pharmacokinetics, and clinical activity study of lapatinib (GW572016), a reversible dual inhibitor of epidermal growth factor receptor tyrosine kinases, in heavily pretreated patients with metastatic carcinomas. *J Clin Oncol.* 2005; 23: 5305-5313.

Calandriello L, Grimaldi G, Petrone G, Rigante M, Petroni S, Riso M, Savino G. Cavernous venous malformation (cavernous hemangioma) of the orbit, Current concepts and a review of the literature. *Surv Ophthalmol.* 2017; 62: 393-403.

Caputo M, Kurhe Y, Kumari S, Cansby E, Amrutkar M, Scandalis E, Booten SL, Ståhlman M, Borén J, Marschall HU, Aghajan M, Mahlapuu M. Silencing of STE20-type kinase MST3 in mice with antisense oligonucleotide treatment ameliorates diet-induced nonalcoholic fatty liver disease. *FASEB J.* 2021; 35: e21567.

Castro M, Laviña B, Ando K, Álvarez-Aznar A, Abu Taha A, Brakebusch C, Dejana E, Betsholtz C, Gaengel K. CDC42 Deletion Elicits Cerebral Vascular Malformations via Increase MEKK3-Dependent KLF4 Expression. *Circulation research.* 2019; 124: 1240-1252.

Ceccarelli DF, Laister RC, Mulligan VK, Kean MJ, Goudreault M, Scott IC, Derry WB, Chakrabarty A, Gingras AC, Sicheri F. CCM3/PDCD10 heterodimerizes with germinal center kinase III (GCKIII) proteins using a mechanism analogous to CCM3 homodimerization. *J Biol Chem.* 2011; 286: 25056-25064.

Chan AC, Drakos SG, Ruiz OE, Smith ACH, Gibson CC, Ling J, Passi SF, Stratman AN, Sacharidou A, Revelo MP, Grossmann AH, Diakos NA, Davis GE, Metzstein MM, Whitehead KJ, Li DY. Mutations in 2 distinct genetic pathways result in cerebral cavernous malformations in mice. *J Clin Invest.* 2011; 121: 1871-1881.

Chen Z, Htay A, Dos Santos W, Gillies GT, Fillmore HL, Sholley MM, Broaddus WC. In vitro angiogenesis by human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) induced by three-dimensional co-culture with glioblastoma cells. *J Neurooncol.* 2009; 92: 121-128.

Chiplunkar AR, Curtis BC, Eades GL, Kane MS, Fox SJ, Haar JL, Lloyd JA. The Krüppel-like factor 2 and Krüppel-like factor 4 genes interact to maintain endothelial integrity in mouse embryonic vasculogenesis. *BMC Developmental Biology.* 2013; 13: 40.

Choi J, Yu JS, Cho ES, Kim JH, Chung JJ. Hepatic cavernous hemangiomas, long-term (> 5 years) follow-up changes on contrast-enhanced dynamic computed tomography or magnetic resonance imaging and determinant factors of the size change. *Radiol Med.* 2018; 123: 323-330.

Choi JP, Wang R, Yang X, Wang X, Wang L, Ting KK, Foley M, Cogger V, Yang Z, Liu F, Han Z, Liu R, Baell J, Zheng X. Ponatinib (AP24534) inhibits MEKK3-KLF signaling and prevents formation and progression of cerebral cavernous malformations. *Sci Adv.* 2018; 4: eaau0731.

Choquet H, Pawlikowska L, Lawton MT, Kim H. Genetics of cerebral cavernous malformations, current status and future prospects. *J Neurosurg Sci.* 2015; 59: 211-220.

Ciemerych MA, Kenney AM, Sicinska E, Kalaszczynska I, Bronson RT, Rowitch DH, Gardner H, Sicinski P. Development of mice expressing a single D-type cyclin. *Genes & development.* 2002; 16: 3277-3289.

Clatterbuck RE, Eberhart CG, Crain BJ, Rigamonti D. Ultrastructural and immunocytochemical evidence that an incompetent blood-brain barrier is related to the pathophysiology of cavernous malformations. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2001; 71: 188-192.

Clevers H, Nusse R. Wnt/ β -catenin signaling and disease. *Cell.* 2012; 149: 1192-1205.

Colás-Algora N, García-Weber D, Cacho-Navas C, Barroso S, Caballero A, Ribas C, Correas I, Millán J. Compensatory increase of VE-cadherin expression through ETS1 regulates endothelial barrier function in response to TNF α . *Cell Mol Life Sci.* 2020; 77: 2125-2140.

Craig HD, Günel M, Cepeda O, Johnson EW, Ptacek L, Steinberg GK, Ogilvy CS, Berg MJ, Crawford SC, Scott RM, Steichen-Gersdorf E, Sabroe R, Kennedy CTC, Mettler G, Beis MJ, Fryer A, Awad IA, Lifton RP. Multilocus linkage identifies two new loci for a mendelian form of stroke, cerebral cavernous malformation, at 7p15–13 and 3q25.2–27. *Hum Mol Genet.* 1998; 7: 1851-1858.

Cuttano R, Rudini N, Bravi L, Corada M, Giampietro C, Papa E, Morini MF, Maddaluno L, Baeyens N, Adams RH, Jain MK, Owens GK, Schwartz M, Lampugnani MG, Dejana E. KLF4 is a key determinant in the development and progression of cerebral cavernous malformations. *EMBO Mol Med.* 2016; 8: 6-24.

Czupalla CJ, Yousef H, Wyss-Coray T, Butcher EC. Collagenase-based single cell isolation of primary murine brain endothelial cells using flow cytometry. *Bio Protoc.* 2018; 8: e3092.

Dalyai RT, Ghobrial G, Awad I, Tjoumakaris S, Gonzalez LF, Dumont AS, Chalouhi N, Randazzo C, Rosenwasser R, Jabbour P. Management of incidental cavernous malformations, a review. *Neurosurg Focus.* 2011; 31: E5.

Dejana E. The role of wnt signaling in physiological and pathological angiogenesis. *Circulation research.* 2010; 107: 943-952.

Dekker RJ, Boon RA, Rondaij MG, Kragt A, Volger OL, Elderkamp YW, Meijers JCM, Voorberg J, Pannekoek H, Horrevoets AJG. KLF2 provokes a gene expression pattern that establishes functional quiescent differentiation of the endothelium. *Blood.* 2006; 107: 4354-4363.

Denier C, Labauge P, Bergametti F, Marchelli F, Riant F, Arnoult M, Maciazek J, Vicaut E, Brunereau L, Tournier-Lasserre E. Genotype–phenotype correlations in cerebral cavernous malformations patients. *Ann Neurol.* 2006; 60: 550-556.

Diaz R, Nguewa PA, Parrondo R, Perez-Stable C, Manrique I, Redrado M, Catena R, Collantes M, Peñuelas I, Díaz-González JA, Calvo A. Antitumor and antiangiogenic effect of the dual EGFR and HER-2 tyrosine kinase inhibitor lapatinib in a lung cancer model. *BMC Cancer.* 2010; 10: 188-197.

Diéguez-Hurtado R, Kato K, Giaimo BD, Nieminen-Kelhä M, Arf H, Ferrante F, Bartkuhn M, Zimmermann T, Bixel MG, Eilken HM, Adams S, Borggreffe T, Vajkoczy P, Adams RH. Loss of the transcription factor RBPJ induces disease-promoting properties in brain pericytes. *Nature Communications.* 2019; 10: 2817-2835.

DiStefano PV, Glading AJ. VEGF signalling enhances lesion burden in KRIT1 deficient mice. *J Cell Mol Med.* 2020; 24: 632-639.

Draheim KM, Li X, Zhang R, Fisher OS, Villari G, Boggon TJ, Calderwood DA. CCM2–CCM3 interaction stabilizes their protein expression and permits endothelial network formation. *The Journal of cell biology.* 2015; 208: 987-1001.

El Marjou F, Jouhanneau C, Krndija D. Targeted Transgenic Mice Using CRISPR /Cas9 Technology. *Methods Mol Biol.* 2021; 2214: 125-141.

El-Brolosy MA, Stainier DYR. Genetic compensation, a phenomenon in search of mechanisms. *PLoS Genetics*. 2017; 13: e1006780.

Fidalgo M, Fraile M, Pires A, Force T, Pombo C, Zalvide J. CCM3/PDCD10 stabilizes GCKIII proteins to promote Golgi assembly and cell orientation. *J Cell Sci*. 2010; 123: 1274-1284.

Fidalgo M, Guerrero A, Fraile M, Iglesias C, Pombo CM, Zalvide J. Adaptor protein cerebral cavernous malformation 3 (CCM3) mediates phosphorylation of the cytoskeletal proteins Ezrin/Radixin/Moesin by Mammalian Ste20-4 to protect cells from oxidative stress. *J Biol Chem*. 2012; 287: 11556-11565.

Fisher OS, Deng H, Liu D, Zhang Y, Wei R, Deng Y, Zhang F, Louvi A, Turk BE, Boggon TJ, Su B. Structure and vascular function of MEKK3–cerebral cavernous malformations 2 complex. *Nature Communications*. 2015; 6: 7937.

Florida, E. Malformaciones cavernosas cerebrales: estudio del gen de susceptibilidad CCM3. 2016. Tesis Doctoral. Universidad de Santiago de Compostela. Facultad de Medicina de la Universidad de Santiago de Compostela.

Glading A, Han J, Stockton RA, Ginsberg MH. KRIT-1/CCM1 is a Rap1 effector that regulates endothelial cell–cell junctions. *J Cell Biol*. 2007; 179: 247-254.

Glading AJ, Ginsberg MH. Rap1 and its effector KRIT1/CCM1 regulate beta-catenin signaling. *Disease models & mechanisms*. 2010; 3: 73-83.

Goitre L, DiStefano PV, Moglia A, Nobiletti N, Baldini E, Trabalzini L, Keubel J, Trapani E, Shuvaev VV, Muzykantov VR, Sarelius IH, Retta SF, Glading AJ. Up-regulation of NADPH oxidase-mediated redox signaling contributes to the loss of barrier function in KRIT1 deficient endothelium. *Scientific Reports*. 2017; 7: 8296-8307.

Goudreault M, D'Ambrosio LM, Kean MJ, Mullin MJ, Larsen BG, Sanchez A, Chaudhry S, Chen GI, Sicheri F, Nesvizhskii AI, Aebersold R, Raught B, Gingras A. A PP2A phosphatase high density interaction network identifies a novel striatin-interacting phosphatase and kinase complex linked to the cerebral cavernous malformation 3 (CCM3) protein. *Molecular & cellular proteomics*. 2009; 8: 157-171.

Graham FL, Smiley J, Russell WC, Nairn R. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol*. 1977; 36: 59-74.

Guerrero A, Iglesias C, Raguz S, Florida E, Gil J, Pombo CM, Zalvide J. The cerebral cavernous malformation 3 gene is necessary for senescence induction. *Aging Cell*. 2015; 14: 274-283.

Gunel M, Laurans MSH, Shin D, DiLuna ML, Voorhees J, Choate K, Nelson-Williams C, Lifton RP. KRIT1, a gene mutated in cerebral cavernous malformation, encodes a microtubule-associated protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences - PNAS*. 2002; 99: 10677-10682.

Haasdijk R, Cheng C, Maat-Kievit A, Duckers H. Cerebral cavernous malformations, from molecular pathogenesis to genetic counselling and clinical management. *European Journal of Human Genetics, EJHG*. 2012; 20: 134-140.

He Y, Zhang H, Yu L, Gunel M, Boggon TJ, Chen H, Min W. Stabilization of VEGFR2 signaling by cerebral cavernous malformation 3 is critical for vascular development. *Science Signaling*. 2010; 3: ra26.

Herbst RS, Langer CJ. Epidermal growth factor receptors as a target for cancer treatment, The emerging role of IMC-C225 in the treatment of lung and head and neck cancers. *Seminars in oncology*. 2002; 29: 27-36.

Horne MA, Flemming KD, Su IC, Stapf C, Jeon JP, Li D, Maxwell SS, White P, Christianson TJ, Agid R, Cho WS, Oh CW, Wu Z, Zhang JT, Kim JE, Ter Brugge K, Willinsky R, Brown RD, Murray GD, Al-Shahi Salman R. Cerebral Cavernous Malformations individual patient data meta-analysis collaborators. Clinical course of untreated cerebral cavernous malformations, a meta-analysis of individual patient data. *Lancet Neurol*. 2016; 15: 166-173.

Huang CF, Wu Y, Hsu C, Lee W, Lai M, Lu T, Huang C, Leu T, Shih H, Fang H, Robinson DR, Kung H, Yuan C. Caspase activation of mammalian sterile 20-like kinase 3 (Mst3). Nuclear translocation and induction of apoptosis. *The Journal of biological chemistry*. 2002; 277: 34367-34374.

Hubbard SR, Till JH. Protein tyrosine kinase structure and function. *Annual review of biochemistry*. 2000; 69: 373-398.

Iglesias C, Florida E, Sartages M, Porteiro B, Fraile M, Guerrero A, Santos D, Cunarro J, Tovar S, Nogueiras R, Pombo CM, Zalvide J. The MST3/STK24 kinase mediates impaired fasting blood glucose after a high-fat diet. *Diabetologia*. 2017; 60: 2453-2462.

Jaffe EA, Nachman RL, Becker CG, Minick CR. Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria. *J Clin Invest*. 1973; 52: 2745-2756.

Uhlik MT, Abell AN, Johnson NL, Sun W, Cuevas BD, Lobel-Rice KE, Horne EA, Dell'Acqua ML, Johnson GL. Rac-MEKK3-MKK3 scaffolding for p38 MAPK activation during hyperosmotic shock. *Nature cell biology*. 2003; 5: 1104-1110.

Kim K, Duramad O, Qin X, Su B. MEKK3 is essential for lipopolysaccharide-induced interleukin-6 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor production in macrophages. *Immunology*. 2007; 120: 242-250.

Kivelev, J., Niemelä M.. Natural History of Cavernous Malformations. In: Bradáč O., Beneš V. (eds) *Cavernomas of the CNS*. Springer, Cham. 2020; 69-91.

Komaravolu RK, Adam C, Moonen JR, Harmsen MC, Goebeler M, Schmidt M. Erk5 inhibits endothelial migration via KLF2-dependent down-regulation of PAK1. *Cardiovasc Res*. 2015; 105: 86-95.

Kyriakis JM, Avruch J. Protein kinase cascades activated by stress and inflammatory cytokines. *BioEssays*. 1996; 18: 567-577.

Labauge P, Brunereau L, Lévy C, Laberge S, Houtteville JP. The natural history of familial cerebral cavernomas, a retrospective MRI study of 40 patients. *Neuroradiology*. 2000; 42: 327-332.

Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970; 227: 680-685.

Lampugnani MG, Orsenigo F, Gagliani MC, Tacchetti C, Dejana E. Vascular endothelial cadherin controls VEGFR-2 internalization and signaling from intracellular compartments. *The Journal of cell biology*. 2006; 174: 593-604.

Lant B, Yu B, Goudreault M, Holmyard D, Knight JD, Xu P, Zhao L, Chin K, Wallace E, Zhen M, Gingras AC, Derry WB. CCM-3/STRIPAK promotes seamless tube extension through endocytic recycling. *Nature Communications*. 2015; 6: 6449.

Laviña B, Castro M, Niaudet C, Cruys B, Álvarez-Aznar A, Carmeliet P, Bentley K, Brakebusch C, Betsholtz C, Gaengel K. Defective endothelial cell migration in the absence of Cdc42 leads to capillary-venous malformations. *Development*. 2018; 145: dev161182.

Leaute-Labreze C, Dumas de la Roque, E, Hubiche T, Boralevi F, Thambo JB. Propranolol for severe hemangiomas of infancy. *N Engl J Med*. 2008; 358: 2649-2651.

Leberer E, Dignard D, Harcus D, Thomas DY, Whiteway M. The protein kinase homologue Ste20p is required to link the yeast pheromone response G-protein $\beta\gamma$ subunits to downstream signalling components. *The EMBO journal*. 1992; 11: 4815-4824.

Lee J, Jian, Chen C, Chen Y, Huang M, Huang J, Hung J, Chen M, Huang M. COSMC is overexpressed in proliferating infantile hemangioma and enhances endothelial cell growth via VEGFR2. *PloS one*. 2013; 8: e56211.

Li J, Zhao Y, Coleman P, Chen J, Ting KK, Choi JP, Zheng X, Vadas MA, Gamble JR. Low fluid shear stress conditions contribute to activation of cerebral cavernous malformation signalling pathways. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*. 2019; 1865: 165519.

Li P, Guo Z, Gao Y, Pan W. Propranolol represses infantile hemangioma cell growth through the beta2-adrenergic receptor in a HIF-1alpha-dependent manner. *Oncol Rep*. 2015; 33: 3099-3107.

Li X, Zhang R, Zhang H, He Y, Ji W, Min W, Boggon TJ. Crystal structure of CCM3, a cerebral cavernous malformation protein critical for vascular integrity. *J Biol Chem*. 2010; 285: 24099-24107.

Lin CY, Wu HY, Wang PL, Yuan CJ. Mammalian Ste20-like protein kinase 3 induces a caspase-independent apoptotic pathway. *Int J Biochem Cell Biol*. 2010; 42: 98-105.

Lin NU, Guo H, Yap JT, Mayer IA, Falkson CI, Hobday TJ, Dees EC, Richardson AL, Nanda R, Rimawi MF, Ryabin N, Najita JS, Barry WT, Arteaga CL, Wolff AC, Krop IE, Winer EP, Van den Abbeele A. D. Phase II study of Lapatinib in combination with Trastuzumab in patients with human epidermal growth factor receptor 2-positive metastatic breast cancer, clinical outcomes and predictive value of early [18F]Fluorodeoxyglucose positron emission tomography imaging (TBCRC 003). *J Clin Oncol*. 2015; 33: 2623-2631.

Lisowska J, Rödel C, Manet S, Miroshnikova Y, Boyault C, Planus E, De Mets R, Lee H, Destaing O, Mertani H, Boulday G, Tournier-Lasserre E, Balland M, Abdelilah-Seyfried S, Albiges-Rizo C, Faurobert E. The CCM1–CCM2 complex controls complementary functions of ROCK1 and ROCK2 that are required for endothelial integrity. *Journal of cell science*. 2018; 131: jcs216093.

Lopez-Ramirez MA, Fonseca G, Zeineddine HA, Girard R, Moore T, Pham A, Cao Y, Shenkar R, de Kreuk BJ, Lagarrigue F, Lawler J, Glass CK, Awad IA, Ginsberg MH. Thrombospondin1 (TSP1) replacement prevents cerebral cavernous malformations. *J Exp Med*. 2017; 214: 3331-3346.

Louvi A, Chen L, Two AM, Zhang H, Min W, Günel M. Loss of cerebral cavernous malformation 3 (Ccm3) in neuroglia leads to CCM and vascular pathology. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011; 108: 3737-3742.

Louvi A, Nishimura S, Günel M. Ccm3, a gene associated with cerebral cavernous malformations, is required for neuronal migration. *Development*. 2014; 141: 1404-1415.

Macek Jilkova Z, Lisowska J, Manet S, Verdier C, Deplano V, Geindreau C, Faurobert E, Albiges-Rizo C, Duperray A. CCM proteins control endothelial beta1 integrin dependent response to shear stress. *Biol Open*. 2014; 3: 1228-3512.

Maddaluno L, Rudini N, Cuttano R, Bravi L, Giampietro C, Corada M, Ferrarini L, Orsenigo F, Papa E, Boulday G, Tournier-Lasserre E, Chapon F, Richichi C, Retta SF, Lampugnani MG, Dejana E. EndMT contributes to the onset and progression of cerebral cavernous malformations. *Nature*. 2013; 498: 492-496.

Madeira F, Park YM, Lee J, Buso N, Gur T, Madhusoodanan N, Basutkar P, Tivey ARN, Potter SC, Finn RD, Lopez R. The EMBL-EBI search and sequence analysis tools APIs in 2019. *Nucleic Acids Res*. 2019; 47: W636-41.

Madu CO, Wang S, Madu CO, Lu Y. Angiogenesis in breast cancer progression, diagnosis, and treatment. *J Cancer*. 2020; 11: 4474-4494.

Malinverno M, Maderna C, Abu Taha A, Corada M, Orsenigo F, Valentino M, Pisati F, Fusco C, Graziano P, Giannotta M, Yu QC, Zeng YA, Lampugnani MG, Magnusson PU, Dejana E. Endothelial cell clonal expansion in the development of cerebral cavernous malformations. *Nature Communications*. 2019; 10: 2761.

Maraire JN, Awad IA. Intracranial cavernous malformations, lesion behavior and management strategies. *Neurosurgery*. 1995; 37: 591-605.

Marchi S, Corricelli M, Trapani E, Bravi L, Pittaro A, Delle Monache S, Ferroni L, Patergnani S, Missiroli S, Goitre L, Trabalzini L, Rimessi A, Giorgi C, Zavan B, Cassoni P, Dejana E, Retta SF, Pinton P. Defective autophagy is a key feature of cerebral cavernous malformations. *EMBO Mol Med*. 2015; 7: 1403-1417.

Marcos-Ramiro B, García-Weber D, Barroso S, Feito J, Ortega MC, Cernuda-Morollón E, Reglero-Real N, Fernández-Martín L, Durán MC., Alonso MA, Correas I, Cox S, Ridley AJ, Millán J. RhoB controls endothelial barrier recovery by inhibiting Rac1 trafficking to the cell border. *J Cell Biol*. 2016; 213: 385-402.

Mardakheh FK, Self A, Marshall CJ. RHO binding to FAM65A regulates Golgi reorientation during cell migration. *J Cell Sci*. 2016; 129: 4466-4479.

Marzo S, Galimberti V, Biggiogera M. Unexpected distribution of KRIT1 inside the nucleus, new insight in a complex molecular pathway. *European journal of histochemistry*. 2014; 58: 2358.

Matsui Y, Mineharu Y, Satow T, Takebe N, Takeuchi E, Saiki M. Coexistence of multiple cavernous angiomas in the spinal cord and skin, a unique case of Cobb syndrome. *J Neurosurg Spine*. 2014; 20: 142-147.

Matsuki T, Chen J, Howell BW. Acute inactivation of the serine-threonine kinase Stk25 disrupts neuronal migration. *Neural Development*. 2013; 8: 21.

Matsuki T, Matthews RT, Cooper JA, van der Brug, M P, Cookson MR, Hardy JA, Olson EC, Howell BW. Reelin and stk25 have opposing roles in neuronal polarization and dendritic Golgi deployment. *Cell*. 2010; 143: 826-836.

McCormick WF, Hardman JM, Boulter TR. Vascular malformations ("angiomas") of the brain, with special reference to those occurring in the posterior fossa. *J Neurosurg*. 1968; 28: 241-251.

McDonald DA, Shenkar R, Shi C, Stockton RA, Akers AL, Kucherlapati MH, Kucherlapati R, Brainer J, Ginsberg MH, Awad IA, Marchuk DA. A novel mouse model of cerebral cavernous malformations based on the two-hit mutation hypothesis recapitulates the human disease. *Hum Mol Genet*. 2011; 20: 211-222.

McDonald DA, Shi C, Shenkar R, Stockton RA, Feifei L, Ginsberg MH, Marchuk DA, Awad IA. Fasudil Decreases Lesion Burden in a Murine Model of Cerebral Cavernous Malformation Disease. *Stroke*. 2012; 43: 571-574.

McKerracher L, Shenkar R, Abbinanti M, Cao Y, Peiper A, Liao JK, Lightle R, Moore T, Hobson N, Gallione C, Ruschel J, Koskimäki J, Girard R, Rosen K, Marchuk DA, Awad IA. A brain-targeted orally available ROCK2 inhibitor benefits mild and aggressive cavernous angioma disease. *Translational Stroke Research*. 2020; 11: 365-376.

Mikati AG, Khanna O, Zhang L, Girard R, Shenkar R, Guo X, Shah A, Larsson HBW, Tan H, Li L, Wishnoff MS, Shi C, Christoforidis GA, Awad IA. Vascular permeability in Cerebral Cavernous Malformations. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2015; 35: 1632-1639.

Mleynek TM, Chan AC, Redd M, Gibson CC, Davis CT, Shi DS, Chen T, Carter KL, Ling J, Blanco R, Gerhardt H, Whitehead K, Li DY. Lack of CCM1 induces hypersprouting and impairs response to flow. *Hum Mol Genet.* 2014; 23: 6223-6234.

Moore SA, Brown RD, Christianson TJH, Flemming KD. Long-term natural history of incidentally discovered cavernous malformations in a single-center cohort, Clinical article. *Journal of Neurosurgery JNS.* 2014; 120: 1188-1192.

Nogueira E, Fidalgo M, Molnar A, Kyriakis J, Force T, Zalvide J, Pombo CM. SOK1 translocates from the Golgi to the nucleus upon chemical anoxia and induces apoptotic cell death. *The Journal of biological chemistry.* 2008; 283: 16248-16258.

Ohnesorge N, Viemann D, Schmidt N, Czymai T, Spiering D, Schmolke M, Ludwig S, Roth J, Goebeler M, Schmidt M. Erk5 activation elicits a vasoprotective endothelial phenotype via induction of Kruppel-like factor 4 (KLF4). *The Journal of biological chemistry.* 2010; 285: 26199-26210.

Osada S, Izawa M, Saito R, Mizuno K, Suzuki A, Hirai S, Ohno S. YSK1, a novel mammalian protein kinase structurally related to Ste20 and SPS1 but is not involved in the known MAPK pathways. *Oncogene.* 1997; 14: 2047-2057.

Pal S, Lant B, Yu B, Tian R, Tong J, Krieger JR, Moran MF, Gingras A, Derry WB. CCM-3 promotes *C. elegans* germline development by regulating vesicle trafficking cytokinesis and polarity. *Current Biology.* 2017; 27: 868-876.

Peyre M, Miyagishima D, Bielle F, Chapon F, Sierant M, Venot Q, Lerond J, Marijon P, Abi-Jaoude S, Le Van T, Labreche K, Houlston R, Faisant M, Clémenceau S, Boch A, Nouet A, Carpentier A, Boetto J, Louvi A, Kalamarides M. Somatic PIK3CA mutations in sporadic cerebral cavernous malformations. *N Engl J Med.* 2021; 385: 996-1004.

Pitulescu ME, Schmidt I, Benedito R, Adams RH. Inducible gene targeting in the neonatal vasculature and analysis of retinal angiogenesis in mice. *Nat Protoc.* 2010; 5: 1518-1534.

Plummer NW, Gallione CJ, Srinivasan S, Zawistowski JS, Louis DN, Marchuk DA. Loss of p53 sensitizes mice with a mutation in *Ccm1* (KRIT1) to development of Cerebral Vascular Malformations. *The American Journal of Pathology.* 2004; 165: 1509-1518.

Polster SP, Stadnik A, Akers AL, Cao Y, Christoforidis GA, Fam MD, Flemming KD, Girard R, Hobson N, Koenig JI, Koskimäki J, Lane K, Liao JK, Lee C, Lyne SB, McBee N, Morrison L, Piedad K, Shenkar R, Sorrentino M, Thompson RE, Whitehead KJ, Zeineddine HA, Hanley DF, Awad IA. Atorvastatin treatment of Cavernous Angiomas with Symptomatic Hemorrhage Exploratory Proof of Concept (AT CASH EPOC) Trial. *Neurosurgery.* 2019; 85: 843-853.

Pombo CM, Bonventre JV, Molnar A, Kyriakis J, Force T. Activation of a human Ste20-like kinase by oxidant stress defines a novel stress response pathway. *The EMBO journal.* 1996; 15: 4537-4546.

Pombo CM, Force T, Kyriakis J, Nogueira E, Fidalgo M, Zalvide J. The GCK II and III subfamilies of the STE20 group kinases. *Front Biosci.* 2007; 12: 850-859.

Pombo CM, Iglesias C, Sartages M, Zalvide JB. MST Kinases and Metabolism. *Endocrinology*. 2019; 160: 1111-1118.

Preisinger C, Short B, De Corte V, Bruyneel E, Haas A, Kopajtich R, Gettemans J, Barr FA. YSK1 is activated by the Golgi matrix protein GM130 and plays a role in cell migration through its substrate 14-3-3zeta. *J Cell Biol*. 2004; 164: 1009-1020.

Qin Q, Shou J, Li M, Gu M, Meng Z, Xu P, Meng H, Wang X. Stk24 protects against obesity-associated metabolic disorders by disrupting the NLRP3 inflammasome. *Cell Reports*. 2021; 35: 109161.

Qiu L, Sun Y, Chen T, Chen J, Ma H. STRIP2, a member of the striatin-interacting phosphatase and kinase complex, is implicated in lung adenocarcinoma cell growth and migration. *FEBS Open Bio*. 2020; 10: 351-361.

Quatralo AE, Porcelli L, Silvestris N, Colucci G, Angelo A, Azzariti A. EGFR tyrosine kinases inhibitors in cancer treatment, in vitro and in vivo evidence. *Front Biosci*. 2011; 16: 1962-1972.

Rao S, Kirschen GW, Szczurkowska J, Di Antonio A, Wang J, Ge S, Shelly M. Repositioning of somatic golgi apparatus is essential for the dendritic establishment of adult-born hippocampal neurons. *The Journal of neuroscience*. 2018; 38: 631-647.

Raviv Z, Kalie E, Seger R. MEK5 and ERK5 are localized in the nuclei of resting as well as stimulated cells, while MEKK2 translocates from the cytosol to the nucleus upon stimulation. *J Cell Sci*. 2004; 117: 1773-1784.

Ren AA, Snellings DA, Su YS, Hong CC, Castro M, Tang AT, Detter MR, Hobson N, Girard R, Romanos S, Lightle R, Moore T, Shenkar R, Benavides C, Beaman MM, Mueller-Fielitz H, Chen M, Mericko P, Yang J, Sung DC, Lawton MT, Ruppert M, Schwaninger M, Körbelin J, Potente M, Awad IA, Marchuk DA, Kahn ML. PIK3CA and CCM mutations fuel cavernomas through a cancer-like mechanism. *Nature*. 2021; 594: 271-276.

Renz M, Otten C, Faurobert E, Rudolph F, Zhu Y, Boulday G, Duchene J, Mickoleit M, Dietrich A, Ramspacher C, Steed E, Manet-Dupé S, Benz A, Hassel D, Vermot J, Huisken J, Tournier-Lasserre E, Felbor U, Sure U, Albiges-Rizo C, Abdelilah-Seyfried S. Regulation of β 1 Integrin-Klf2-mediated angiogenesis by CCM proteins. *Developmental Cell*. 2015; 32: 181-90.

Riant F, Bergametti F, Ayrygnac X, Boulday G, Tournier-Lasserre E. Recent insights into cerebral cavernous malformations, the molecular genetics of CCM. *FEBS J*. 2010; 277: 1070-1075.

Riant F, Bergametti F, Fournier HD, Chapon F, Michalak-Provost S, Cecillon M, Lejeune P, Hosseini H, Choe C, Orth M, Bernreuther C, Boulday G, Denier C, Labauge P, Tournier-Lasserre E. CCM3 mutations are associated with early-onset cerebral hemorrhage and multiple meningiomas. *Mol Syndromol*. 2013; 4: 165-172.

Ridley AJ. Rho GTPases and actin dynamics in membrane protrusions and vesicle trafficking. *Trends in cell biology*. 2006; 16: 522-559.

Riolo G, Ricci C, Battistini S. Molecular genetic features of Cerebral Cavernous Malformations (CCM) patients, an overall view from genes to endothelial cells. *Cells*. 2021; 10: 704.

Rödel CJ, Otten C, Donat S, Lourenço M, Fischer D, Kuropka B, Paolini A, Freund C, Abdelilah-Seyfried S. Blood flow suppresses vascular anomalies in a zebrafish model of Cerebral Cavernous Malformations. *Circ Res*. 2019; 125: e43-54.

Rual JF, Venkatesan K, Hao T, Hirozane-Kishikawa T, Dricot A, Li N, Berriz GF, Gibbons FD, Dreze M, Ayivi-Guedehoussou N, Klitgord N, Simon C, Boxem M, Milstein S, Rosenberg J, Goldberg DS, Zhang LV, Wong SL, Franklin G, Li S, Albala JS, Lim J, Fraughton C, Llamosas E, Cevik S, Bex C, Lamesch P, Sikorski RS, Vandenhaute J, Zoghbi HY, Smolyar A, Bosak S, Sequerra R, Doucette-Stamm L, Cusick ME, Hill DE, Roth FP, Vidal M. Towards a proteome-scale map of the human protein-protein interaction network. *Nature*. 2005; 437: 1173-1178.

Rusnak DW, Lackey K, Affleck K, Wood ER, Alligood KJ, Rhodes N, Keith BR, Murray DM, Knight WB, Mullin RJ, Gilmer TM. The effects of the novel, reversible Epidermal Growth Factor Receptor/ErbB-2 tyrosine kinase inhibitor, GW2016, on the growth of human normal and tumor-derived cell lines in vitro and in vivo. *Molecular cancer therapeutics*. 2001; 1: 85-94.

Sangwung P, Zhou G, Nayak L, Chan ER, Kumar S, Kang D, Zhang R, Liao X, Lu Y, Sugi K, Fujioka H, Shi H, Lapping SD, Ghosh CC, Higgins SJ, Parikh SM, Jo H, Jain MK. KLF2 and KLF4 control endothelial identity and vascular integrity. *JCI insight*. 2017; 2: e91700.

Sartages M, Florida E, Garcia-Colomer M, Iglesias C, Macía M, Peñas P, Couraud PO, Romero IA, Weksler B, Pombo CM, Zalvide J. High levels of receptor tyrosine kinases in CCM3-deficient cells increase their susceptibility to tyrosine kinase inhibition. *Biomedicines*. 2020; 8: 624.

Schleider E, Stahl S, Wüstehube J, Walter U, Fischer A, Felbor U. Evidence for anti-angiogenic and pro-survival functions of the cerebral cavernous malformation protein 3. *Neurogenetics*. 2011; 12: 83-86.

Seker A, Pricola KL, Guclu B, Ozturk AK, Louvi A, Gunel M. CCM2 Expression Parallels that of CCM1. *Stroke*. 2006; 37: 518-523.

Shenkar R, Shi C, Austin C, Moore T, Lightle R, Cao Y, Zhang L, Wu M, Zeineddine HA, Girard R, McDonald DA, Rorrer A, Gallione C, Pytel P, Liao JK, Marchuk DA, Awad IA. RhoA Kinase inhibition with Fasudil versus Simvastatin in murine models of Cerebral Cavernous Malformations. *Stroke*. 2017; 48: 187-94.



Shenkar R, Shi C, Rebeiz T, Stockton RA, McDonald DA, Mikati AG, Zhang L, Austin C, Akers AL, Gallione CJ, Rorrer A, Gunel M, Min W, De Souza JM, Lee C, Marchuk DA, Awad IA. Exceptional aggressiveness of cerebral cavernous malformation disease associated with PDCD10 mutations. *Genet Med*. 2015; 17: 188-196.

Shi C, Shenkar R, Zeineddine HA, Girard R, Fam MD, Austin C, Moore T, Lightle R, Zhang L, Wu M, Cao Y, Gunel M, Louvi A, Rorrer A, Gallione C, Marchuk DA, Awad IA. B-Cell depletion reduces the maturation of Cerebral Cavernous Malformations in murine models. *Journal of Neuroimmune Pharmacology*. 2016; 11: 369-377.

Shi Z, Jiao S, Zhou Z. STRIPAK complexes in cell signaling and cancer. *Oncogene*. 2016; 35: 4549-4557.

Sigismund S, Avanzato D, Lanzetti L. Emerging functions of the EGFR in cancer. *Mol Oncol*. 2018; 12: 3-20.

Song Y, Eng M, Ghabrial AS. Focal defects in single-celled tubes mutant for Cerebral cavernous malformation 3, GCKIII, or NSF2. *Dev Cell*. 2013; 25: 507-519.

Stockton RA, Shenkar R, Awad IA, Ginsberg MH. Cerebral cavernous malformations proteins inhibit Rho kinase to stabilize vascular integrity. *J Exp Med*. 2010; 207: 881-896.

Suryavanshi N, Furnston J, Ridley AJ. The STRIPAK complex components FAM40A and FAM40B regulate endothelial cell contractility via ROCKs. *BMC cell biology*. 2018; 19: 26.

Tang AT, Hoi JPC, Kotzin JJ, Yang Y, Hong CC, Hobson N, Girard R, Zeineddine HA, Lightle R, Moore T, Cao Y, Shenkar R, Chen M, Mericko P, Yang J, Li L, Tanes C, Kobuley D, Vosa U, Whitehead KJ, Li DY, Franke L, Hart B, Schwaninger M, Henao-Mejia J, Morrison L, Kim H, Awad IA, Zheng X, Kahn ML. Endothelial TLR4 and the microbiome drive cerebral cavernous malformations. *Nature*. 2017; 545: 305-310.

Tang J, Ip JP, Ye T, Ng YP, Yung WH, Wu Z, Fang W, Fu AK, Ip NY. Cdk5-dependent Mst3 phosphorylation and activity regulate neuronal migration through RhoA inhibition. *J Neurosci*. 2014; 34: 7425-7436.

Taslimi S, Modabbernia A, Amin-Hanjani S, Barker F, Macdonald R. Natural history of cavernous malformation, Systematic review and meta-analysis of 25 studies. *Neurology*. 2016; 86: 1984-1991.

Tojkander S, Gateva G, Lappalainen P. Actin stress fibers – assembly, dynamics and biological roles. *J Cell Sci*. 2012; 125: 1855-1864.

Tondeleir D, Lambrechts A, Müller M, Jonckheere V, Doll T, Vandamme D, Bakkali K, Waterschoot D, Lemaistre M, Debeir O, Decaestecker C, Hinz B, Staes A, Timmerman E, Colaert N, Gevaert K, Vandekerckhove J, Ampe C. Cells lacking β -actin are genetically reprogrammed and maintain conditional migratory capacity. *Molecular & cellular proteomics*. 2012; 11: 255-271.

Uribe ML, Marrocco I, Yarden Y. EGFR in cancer, signaling mechanisms, drugs, and acquired resistance. *Cancers*. 2021; 13: 2748.

Valentino M, Dejana E, Malinverno M. The multifaceted PDCD10/CCM3 gene. *Genes Dis.* 2020; 8: 798-813.

van Nieuw Amerongen, Geerten P, Koolwijk P, Versteilen A, van Hinsbergh, Victor W. M. Involvement of RhoA/Rho Kinase signaling in VEGF-induced endothelial cell migration and angiogenesis In Vitro. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology.* 2003; 23: 211-217.

Wang R, Wu S, Yang X, Qian Y, Choi JP, Gao R, Song S, Wang Y, Zhuang T, Wong JLL, Zhang Y, Han Z, Lu HA, Alexander SI, Liu R, Xia Y, Zheng X. Pdc10-Stk24/25 complex controls kidney water reabsorption by regulating Aqp2 membrane targeting. *JCI Insight.* 2021; 6: e142838.

Wang Y, Nakayama M, Pitulescu ME, Schmidt TS, Bochenek ML, Sakakibara A, Adams S, Davy A, Deutsch U, Luthi U, Barberis A, Benjamin LE, Makinen T, Nobes CD, Adams RH. Ephrin-B2 controls VEGF-induced angiogenesis and lymphangiogenesis. *Nature.* 2010; 465: 483-486.

Weksler BB, Subileau EA, Perriere N, Charneau P, Holloway K, Leveque M, Tricoire-Leignel H, Nicotra A, Bourdoulous S, Turowski P, Male DK, Roux F, Greenwood J, Romero IA, Couraud PO. Blood-brain barrier-specific properties of a human adult brain endothelial cell line. *FASEB J.* 2005; 19: 1872-1874.

Weng J, Yang Y, Song D, Huo R, Li H, Chen Y, Nam Y, Zhou Q, Jiao Y, Fu W, Yan Z, Wang J, Xu H, Di L, Li J, Wang S, Zhao J, Wang J, Cao Y. Somatic MAP3K3 mutation defines a subclass of cerebral cavernous malformation. *The American Journal of Human Genetics.* 2021; 108: 942-950.

Whitehead KJ, Chan AC, Navankasattusas S, Koh W, London NR, Ling J, Mayo AH, Drakos SG, Jones CA, Zhu W, Marchuk DA, Davis GE, Li DY. The cerebral cavernous malformation signaling pathway promotes vascular integrity via Rho GTPases. *Nat Med.* 2009; 15: 177-184.

Whitehead KJ, Plummer NW, Adams JA, Marchuk DA, Li DY. Ccm1 is required for arterial morphogenesis, implications for the etiology of human cavernous malformations. *Development.* 2004; 131: 1437-1448.

Yadla S, Jabbour PM, Shenkar R, Shi C, Campbell PG, Awad IA. Cerebral cavernous malformations as a disease of vascular permeability, from bench to bedside with caution. *Neurosurgical focus.* 2010; 29: E4.

Yoruk B, Gillers BS, Chi NC, Scott IC. Ccm3 functions in a manner distinct from Ccm1 and Ccm2 in a zebrafish model of CCM vascular disease. *Developmental biology.* 2012; 362: 121-131.



Yustein JT, Liang XIA, Kahlenburg JM, Robinson D, Templeton D, Kung H. Comparative studies of a new subfamily of human Ste20-like kinases, homodimerization, subcellular localization, and selective activation of MKK3 and p38. *Oncogene*. 2003; 22: 6129-6141.

Zalvide J, Almenglo C, Vazquez S, Garcia-Colomer M, Sartages M, Pombo CM. Measuring the kinase activity of GCKIII proteins in vitro. *Methods Mol Biol*. 2020; 2152: 437-443.

Zalvide J, Fidalgo M, Fraile M, Guerrero A, Iglesias C, Florida E, Pombo CM. The CCM3-GCKIII partnership. *Histol Histopathol*. 2013; 28:1265-1272.

Zawistowski JS, Stalheim L, Uhlik MT, Abell AN, Ancrile BB, Johnson GL, Marchuk DA. CCM1 and CCM2 protein interactions in cell signaling, implications for cerebral cavernous malformations pathogenesis. *Human molecular genetics*. 2005; 14: 2521-2531.

Zhang H, Ma X, Deng X, Chen Y, Mo X, Zhang Y, Zhao H, Ma D. PDCD10 interacts with STK25 to accelerate cell apoptosis under oxidative stress. *Frontiers in bioscience*. 2012; 17: 2295-2305.

Zhang J, Rigamonti D, Dietz HC, Clatterbuck RE. Interaction between krit1 and malcavernin, implications for the pathogenesis of cerebral cavernous malformations. *Neurosurgery*. 2007; 60: 353.

Zhang M, Dong L, Shi Z, Jiao S, Zhang Z, Zhang W, Liu G, Chen C, Feng M, Hao Q, Wang W, Yin M, Zhao Y, Zhang L, Zhou Z. Structural Mechanism of CCM3 Heterodimerization with GCKIII Kinases. *Structure*. 2013; 21: 680-688.

Zhang Y, Tang W, Zhang H, Niu X, Xu Y, Zhang J, Gao K, Pan W, Boggon TJ, Toomre D, Min W, Wu D. A network of interactions enables CCM3 and STK24 to coordinate UNC13D-driven vesicle exocytosis in neutrophils. *Dev Cell*. 2013; 27: 215-226.

Zheng X, Xu C, Di Lorenzo A, Kleaveland B, Zou Z, Seiler C, Chen M, Cheng L, Xiao J, He J, Pack MA, Sessa WC, Kahn ML. CCM3 signaling through sterile 20-like kinases plays an essential role during zebrafish cardiovascular development and cerebral cavernous malformations. *The Journal of clinical investigation*. 2010; 120: 2795-2804.

Zhou H, Qin L, Zhang H, Tang W, Ji W, He Y, Liang X, Wang Z, Yuan Q, Vortmeyer A, Toomre D, Fuh G, Yan M, Kluger MS, Wu D, Min W. Endothelial exocytosis of angiopoietin-2 resulting from CCM3 deficiency contributes to cerebral cavernous malformation. *Nature medicine*. 2016; 22: 1033-1042.

Zhou HJ, Qin L, Jiang Q, Murray KN, Zhang H, Li B, Lin Q, Graham M, Liu X, Grutzendler J, Min W. Caveolae-mediated Tie2 signaling contributes to CCM pathogenesis in a brain endothelial cell-specific Pdc10-deficient mouse model. *Nature Communications*. 2021; 12: 504.

Zhou J, Shao Z, Kerkela R, Ichijo H, Muslin AJ, Pombo C, Force T. Serine 58 of 14-3-3zeta is a molecular switch regulating ASK1 and oxidant stress-induced cell death. *Mol Cell Biol*. 2009; 29: 4167-4176.

Zhou T, Ling K, Guo J, Zhou H, Wu Y, Jing Q, Ma L, Pei G. Identification of a human brain-specific isoform of mammalian STE20-like Kinase 3 that is regulated by cAMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem.* 2000; 275: 2513-2519.

Zhou Z, Rawnsley DR, Goddard LM, Pan W, Cao X, Jakus Z, Zheng H, Yang J, Arthur JS, Whitehead KJ, Li D, Zhou B, Garcia BA, Zheng X, Kahn ML. The Cerebral Cavernous Malformation pathway controls cardiac development via regulation of endocardial MEKK3 signaling and KLF expression. *Developmental Cell.* 2015; 32: 168-180.

Zhou Z, Tang AT, Wong WY, Bamezai S, Goddard LM, Shenkar R, Zhou S, Yang J, Wright AC, Foley M, Arthur JS, Whitehead KJ, Awad IA, Li DY, Zheng X, Kahn ML. Cerebral cavernous malformations arise from endothelial gain of MEKK3-KLF2/4 signalling. *Nature.* 2016; 532: 122-126.

Zudaire E, Gambardella L, Kurcz C, Vermeren S. A computational tool for quantitative analysis of vascular networks. *PLoS One.* 2011; 6: e27385.

ANEXOS

ANEXO I. CRITERIO DE CALIDAD DE LOS ARTÍCULOS DONDE LOS RESULTADOS DE LA PRESENTE TESIS HAN SIDO PUBLICADOS

“High Levels of Receptor Tyrosine Kinases in CCM3-Deficient Cells Increase Their Susceptibility to Tyrosine Kinase Inhibition”

Miriam Sartages^{1,#}, Ebel Florida^{1,2,#}, Mar García-Colomer¹, Cristina Iglesias¹, Manuel Macía³, Patricia Peñas³, Pierre-Olivier Couraud⁴, Ignacio A. Romero⁵, Babette Weksler⁶, Celia M. Pombo¹; Juan Zalvide¹

Biomedicines 2020, 8(12), 624. Editorial: MDPI; ISSN: 2227-9059. DOI: 10.3390/biomedicines8120624

#Ambos autores contribuyeron igualmente en este trabajo.

¹Department of Physiology, Centro Singular de Medicina Molecular e Enfermedades Crónicas (CiMUS), Instituto Sanitario de Santiago de Compostela (IDIS), Universidade de Santiago de Compostela, 15703 Santiago de Compostela, Spain; ²IQVIA RDS Ireland Limited, Eastpoint Business Park, Estuary House, Fairview, Dublin 3, D03 K7W7 Leinster, Ireland; ³Servicio de Obstetricia y Ginecología Hospital Clínico Universitario Santiago, 15703 Santiago de Compostela, Spain; ⁴INSERM, U1016, Institut Cochin, 22 Rue Mechain, 75014 Paris, France; ⁵Department of Life, Health and Chemical Sciences, The Open University, Milton Keynes MK7 6AA, UK; ⁶Weill Medical College, Cornell University, 1300 York Ave, New York, NY 10065, USA

I) Factor de Impacto de la revista *Biomedicines* (ISI Journal Citation Reports, 2020): 6.081

Posición relativa de *Biomedicines* dentro de cada categoría según el JCI (*Journal Citation Indicator*) (ISI Journal Citation Reports, 2020):

- Bioquímica y Biología Molecular: 65/295 (Q1)
- Farmacología y Farmacia: 33/276 (Q1)
- Medicina, Investigación y Experimental: 32/140 (Q1)

II) Contribución de Sartages M.: Metodología, Validación, Análisis Formal, Investigación, Interpretación de los datos, Redacción del Borrador, Edición y revisión del texto del artículo.

III) Revista *Open Access*: <https://www.mdpi.com/2227-9059/8/12/624> con permiso Attribution 4.0 International (*Creative Commons BY 4.0*).



“The GCKIII kinases STK24 and STK25 inhibit cavernoma development”

Miriam Sartages¹, Mar García-Colomer¹, Cristina Iglesias¹, Brian W. Howell², Manuel Macía³, Patricia Peñas³, Celia M. Pombo¹, Juan Zalvide¹

¹*Department of Physiology, Centro Singular de Medicina Molecular e Enfermedades Crónicas (CiMUS), Instituto Sanitario de Santiago de Compostela (IDIS), Universidade de Santiago de Compostela, 15703 Santiago de Compostela, Spain;* ²*Department of Neuroscience and Physiology, SUNY Upstate Medical University, Syracuse, New York, USA;* ³*Servicio de Obstetricia y Ginecología Hospital Clínico Universitario Santiago. 15703 Santiago de Compostela, Spain.*

Artículo Original aceptado para su publicación el 22 de Noviembre de 2021 en la revista *Stroke*. Editorial: The American Heart Association/American Stroke Association (AHA/ASA) Journals; ISSN: 0039-2499.

I) Factor de Impacto de la revista *Stroke* (ISI Journal Citation Reports, 2020): 7.914

Posición relativa de *Stroke* dentro de cada categoría según el JCI (*Journal Citation Indicator*) (ISI Journal Citation Reports, 2020):

- Neurología Clínica: 16/255 (Q1; D1)
- Enfermedad Vasculiar Periférica: 5/84 (Q1; D1)

II) Contribución de Sartages M.: Metodología, Validación, Análisis Formal, Investigación, Interpretación de los datos, Redacción del Borrador, Edición y revisión del texto del artículo.

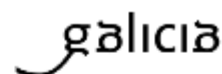
III) La revista *Stroke* permite el uso de las partes del artículo publicado a sus autores sin necesidad de pedir permiso: “*Authors may reuse parts of the work (eg, tables, figures) without requesting permission from the AHA. This includes using parts of the work in online presentations, webinars, and other virtual meeting events.*” -

<https://www.ahajournals.org/permissions-rights>

ANEXO II. INFORME FAVORABLE DEL COMITÉ DE ÉTICA PARA EL USO DE HUVEC



Secretaría Técnica
Comité Autonómico de Ética da Investigación de Galicia
Secretaría Xeral, Consellería de Sanidade
Edificio Administrativo San Lázaro
15703 SANTIAGO DE COMPOSTELA
Tel: 881 546425; celc@sergas.es



DICTAME DO COMITÉ DE ÉTICA DA INVESTIGACIÓN DE SANTIAGO-LUGO

Juan Manuel Vázquez Lago, Secretario do Comité de Ética da Investigación de Santiago-Lugo

CERTIFICA:

Que este Comité avaliou na súa reunión do día 11/18/2014 o estudo:

Título: Estudio de la patogenia de malformaciones vasculares usando células de cordón umbilical

Promotor: Universidad de Santiago de Compostela

Tipo de estudo: Outros

Código de Rexistro: 2014/493

E, tomando en consideración as seguintes cuestións:

- A pertinencia do estudo, tendo en conta o coñecemento dispoñible, así coma os requisitos legais aplicables, e en particular a Lei 14/2007, de investigación biomédica, o Real Decreto 1716/2011, de 18 de novembro, polo que se establecen os requisitos básicos de autorización e funcionamento dos biobancos con fins de investigación biomédica e do tratamento das mostras biolóxicas de orixe humana, e se regula o funcionamento e organización do Rexistro Nacional de Biobancos para investigación biomédica, a ORDE SAS/3470/2009, de 16 de decembro, pola que se publican as Directrices sobre estudos Posautorización de Tipo Observacional para medicamentos de uso humano, e a Circular nº 07/2004, investigacións clínicas con produtos sanitarios.
- A idoneidade do protocolo en relación cos obxectivos do estudo, xustificación dos riscos e molestias previsibles para o suxeito, así coma os beneficios esperados.
- Os principios éticos da Declaración de Helsinki vixente.
- Os Procedementos Normalizados de Traballo do Comité.

Emite un **INFORME FAVORABLE** para a realización do estudo **polo/a investigador/a do centro:**

Centros	Investigadores Principais
CIMUS	Juan Bautista Zalvide Torrente

En Santiago de Compostela, a 19 de novembro de 2014
O secretario

Juan M. Vázquez Lago



ANEXO III. MODELO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA EL USO DE HUVEC

FOLLA DE INFORMACIÓN AO/Á PARTICIPANTE ADULTO/A

TÍTULO DO ESTUDO: Estudio da patoxenia de malformacións vasculares empregando células de cordón umbilical.

INVESTIGADOR: Juan Bautista Zalvide Torrente

CENTRO: Universidade de Santiago de Compostela

Este documento ten por obxecto ofrecerlle información sobre un **estudo de investigación** no que se lle invita a participar. Este estudo foi aprobado polo Comité de Ética da Investigación de19 de novembro de 2014.

Se decide participar no mesmo, debe recibir información personalizada do investigador, **ler antes este documento** e facer todas as preguntas que precise para comprender os detalles sobre o mesmo. Se así o desexa, pode levar o documento, consultalo con outras persoas, e tomar o tempo necesario para decidir se participar ou non.

A participación neste estudo é completamente **voluntaria**. Vd. pode decidir non participar ou, se acepta facelo, cambiar de parecer retirando o consentimento en calquera momento sen obriga de dar explicacións. Asegurámoslle que esta decisión non afectará á relación co seu médico nin á asistencia sanitaria á que Vd. ten dereito.

Cal é o propósito do estudo?

O estudo dos vasos sanguíneos é importante. Moitas veces as células que forman parte deles non son capaces de formar un vaso normal e dan lugar ás chamadas malformacións vasculares, que poden dar problemas graves. Por iso é importante estudar cómo se comportan. A forma menos agresiva de obter estas células é a partir da vea do cordón umbilical, unha piza de tecido que en caso contrario desbotaríase.

Por que me ofrecen participar a min?

Vostede é convidado a participar porque poderíamos empregar o cordón umbilical do *seu fillo/filla para illar células endoteliais*.

En que consiste a miña participación?

A mostra que necesitaríamos xa está extraída. Non necesitamos nin coñeceremos ningún dato personal nin de Vd. nin do seu fillo, nin ningún dato da súa historia clínica. Os restos do cordón que non se empreguen serán tratados como se trataría todo o cordón no caso de non empregalo. Tampouco nos poñeremos en contacto con Vd. para conseguir datos nin novas mostras, xa que isto non forma parte do estudo e sobre todo non saberemos de quen procede cada mostra.

As mostras empregaránse para illar células endoteliais, que son as que tapizan o interior dos vasos sanguíneos. Estas células incubaránse con nutrientes e empregaránse para ver cómo responden a distintos estímulos relacionados coas malformacións vasculares.

A súa participación non lle requirirá tempo algún.

O investigador pode decidir finalizar o estudo antes do previsto ou interromper a súa participación. En todo caso informaráselle dos motivos da súa retirada.

Que molestias ou inconvenientes ten?

A súa participación non implica molestias adicionais as da practica asistencial habitual.

Obtereire algún beneficio por participar?

Non se espera que Vd. obteña beneficio directo por participar no estudo. A investigación pretende descubrir aspectos descoñecidos ou pouco claros sobre as malformacións vasculares. Esta información poderá ser de utilidade nun futuro para outras persoas.

Recibirei a información que se obteña do estudo?

Se Vd. o desexa, facilitaráselle un resumo dos resultados do estudo.

Tamén poderá recibir os resultados das probas que se realicen coas súas mostras se así o solicita dirixíndose ao investigador. Estes resultados poden non ter aplicación clínica nin unha interpretación clara, polo que, se quere dispor deles, deberían ser comentados co médico do estudo.

Publicaranse os resultados deste estudo?

Os resultados deste estudo serán remitidos a publicacións científicas para a súa difusión, pero non se transmitirá ningún dato que poida levar á identificación dos participantes.

Como se protexerá a confidencialidade dos meus datos e mostras?

O tratamento, comunicación e cesión dos seus datos farase conforme ao disposto pola Lei Orgánica 15/1999, de 13 de decembro, de protección de datos de carácter persoal.

So equipo investigador, e as autoridades sanitarias, que teñen deber de gardar a confidencialidade, terán acceso a todos os datos recollidos polo estudo. Poderase transmitir a terceiros información que non poida ser identificada. No caso de que algunha información sexa transmitida a outros países, realizarase cun nivel de protección dos datos equivalente, como mínimo, ao esixido pola normativa do noso país.

Os seus datos e mostras biolóxicas serán recollidos e conservados até rematar o estudo de modo:

- **Anonimizados**, e dicir, que se rompeu todo vínculo que poida identificar a persoa doante dos datos, non podendo ser identificado nin sequera polo equipo investigador.

O responsable da custodia dos datos e mostras é Juan Bautista Zalvide Torrente, e o lugar de realización dos análises previstos neste estudo é o centro de investigación CIMUS, de la Universidad de Santiago de Compostela

Ao rematar o estudo, conforme ao RD 1716/2011, as súas mostras biolóxicas serán *destruídas*.

Existen intereses económicos neste estudo?

Esta investigación é promovida pola Universidade de Santiago de Compostela con fondos aportados pola *Secretaría Xeneral de Investigación de Desenvolvemento*. O investigador non recibirá retribución específica pola dedicación ao estudo.

Vd. non será retribuído por participar. É posible que dos resultados do estudo se deriven produtos comerciais ou patentes. Neste caso, Vd. non participará dos beneficios económicos orixinados.

Como contactar c equipo investigador deste estudo?

Vd. pode contactar con Juan Bautista Zalvide Torrente no teléfono 881-815414 ou enderezo electrónico juan.zalvide@usc.es **Moitas grazas pola súa colaboración.**

Deberán firmarse tres modelos, un será entregado ao participante, outro será conservado no centro no que se obtivo a mostra, e o terceiro será conservado polo responsable do estudo de investigación.

DOCUMENTO DE CONSENTIMENTO PARA A PARTICIPACIÓN NUN ESTUDO DE INVESTIGACIÓN

TÍTULO: Efectos biológicos de las quinasas GCKIII y proteínas asociadas.

Eu, _____

Lin a folla de información ao participante do estudo arriba mencionado que se me entregou, puiden conversar con _____ e facer todas as preguntas sobre o estudo necesarias.

Comprendo que a miña participación é voluntaria, e que podo retirarme do estudo cando queira, sen ter que dar explicacións e sen que isto repercuta nos meus coidados médicos.

Accedo a que se utilicen os meus datos e mostras nas condicións detalladas na folla de información ao participante.

Presto libremente a miña conformidade para participar neste estudo.

Respecto á conservación das mostras recollidas neste estudo, destruíranse unha vez terminado o estudo.

Asdo.: O/a participante,

Asdo.:O/a investigador/a que solicita o consentimento

Nome e apelidos: _____

Nome e apelidos: _____



Data:

Data:

ANEXO IV. AUTORIZACIÓN DEL PROYECTO DE EXPERIMENTACIÓN ANIMAL



Edificio administrativo Monelos
Vicente Ferrer, 2
15071 A Coruña



REXISTRO XERAL DA XUNTA DE GALICIA
REXISTRO DO EDIFICIO ADMINISTRATIVO DA CORUÑA
A CORUÑA

Data 21/07/2014 09:45:39

SAÍDA 77425 / RX 648374



Juan Bautista Zalvide Torrente
Centro de Investigación en Medicina
Molecular y Enfermedades Crónicas (CIMUS)
Avda. Barcelona, 22
15782 Santiago de Compostela (A Coruña)

Ref.: JLPV/IIId

NOTIFICACIÓN DE RESOLUCIÓN DUNHA AUTORIZACIÓN DE PROXECTOS DE EXPERIMENTACIÓN ANIMAL

Expediente núm.: 15010/14/003

Data de inicio: 16-06-2014

Interesado: Juan Bautista Zalvide Torrente

Forma de inicio: solicitude do interesado

Procedemento: resolución de autorización

Notifícolle que con data 17 de xullo de 2014, o xefe territorial da Consellería do Medio Rural e do Mar emitiu unha resolución de autorización de proxectos de experimentación animal, cuxo texto íntegro é o seguinte:

ANTECEDENTES

O interesado, como representante do centro CIMUS (Universidade de Santiago de Compostela), presentou con data 10-04-2014 e rexistro de entrada 43278 RX 329897, unha solicitude para a realización do proxecto de experimentación animal, cuxos datos se detallan a continuación:

Denominación do proxecto: Estudo de quinasas GCKIII e cavernomas cerebrais

Nome do centro usuario: CIMUS (USC)

Persoa responsable do proxecto: Juan Bautista Zalvide Torrente

Establecemento onde se realizarán os procedementos do proxecto (ou lugar xeográfico no caso de traballos de campo): CIMUS (USC)

Clasificación do proxecto : Tipo I Tipo II Tipo III

CONSIDERACIÓNS LEGAIS E TÉCNICAS

1. O Real decreto 53/2013, de 1 de febreiro (BOE núm. 34, do 8 de febreiro), polo que se establecen as normas básicas aplicables para a protección dos animais utilizados en experimentación e outros fins científicos, incluíndo a docencia, establece no seu artigo 33 as condicións de autorizacións dos proxectos con animais de experimentación.
2. O artigo 89 da Lei 30/1992, de 26 de novembro, do réxime xurídico das administracións públicas e do procedemento administrativo común (BOE núm. 285, 27 de novembro de 1992), modificada pola Lei 4/1999, de 14 de xaneiro, establece que a resolución que poña fin o procedemento decidirá todas as cuestións expostas polos interesados e aquelas outras derivadas deste.





XUNTA DE GALICIA
DELEGACIÓN TERRITORIAL
DA CORUÑA
 Xefatura Territorial da Consellería do
 Medio Rural e do Mar

Edificio administrativo Monelos
 Vicente Ferrer, 2
 15071 A Coruña



3. O Servizo de Gandaría da Coruña revisou a documentación achegada na solicitude e o resultado favorable da avaliación do proxecto, realizada polo órgano habilitado Sección de Experimentación animal do Comité de Bioética da Universidade de Santiago de Compostela.

Esta xefatura territorial é competente para ditar unha resolución, de conformidade co artigo 11 do Decreto 245/2009 de 3 de abril, polo que se regulan as delegacións territoriais da Xunta de Galicia e o Decreto 46/2012, de 19 de xaneiro, polo que establece a estrutura orgánica da Consellería do Medio Rural e do Mar e do Fondo Galego de Garantía Agraria.

De acordo con todo o indicado, RESOLVO:

1. Autorizar o proxecto solicitado.
2. Notificarlle esta resolución ao interesado.

O mencionado proxecto non deberá someterse a unha avaliación retrospectiva.

A autorización deste proxecto terá unha duración de 5 anos, transcorridos os cales, deberá ser renovada esta autorización.

A citada autorización é unicamente válida nas condicións que figuran no expediente. Ante calquera cambio significativo no proxecto que poida ter efectos negativos sobre o benestar dos animais, deberá solicitar a confirmación da autorización ao Servizo Provincial de Gandaría.

Esta autorización poderá ser suspendida, no caso de que o proxecto non se leve a cabo de acordo coas condicións de autorización e retirada, previo expediente tramitado ao que se lle dará audiencia.

Contra a presente resolución, que non pon fin á vía administrativa, poderá interpor recurso de alzada ante a conselleira de Medio Rural e do Mar da Xunta de Galicia no prazo dun mes contado a partir da recepción da notificación da presente resolución, conforme coa Lei 30/1992, do 26 de novembro, (BOE núm.: 285, 27 de novembro de 1992), de réxime xurídico das administracións públicas e do procedemento administrativo común na súa redacción dada pola Lei 4/1999, do 13 de xaneiro.

A Coruña, 17 de xullo de 2014
 O xefe do Servizo de Gandaría

Eugenio Romero Senande





Departamento Territorial
Edificio Administrativo de Servizos Múltiples
Vicente Ferrer, 2
15071 – A Coruña

RESOLUCIÓN DE AUTORIZACIÓN DE PROXECTOS DE EXPERIMENTACIÓN ANIMAL

Expediente núm.: 15010-14-003 **Data de inicio:** 01.02.2019
Persoa interesada: Juan Bautista Zalvide Torrente **Procedemento:** resolución de autorización
Forma de inicio: solicitude da persoa interesada

ANTECEDENTES

A persoa interesada, como representante do centro CIMUS (Universidade de Santiago de Compostela), presentou o 30.01.2019 unha solicitude para a realización do proxecto de experimentación animal (entrada no Rexistro Electrónico da Xunta de Galicia 2019/201806). Posteriormente, con data 06.03.2019, achegou documentación que se lle requirira nese mesmo día. Deseguido detallamos o proxecto:

Denominación do proxecto: *Estudo de quinzas GCKIII e cavernomas cerebrais*
Nome do centro usuario: Facultade de Medicina do CIMUS
Persoa responsable do proxecto: Juan Bautista Zalvide Torrente
Establecemento onde se realizarán os procedementos do proxecto (ou lugar xeográfico no caso de traballos de campo): Animalario da Facultade de Medicina
Clasificación do proxecto : Tipo I Tipo II Tipo III

CONSIDERACIÓNS LEGAIS E TÉCNICAS

1 O Real decreto 53/2013, de 1 de febreiro (BOE 34, do 8 de febreiro), polo que se establecen as normas básicas aplicables para a protección dos animais utilizados en experimentación e outros fins científicos, incluíndo a docencia, establece no seu artigo 33 as condicións de autorizacións dos proxectos con animais de experimentación.

2 O artigo 88 da Lei 39/2015, de 1 de outubro, do procedemento administrativo común das administracións públicas (BOE 236, do 2 de outubro de 2015) establece que a resolución que poña fin o procedemento decidirá todas as cuestións expostas polos interesados e aquelas outras derivadas deste.

3 O Servizo de Gandaría da Coruña revisou a documentación achegada na solicitude e o resultado favorable da avaliación do proxecto, realizada polo órgano habilitado da Sección de Experimentación Animal do Comité de Bioética da Universidade de Santiago de Compostela.

CVE: 15XVX50n1
Verificación: <https://sede.xunta.gal/cve>





XUNTA DE GALICIA
CONSELLERÍA DO MEDIO RURAL

Departamento Territorial
Edificio Administrativo de Servizos Múltiples
Vicente Ferrer, 2
15071 – A Coruña

Esta xefatura territorial é competente para ditar unha resolución, de conformidade co Decreto 149/2018, do 5 de decembro, polo que se establece a estrutura orgánica da Consellería do Medio Rural e se modifica parcialmente o Decreto 177/2016, do 15 de decembro, polo que se fixa a estrutura orgánica da Vicepresidencia e das consellerías da Xunta de Galicia (DOG 235, do 11 de novembro).

De acordo con todo o indicado, RESOLVO:

- 1 Autorizar o proxecto solicitado.
- 2 O mencionado proxecto non precisa someterse a unha avaliación retrospectiva.
- 3 A autorización deste proxecto terá unha duración de cinco anos e unha vez transcorrido este tempo deberá ser renovada.

A citada autorización é unicamente válida nas condicións que figuran no expediente. Ante calquera cambio significativo no proxecto que poida ter efectos negativos sobre o benestar dos animais, deberá solicitar a confirmación da autorización ao Servizo Provincial de Gandaría.

Esta autorización poderá ser suspendida, no caso de que o proxecto non se leve a cabo de acordo coas condicións de autorización e retirada, previo expediente tramitado ao que se lle dará audiencia.

Contra a presente resolución, que non lle pon fin á vía administrativa, poderá interpoñer un recurso de alzada ante o conselleiro de Medio Rural. O prazo comezará a contar dende o día seguinte ao da recepción desta resolución. Todo isto, segundo o disposto nos artigos 121 e 122 da citada Lei 39/2015.

Mediante este escrito notifícase a Juan Bautista Zalvide Torrente esta resolución segundo o esixido no artigo 40.1 da antedita Lei 39/2015.

Afirmado por: LOPEZ LOPEZ, MONICA
Cargo: Xefa Territorial
Data e hora: 21/03/2019 16:29:15





Las malformaciones cavernosas cerebrales (CCM) se componen de vasos sanguíneos anormales en forma de cavernas de paredes delgadas. La presente tesis aborda el estudio de las bases moleculares de esta enfermedad mediante dos estrategias distintas. Por un lado, un objetivo nos llevó a estudiar el aumento del receptor EGFR en células endoteliales deficientes en la proteína CCM3. Estas células demostraron ser más susceptibles a sufrir apoptosis en presencia de inhibidores farmacológicos del EGFR, lo que nos sugiere su uso como terapia en las CCM. También quisimos conocer cuál era el papel que las GCKIII quinasas en el desarrollo de la enfermedad. Tanto en modelo in vitro como en modelo in vivo, nuestros resultados sugieren que las GCKIII quinasas STK24 y STK25 juegan un importante papel en la inhibición de las CCM.