
UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA AGRONÒMICA I DEL MEDI NATURAL

TRABAJO FIN DE GRADO DE BIOTECNOLOGÍA



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

Puesta a punto de un método de cultivo aire-líquido para el estudio de la Discinesia Ciliar Primaria

Curso académico: 2017-2021

Autor: Victoria Muriach Pérez

Tutor académico: Dr. Rafael Sirera Pérez

Tutor externo: Dr. Francisco Dasí Fernández

Cotutor externo: Daniel Pellicer Roig

VALENCIA, 5 de julio de 2021



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

INCLIVA | VLC
Instituto de Investigación Sanitaria

TÍTULO: Puesta a punto de un método de cultivo aire-líquido para el estudio de la Discinesia Ciliar Primaria

RESUMEN:

-INTRODUCCIÓN: La Discinesia Ciliar Primaria (DCP) es una enfermedad rara respiratoria con una prevalencia de 1/20000. Es una condición hereditaria y permanente causada por defectos congénitos en la ultraestructura de los cilios. Se manifiesta causando un funcionamiento deficiente del sistema de aclaramiento mucociliar, generando congestión nasal, tos, otitis o en casos más graves problemas pulmonares como las bronquiectasias. Se trata de una enfermedad con un diagnóstico tardío e infradiagnosticada por lo que actualmente se buscan nuevas técnicas para el estudio de la enfermedad. Es por ello por lo que un cultivo en interfaz Aire-Líquido (ALI) permite generar condiciones más similares a las fisiológicas, utilizándose como modelo para el estudio de la DCP. Sin embargo, las células están sometidas a un equilibrio sustancias oxidantes-sustancias antioxidantes, que puede verse alterado por los cambios en las condiciones del cultivo ALI, generando una situación de estrés oxidativo.

-MÉTODOS: Establecimiento de un modelo celular para la investigación de la DCP mediante la técnica de cultivo ALI de células epiteliales nasales obtenidas del cornete nasal medio de un individuo sano. Este cultivo permite la diferenciación celular logrando así el desarrollo de un epitelio pseudoestratificado. En segundo lugar, se llevó a cabo, mediante RT-qPCR, el análisis de la expresión de diversos genes del sistema antioxidante en las diferentes etapas del cultivo ALI.

-RESULTADOS: El cultivo se alcanzó con éxito, caracterizado por la presencia de células ciliadas generadoras de movimiento. Asimismo, las células en general en el cultivo, están sometidas a un mayor estrés oxidativo cuando se encuentran totalmente sumergidas, es decir, en la etapa de crecimiento y proliferación.

-CONCLUSIÓN: Los resultados obtenidos en este trabajo indican que ha sido posible, la puesta a punto en nuestro laboratorio, del cultivo ALI caracterizado por el desarrollo de células epiteliales nasales, células productoras de mucosidades y células multiciliadas características del epitelio nasal humano. En este contexto, el cultivo ALI destaca por su beneficioso uso en el estudio de enfermedades respiratorias, favoreciendo la diferenciación celular, no adquirida en los cultivos en monocapa.

-PALABRAS CLAVE: Enfermedad rara respiratoria (ERR); Discinesia Ciliar Primaria (DCP); Interfaz Aire-Líquido (ALI); Célula ciliada; Cultivo celular; Estrés oxidativo (EO); Transfección.

Autor: Victoria Muriach Pérez

Localidad y fecha: Valencia, Julio de 2021

Tutor Académico: Rafael Sirera Pérez

Tutor experimental: Francisco Dasí Fernández

Cotutor colaborador: Daniel Pellicer Roig

TITLE: Development of an Air-Liquid culture method for the study of Primary Ciliary Dyskinesia.

SUMMARY:

-INTRODUCTION: Primary Ciliary Dyskinesia (DCP) is a rare respiratory disease with a prevalence of 1/20000. It is a hereditary and permanent condition caused by congenital defects in the ultrastructure of the cilia. It manifests itself by causing a deficient functioning of the mucociliary clearance system, generating nasal congestion, cough, otitis or in more severe cases pulmonary problems such as bronchiectasis. It is a disease with a late diagnosis and underdiagnosed, so new techniques for the study of the disease are currently being sought. This is why an Air-Liquid Interface (ALI) culture allows the generation of conditions more similar to physiological ones, being used as a model for the study of DCP. However, cells are subjected to an oxidant-antioxidant substance balance, which can be altered by changes in ALI culture conditions, generating oxidative stress.

-METHODS: Establishment of a cellular model for the investigation of DCP using ALI culture technique of nasal epithelial cells obtained from the middle nasal concha of a healthy individual. This culture allows cell differentiation, thus achieving the development of a pseudostratified epithelium. Secondly, RT-qPCR was used to analyze the expression of various genes of the antioxidant system in the different stages of the ALI culture.

-RESULTS: The culture was successfully achieved, characterized by the presence of motility-generating ciliary cells. Also, cells in general in the culture, are subjected to higher oxidative stress when they are fully submerged, that is in the growth and proliferation stage.

-CONCLUSION: The results obtained in this work indicate that it has been possible, to develop in our laboratory, the ALI culture characterized by the development of nasal epithelial cells, mucus-producing cells and multiciliated cells characteristic of the human nasal epithelium. In this context, ALI culture stands out for its beneficial use in the study of respiratory diseases, favoring cell differentiation, not acquired in monolayer cultures.

-KEY WORDS: Rare Respiratory Disease (ERR); Primary Ciliary Dyskinesia (DCP); Air-Liquid Interface (ALI); Ciliated Cell; Cell culture; Oxidative Stress (EO), Transfection

Author: Victoria Muriach Pérez

Location and date: Valencia, Julio de 2021

Academic tutor: Rafael Sirera Pérez

Experimental tutor: Francisco Dasí Fernández

Collaborating co-tutor: Daniel Pellicer Roig

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, agradecer al Dr. Francisco Dasí por darme la oportunidad de formar parte de su laboratorio de investigación, donde he podido ampliar mis conocimientos en cuanto a desarrollo profesional. A Daniel Pellicer por haberme guiado, aconsejado y dado su apoyo en todo momento, por haberme enseñado a manejar en un laboratorio y por confiar en mí desde el primer día. Gracias por transmitirme tu forma de ver la ciencia y tu alegría.

Agradecer a todos los compañeros de laboratorio, por ofrecerme su ayuda constante y por hacerme sentir una más del grupo, consiguiendo que mi estancia en el laboratorio haya sido una experiencia totalmente enriquecedora.

A mi tutor académico Rafael Sirera, por prestarme su ayuda, al igual que a mis profesores de la Universitat Politècnica de València, por todos los conocimientos que me han enseñado a lo largo de la carrera, y mostrarme el verdadero significado de la biotecnología y la investigación.

A mis compañeros y amigos de la carrera, por compartir esta experiencia conmigo, por el apoyo mutuo en los momentos de agobio, por animarnos a que podíamos con todo y por compartir todo aquello que sabíamos. Estos cuatro años de carrera no habrían sido lo mismo sin vosotros.

A mis amigas y amigos, por animarme siempre que algo parecía que no me iba bien, y mostrar interés en todo lo que hacía. Y a mis compañeras de piso, por aguantar todos mis días de bajón, y por escuchar constantemente mis presentaciones incluso cuando no entendían nada de lo que hablaba.

A mi familia, por hacerme sentir que puedo conseguir todo lo que me propongo y sentirse orgullosos de mí en todo aquello que hago. Por mimarme, enseñarme, apoyarme, entenderme y aconsejarme mejor que nadie, y porque pasa lo que pasa siempre estáis ahí.

Finalmente, agradezco a todas aquellas personas que han participado de una u otra manera en este trabajo. ¡¡Gracias!!

ÍNDICE

I.INTRODUCCIÓN	1
I.I. CILIOS: ESTRUCTURA Y FUNCIÓN.....	1
I.II. HISTORIA DE LA DISCINESIA CILIAR PRIMARIA.....	3
I.III. DCP: EPIDEMIOLOGÍA Y MANIFESTACIONES CLÍNICAS	4
I.IV. DCP: GENÉTICA DE LA ENFERMEDAD	5
I.V. DCP: PRONÓSTICO Y TRATAMIENTO	6
I.VI. CULTIVO EN INTERFAZ AIRE-LÍQUIDO	7
I.VII. PERFIL OXIDATIVO.....	7
II.OBJETIVOS.....	9
III.MATERIAL Y MÉTODOS	9
III.I. POBLACIÓN DE ESTUDIO	10
III.II. TOMA DE MUESTRAS	10
III.III. CULTIVO: DÍA 0	11
III.IV. CULTIVO: DÍA 1.....	11
III.V. CULTIVO: MANTENIMIENTO (DÍAS 2-7).....	12
III.VII. CULTIVO: EXPANSIÓN	12
III.VII. CRIOPRESERVACIÓN.....	13
III.VIII. DESCONGELACIÓN	13
III.IX. CULTIVO: INTERFAZ AIRE-LÍQUIDO	14
III.X. EXTRACCIÓN ARN.....	14
III.XI. PCR CUANTITATIVA.....	15
III.XII. TRANSFECCIÓN.....	16
IV.RESULTADOS.....	17
IV.I. PUESTA A PUNTO DEL PROTOCOLO DE CULTIVO CELULAR MEDIANTE ALI.....	17
IV.I.I. Extracción.....	17
IV.I.II. Congelación/Descongelación.....	18
IV.I.III. Cultivo ALI.....	20
IV.I.IV. Extracción ARN.....	24
IV.I.V. Transfección	24
IV.II. ANÁLISIS DEL PERFIL OXIDATIVO.....	26
V.DISCUSIÓN.....	30
VI.CONCLUSIONES	34
VII.REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	35
VIII.ANEXOS	39

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura I. Esquema representativo de un corte transversal del tallo o axonema de un cilio con estructura 9+2. (Adaptada de Djakow, J., & O'Callaghan, C. (2014). Primary ciliary dyskinesia. <i>Breathe</i> , 10(2), 122–133. doi:10.1183/20734735.007413).	2
Figura II.(A) Corte transversal del axonema de un individuo sano (B) Corte transversal del axonema de un paciente con Discinesia Ciliar Primaria, en el que se muestra la ausencia total de los brazos de dineína (Meeks & Bush, 2000).	3
Figura III. Esquema representativo en sección transversal del cultivo Interfaz Aire-Líquido (ALI) para células epiteliales de fenotipo mucociliar (Adaptada de Chen & Schoen 2019).....	10
Figura IV. Proceso utilizado para la recogida de células epiteliales nasales humanas del cornete nasal medio, utilizando un cepillo de citología.....	11
Figura V. Biopsia de células nasales epiteliales humanas adheridas al pocillo tras siete días de cultivo. ...	17
Figura VI. Células epiteliales nasales descongeladas del nitrógeno líquido y cultivadas en un pocillo de una placa P12.....	18
Figura VII.Segundo día de descongelación de las células epiteliales nasales. Se muestra adherencia en algunas de las células caracterizada por la forma alargada, frente a otras que continúan despegadas definidas por una estructura redondeada.	19
Figura VIII.Séptimo día de descongelación de las células epiteliales nasales. Se muestra adherencia total de las células, manifestada por la disposición estirada que se observa en las células.....	19
Figura IX.Adherencia de las células epiteliales nasales. Enfoque 40x en el microscopio invertido, en el que se evidencia la adherencia de las células al frasco.	20
Figura X. Contaminación por hongos detectada en el primero de los cultivos en las cestillas Transwell realizado de las células epiteliales nasales humanas.....	21
Figura XI. Enfoque 4x en el microscopio invertido manifestando las tight junctions (uniones estrechas) que se establecen entre las células durante la etapa de proliferación y crecimiento.....	21
Figura XII.A) Cestilla sin células. Enfoque a los poros de la cestilla y la ausencia de células. B) Células nasales epiteliales cultivadas en una cestilla Transwell, se determina la presencia celular caracterizada por la direccionalidad de las células.....	22
Figura XIII. Producción de moco detectada a partir de la segunda semana cultivada con el medio ALI completo del cultivo en interfaz aire-líquido, por parte de las células productoras de mucosidades.	22
Figura XIV. Producción de moco detectada a partir de la segunda semana cultivada con el medio ALI completo del cultivo en interfaz aire-líquido, por parte de las células productoras de mucosidades, con un enfoque de 40x en el microscopio.	23
Figura XV. Célula ciliada observada a los 28 días del cultivo en interfaz aire-líquido, caracterizada por la presencia de cilios y el movimiento generado.	23
Figura XVI. Fluorescencia detectada tras la transfección de GFP con 1,5 µl de Lipofectamine 3000 de las células epiteliales nasales humanas.....	24
Figura XVII. Fluorescencia detectada tras la transfección de GFP con 0,75 µl de Lipofectamine 3000 de las células epiteliales nasales humanas.....	25
Figura XVIII. Fluorescencia observada en el moco una vez realizada la transfección con GFP de las células epiteliales nasales humanas en el cultivo en interfaz aire-líquido.....	25
Figura XIX. Control negativo de la transfección de las células epiteliales nasales humanas con GFP.....	25
Figura XX.Genes relacionados con hipoxia en un cultivo de células epiteliales nasales en ALI. El eje X describe las etapas del cultivo: Basal: Células extraídas directamente del cornete nasal medio; ExP: Células cultivadas con medio Ex-P en la superficie apical y basal; ALI1: Células cultivadas una semana en interfaz aire líquido; ALI2: Células cultivadas dos semanas en interfaz aire líquido; ALI3: Células cultivadas tres semanas en interfaz aire líquido. El eje Y representa la diferencia de expresión del gen con respecto a la muestra recién extraída (basal).....	27
Figura XXI.Genes relacionados con la síntesis del glutatión en un cultivo de células epiteliales nasales en ALI. El eje X describe las etapas del cultivo: Basal: Células extraídas directamente del cornete nasal medio; ExP: Células cultivadas con medio Ex-P en la superficie apical y basal; ALI1: Células cultivadas una semana en interfaz aire líquido; ALI2: Células cultivadas dos semanas en interfaz aire líquido; ALI3: Células cultivadas tres semanas en interfaz aire líquido. El eje Y representa la diferencia de expresión del gen con respecto a la muestra recién extraída (basal).	28
Figura XXII.Genes relacionados con la dismutación de los superóxidos a peróxido de hidrógeno y oxígeno en un cultivo de células epiteliales nasales en ALI. El eje X describe las etapas del cultivo:	

Basal: Células extraídas directamente del cornete nasal medio; ExP: Células cultivadas con medio Ex-P en la superficie apical y basal; ALI1: Células cultivadas una semana en interfaz aire líquido; ALI2: Células cultivadas dos semanas en interfaz aire líquido; ALI3: Células cultivadas tres semanas en interfaz aire líquido. El eje Y representa la diferencia de expresión del gen con respecto a la muestra recién extraída (basal).....28

Figura XXIII. Genes relacionados con la proliferación celular y el estrés oxidativo en un cultivo de células epiteliales nasales en ALI. El eje X describe las etapas del cultivo: Basal: Células extraídas directamente del cornete nasal medio; ExP: Células cultivadas con medio Ex-P en la superficie apical y basal; ALI1: Células cultivadas una semana en interfaz aire líquido; ALI2: Células cultivadas dos semanas en interfaz aire líquido; ALI3: Células cultivadas tres semanas en interfaz aire líquido. El eje Y representa la diferencia de expresión del gen con respecto a la muestra recién extraída (basal).....29

Figura XXIV. Genes relacionados con la defensa antioxidante en un cultivo de células epiteliales nasales en ALI. El eje X describe las etapas del cultivo: Basal: Células extraídas directamente del cornete nasal medio; ExP: Células cultivadas con medio Ex-P en la superficie apical y basal; ALI1: Células cultivadas una semana en interfaz aire líquido; ALI2: Células cultivadas dos semanas en interfaz aire líquido; ALI3: Células cultivadas tres semanas en interfaz aire líquido. El eje Y representa la diferencia de expresión del gen con respecto a la muestra fresca (basal).29

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I. Manifestaciones clínicas de la Discinesia Ciliar Primaria (adaptada de Fermeiro et al., 2010 y Leigh et al., 2009).....	4
Tabla II. Genes responsables de la DCP clasificados en función de la ultraestructura detectada. (Reula et al., 2017).....	6
Tabla III. Cantidades de medio requeridas para el mantenimiento durante siete días del cultivo fresco de células epiteliales nasales (Adaptada de Martens et al., 2019).	12
Tabla IV. Listado de genes analizados en la PCR cuantitativa y su función (Información adaptada de GeneCards, Database, G. H. G. 1996–2021).	15
Tabla V. Contaje realizado en la cámara Neubauer para determinar la eficacia de la descongelación de las células HNEC.....	18
Tabla VI. Cuantificación de ARN en Nanodrop 2000@espectrofotómetro en cada una de las diferentes etapas del cultivo en interfaz aire-líquido.....	24

ÍNDICE DE ECUACIONES

Ecuación I. Conteo en la cámara Neubauer. Número de células correspondientes a un mililitro de células descongeladas.....	19
Ecuación II. Cálculo de ΔCT	26
Ecuación III. Cálculo de $\Delta\Delta CT$	26
Ecuación IV. Cálculo de los niveles de expresión de cada gen en cada fase del cultivo.....	26

ABREVIATURAS

Δ: Variación	GCLM: Subunidad modificadora de glutamato-cisteína ligasa
·O₂-: Oxígeno radical	GPX1: Glutación Peroxidasa 1
ADN: Ácido desoxirribonucleico	GSH: Glutación reducido
ARN: Ácido ribonucleico	GSR: Glutación-disulfuro reductasa
ALI: Interfaz Aire-Líquido	GSSG: Disulfuro de glutación oxidado
AK7: Adenilato quinasa 7	GUSB: Glucuronidasa Beta
ARNT: Translocador nuclear del receptor de hidrocarburos arilo	H2O2: Peróxido de hidrógeno
ARNT2: Translocador nuclear 2 del receptor de hidrocarburos arilo	HCUV: Hospital Clínico Universitario de Valencia
ARNTL: Translocador nuclear del receptor de hidrocarburos de arilo	HNEC: Células humanas del epitelio nasal
ATPasas: Adenosintrifosfatasas	HIF1A: Factor inducible por hipoxia, subunidad alfa
B2M: Beta-2-Microglobulina	HRE: Elementos de respuesta a hipoxia
BCL2: BCL2 regulador de apoptosis	ICSI: Inyección intracitoplasmática de espermatozoides
BSA: Albúmina de Suero Bovino	IDA: Brazos de dineína internos
C°: Grados centígrados	INCLIVA: Fundación para la Investigación del Hospital Clínico de la Comunidad Valenciana INCLIVA
CAT: Catalasa	NFE2L2: Factor nuclear, eritroide 2
cDNA: ADN complementario	NOS1: Óxido nítrico sintasa 1
CEIm: Comité Ético de Investigación con Medicamentos	NOS2: Óxido nítrico sintasa 2
CO2: Dióxido de Carbono	NOS3: Óxido nítrico sintasa 3
Ct: Umbral del ciclo	ODA: Brazos de dineína externos.
DCP: Discinesia Ciliar Primaria	ON: Óxido nítrico
DMSO: Dimetilsulfóxido	ONOO-: Peroxinitrito
EO: Estrés oxidativo	P12: Placa de 12 pocillos
EPAS1: Proteína del dominio PAS endotelial 1	P348: Placa de 384 pocillos
EPOC: Enfermedad pulmonar obstructiva crónica	PBS: Tampón fosfato salino
ERR: Enfermedades Raras Respiratorias	qPCR: PCR cuantitativa
Ex-P: Medio Pneumacult-Ex Plus	ROS: Especies reactivas de oxígeno
Ex-P ++: Medio Pneumacult Ex Plus ++	RPL13A: Proteína Ribosomal L13a
FBC: Frecuencia del batido ciliar.	SOD: Superóxido Dismutasa
FBS: Suero Fetal Bovino	SOD1: Superóxido Dismutasa 1
G: Fuerza centrífuga relativa	SOD2: Superóxido Dismutasa 2
GADPH: Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa	T12: Frasco de 12 cm2
GCLC: Subunidad catalítica de glutamato-cisteína ligasa	T25: Frasco de 25 cm2
	TERT: Telomerasa transcriptasa reversa

1.INTRODUCCIÓN

La Discinesia Ciliar Primaria (DCP) es un término que abarca aquellas enfermedades que ocurren como resultado de un defecto congénito en los cilios. Incluyendo enfermedades como el síndrome de Kartagener o defectos en la orientación, inmovilidad o coordinación de los cilios (Meeks & Bush, 2000).

1.1. CILIOS: ESTRUCTURA Y FUNCIÓN

Los cilios son estructuras conservadas evolutivamente que tienen un papel clave en muchos tipos celulares desde el punto de vista biológico. Son orgánulos muy complejos, que se presentan como proyecciones en la superficie de la célula, rodeados por una membrana y algunos tipos presentan función motora (Meeks & Bush, 2000).

Estructuralmente, los cilios móviles se dividen en subcompartimentos: cuerpo basal, el cual ancla el cilio a la célula (Popatia *et al.*, 2014), la zona de transición, el axonema, la membrana ciliar y la punta ciliar (Fliegau *et al.*, 2007).

El núcleo del axonema se encuentra conservado en los cilios móviles y consiste en nueve dobletes de microtúbulos periféricos rodeando un par central de microtúbulos internos (9+2). Los dobletes microtubulares están constituidos por heterodímeros de alfa y beta tubulina, ensamblados en los 13 protofilamentos del túbulo A y 11 protofilamentos del túbulo B, mientras que el par central, orientado con respecto al par central de cilios adyacentes, está constituido por 13 protofilamentos de tubulina. Los pares de microtúbulos periféricos están conectados entre sí mediante enlaces de nexina. A su vez, unos brazos radiales permiten la unión de la vaina proteica que rodea a los microtúbulos centrales con el microtúbulo A de cada par periférico.

Así mismo, cada doblete periférico tiene asociado dos brazos de dineína, clasificados como brazos de dineína internos (IDA), cuya función es influir en la forma de la onda del latido, y brazos de dineína externos (ODA), que influyen en la frecuencia del latido (Meeks & Bush, 2000). Las adenosintrifosfatasas (ATPasas) están conectadas con estos brazos de dineína, y generan movimiento mediante la hidrólisis del ATP, promoviendo el deslizamiento de los microtúbulos. Mientras que las espinas radiales son las que determinan la dirección de este movimiento. La figura 1 muestra un esquema representativo de esta estructura del axonema de un cilio 9+2 (Popatia *et al.*, 2014).

Estos cilios móviles (9+2), cuya función principal es la de impulsar las células a través del líquido o mover el fluido sobre la superficie de células, están localizados en el epitelio respiratorio tanto inferior como superior, en el epéndimo (delgado revestimiento neuroepitelial del sistema ventricular del cerebro y el canal central de la médula espinal) y en el aparato reproductor masculino y femenino, pero existen excepciones en las que esta estructura no presenta movilidad, como es el caso de los *kinocilium* y *stereocilia* del oído interno.

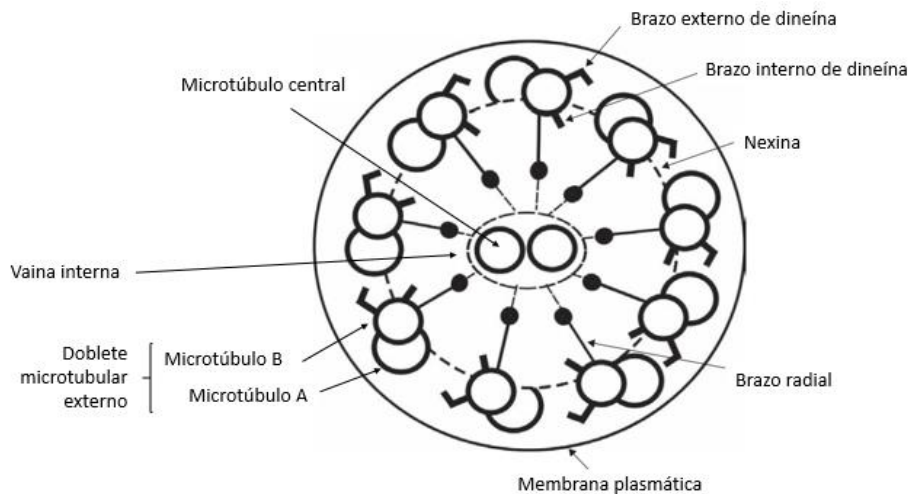


Figura 1. Esquema representativo de un corte transversal del tallo o axonema de un cilio con estructura 9+2. (Adaptada de Djakow, J., & O'Callaghan, C. (2014). Primary ciliary dyskinesia. *Breathe*, 10(2), 122–133. doi:10.1183/20734735.007413).

Por otro lado, tenemos los cilios primarios o sensoriales, que presentan una disposición 9+0, caracterizados por no presentar brazos de dineína y se clasifican como cilios inmóviles. Estos generalmente están localizados en estructuras como riñón, páncreas, ojo, huesos/cartílago o conducto biliar, pero en algunos casos como es el de los cilios nodales del embrión, carece de los microtúbulos centrales, pero tienen brazos de dineína, por lo que presentan movimiento (Fliegau *et al.*, 2007).

En condiciones normales, la frecuencia del batido ciliar (FBC) oscila entre 8 y 20 Hz, siendo esta variable dependiente del espesor del moco en el área traqueobronquial. La FBC genera un movimiento que se caracteriza por ser sincrónico y controlado.

Alteraciones en los cilios conllevan a diversos tipos de enfermedades conocidas en su conjunto como ciliopatías, que presentan características fenotípicas similares. Entre las ciliopatías encontramos enfermedades tan diversas como la poliquistosis renal, la hidrocefalia o la DCP.

Las principales causas de la DCP se les atribuye a anomalías en la estructura de los cilios o alteraciones en su orientación. Los defectos genéticos a nivel de la dineína pueden ocurrir tanto en los brazos externos como internos, generando un patrón de movimiento anormal o inmovilidad. También hay pacientes con DCP que muestran alteración en la frecuencia del batido ciliar, lo que puede causar estasis de las mucosas respiratorias (Meeks & Bush, 2000; Eley *et al.*, 2005; Toriello & Parisi 2009; Satir & Christensen 2008).

En general, las alteraciones moleculares detectadas en diferentes manifestaciones de cilios inmóviles son: ausencia o disminución del número de brazos internos y/o externos de dineína como se muestra en la Figura 2, brazos de dineína más cortos, ausencia o acortamiento de los brazos radiales o puentes de nexina, ausencia de microtúbulos centrales, e incluso ausencia de cuerpos basales y cilios, o presencia de cuerpos basales, pero sin muestra de crecimiento de cilios. En algunos casos, los cilios presentan una ultraestructura normal, pero éstos son incapaces de realizar el movimiento (Afzelius *et al.*, 2004).

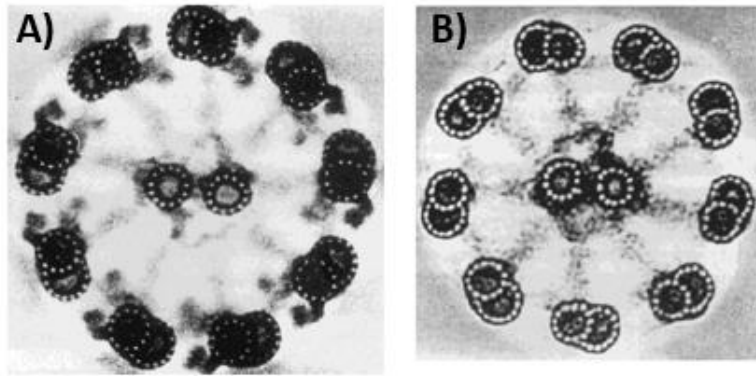


Figura 2.(A) Corte transversal del axonema de un individuo sano (B) Corte transversal del axonema de un paciente con Discinesia Ciliar Primaria, en el que se muestra la ausencia total de los brazos de dineína (Meeks & Bush, 2000).

1.2. HISTORIA DE LA DISCINESIA CILIAR PRIMARIA

La enfermedad fue caracterizada en 1904 por Siewert, y posteriormente en 1933 fue descrita de nuevo por Kartagener. Este describió la asociación entre pacientes que presentaban la triada de sinusitis, bronquiectasias y *situs inversus*, conocida como síndrome de Kartagener.

Con los avances en la microscopía electrónica en la década de 1970, Afzelius describió anomalías, principalmente la ausencia de brazos de dineína, en espermatozoides de pacientes que presentaban un cuadro clínico de esperma inmóvil, bronquitis crónica y bronquiectasias. Pero a pesar de que la mayoría de estos casos clínicos eran compatibles con el síndrome de Kartagener, no presentaban *situs inversus*, por tanto, para definir estas anomalías estructurales se propuso el término "síndrome de cilios inmóviles" (Afzelius, 1985).

Posteriormente, se demostró que este síndrome podía ser causado por muchos otros cambios ultraestructurales diferentes en los cilios, incluso se llegó a observar alteración funcional sin presencia de deformidad ultraestructural. Por tanto, surgió la necesidad de acuñar un nuevo término, conocido como "Discinesia Ciliar Primaria", para referirse no sólo a la existencia de cilios inmóviles, sino también al movimiento discinético o ineficiente de los cilios.

Por tanto, los síndromes conocidos previamente como el Síndrome de Kartagener y el Síndrome del cilio inmóvil, pasaron a formar parte de la DCP, puesto que se ha visto que la descoordinación del movimiento ciliar es mucho más prevalente que la inmovilidad ciliar.

Adicionalmente, surge un nuevo término "Discinesia ciliar secundaria", asociada a infecciones bacterianas o virales, tabaco o inhalación de fármacos que provocan esta alteración en el transporte mucociliar, a diferencia de la DCP que se refiere a la condición hereditaria y permanente que causa defectos ultraestructurales en los cilios (Popatia et al., 2014; Rossman & NewHouse, 1988; Napolitano *et al.*, 2002).

1.3. DCP: EPIDEMIOLOGÍA Y MANIFESTACIONES CLÍNICAS

La DCP es un trastorno congénito que causa alteraciones en la ultraestructura de los cilios, produciendo, por tanto, anomalías en el batido ciliar. Se trata de una enfermedad rara con una prevalencia estimada de 1/20.000 personas.

Esta enfermedad se encuentra infradiagnosticada y presenta un diagnóstico tardío a pesar de la aparición de síntomas tempranos, ya que muy pocos centros tienen las instalaciones necesarias para el diagnóstico preciso de esta condición, siendo la edad media de diagnóstico de unos 5,3 años. Aun así, tanto el diagnóstico como la prevalencia de la enfermedad presentan una gran variabilidad entre los diferentes países (Lucas *et al.*, 2014). La edad media de diagnóstico se ve disminuida a 3,5 años si los pacientes tienen asociado *situs inversus*, el llamado síndrome de Kartagener, una manifestación clínica presente en aproximadamente el 50% de pacientes con DCP (Rovira S, 2011).

La DCP muestra manifestaciones clínicas desde edades muy tempranas. Sin embargo, comparte sintomatología con otras enfermedades prevalentes en la infancia, hecho que resalta la confusión en el diagnóstico. Como se muestra en la Tabla 1, estas manifestaciones afectan a todos los órganos en los cuales los cilios están presentes de manera crónica en el paciente, y no tan solo de forma transitoria.

El 70-80% de pacientes muestran dificultad respiratoria en el período neonatal, sugiriendo la relación entre los cilios y la eliminación eficaz del líquido pulmonar fetal. Así mismo, otras características como la rinitis persistente y la tos crónica se muestran desde la infancia. (Escribano & Armengot, 2013)

Como ya hemos nombrado anteriormente, los defectos en la lateralidad izquierda-derecha (*situs inversus*) son otro rasgo fenotípico clásico con una manifestación superior al 60% en infantes y 50% en adultos (Leigh *et al.*, 2009).

Tabla 1. Manifestaciones clínicas de la Discinesia Ciliar Primaria (adaptada de Fermeiro *et al.*, 2010 y Leigh *et al.*, 2009)

Pulmón <ul style="list-style-type: none">● Dificultad respiratoria, neumonía, atelectasia (período neonatal)● Tos crónica● Broncorrea● Episodios recurrentes de neumonía● Asma bronquial grave y/o atípico, sin respuesta a la terapia convencional● Bronquiectasias● Hipocratismo digital (Clubbing)	Lateralización de órganos <ul style="list-style-type: none">● Situs inversus total● Heterotaxis (anomalías cardiovasculares congénitas)<ul style="list-style-type: none">- isomería izquierda (poliesplenía)- isomería derecha (asplenia)
Oído medio <ul style="list-style-type: none">● Otitis media serosa crónica● Pérdida auditiva de transmisión● Otorrea persistente después de timpanostomía	Tracto genitourinario <ul style="list-style-type: none">● Infertilidad masculina● Disminución de la fertilidad femenina y el embarazo ectópico

Senos paranasales y fosas nasales	Enfermedades asociadas
<ul style="list-style-type: none"> ● Rinosinusitis y pansinusitis crónica ● Poliposis nasal ● Rinorrea mucopurulenta continua (comenzando en el neonatal) ● Congestión nasal crónica y rinitis mucopurulenta 	<ul style="list-style-type: none"> ● Cardiopatía congénita compleja ● Enfermedad poliquística renal y/o hepática ● Atresia biliar ● Atresia esofágica ● Reflujo gastroesofágico severo ● Hidrocefalia (Sistema nervioso central) ● Retinitis pigmentosa (Ojo)

1.4. DCP: GENÉTICA DE LA ENFERMEDAD

Existen una gran cantidad de mutaciones genéticas involucradas en el desarrollo de la DCP y la mayoría se heredan siguiendo una herencia autosómica recesiva, lo que la convierte en un trastorno heterogéneo. Pero también se han descrito otros modos de transmisión ligados al cromosoma X, donde se combina la DCP con retinosis pigmentosa en varones (Hornef *et al.*, 2006).

Las principales funciones de las proteínas codificadas por estos genes mutados en la DCP son ensamblaje o preensamblaje ciliar y función axonémica.

La organización de las mutaciones está basada en la ultraestructura detectada, siendo las identificadas en el axonema las de más fácil detección mediante microscopía electrónica (Tabla 2). Existen alrededor de 50 mutaciones (Lucas *et al.*, 2020) en genes asociadas a la DCP, por lo que las pruebas de diagnóstico genético han adquirido un papel importante, puesto que el 65% de los pacientes presentan mutaciones en alguno de estos genes.

Mutaciones en 10 de estos genes causan deficiencia de ODA, generando un fenotipo de cilios inmóviles o hipocinéticos, ya que estos genes codifican para las proteínas ODA o el complejo asociado a ODA. En cambio, alteraciones en la ultraestructura que generan la deficiencia o ausencia combinada de ODA y/o IDA, es producida por mutaciones en 11 de estos genes, que son los que codifican para proteínas citoplasmáticas implicadas, en los axonemas, del transporte y ensamblaje de los brazos de dineína en los cilios. Algunas de las mutaciones son producidas de forma puntual, como ocurre en 13 de estos genes, asociados al par central, brazos radiales y microtúbulos centrales y a la ciliogénesis, en los cuales las mutaciones están relacionadas con un menor número de cilios móviles. Asimismo, se han determinado mutaciones que afectan al adenilato quinasa 7 (AK7), que se trata de una proteína reguladora de energía (Horani *et al.*, 2016; Reula *et al.*, 2017).

Tabla 2. Genes responsables de la DCP clasificados en función de la ultraestructura detectada. (Reula et al., 2017)

Defectos en ODA	Defectos en ODA e IDA	Mutaciones puntuales
DNAH5 [MIM 603335] DNAH11 [MIM 603339] CCDC114 [MIM 615038] TTC25 [MIM 617095] DNAL1 [MIM 610062] DNAI1 [MIM 604366] DNAI2 [MIM 605483] NME8 [MIM 607421] ARMC4 [MIM 615408] CCDC151 [MIM 615956]	SPAG1 [MIM 603395] DNAAF1 [MIM 613190] DNAAF2 [MIM 612517] DNAAF3 [MIM 614566] HEATR2 [MIM 614864] DYX1C1 [MIM 608706] ZMYND10 [MIM 607070] DNAH1 [MIM 603332] LRRC6 [MIM 614930] CCDC103 [MIM 614677] C21orf59 [MIM 615494]	CCDC39 [MIM 613798] CCDC40 [MIM 613799] CCDC65 [MIM 611088] CCDC164 [MIM 615288] GAS8 [616726] RSPH1 [MIM 609314] RSPH4A [MIM 612647] RSPH3 [MIN 616481] DNAJB13 [MIM 610263] RSPH9 [MIM 612648] HYDIN [MIM 610812] CCNO [MIM 615872] MCIDAS [MIM 614086]

De todas las mutaciones, aquellas producidas en los genes CCNO (necesario para la producción de los centriolos) y RSPH, son localizadas mediante pruebas de diagnóstico genético debido a la dificultad de su detección mediante el uso de otros métodos. Las mutaciones de mayor prevalencia son DNAI1 y DNAH5, que se estiman responsables del 30% de los casos de DCP (Horani *et al.*, 2016).

1.5. DCP: PRONÓSTICO Y TRATAMIENTO

Un buen pronóstico para el paciente depende de un diagnóstico temprano de la enfermedad y de la aplicación del tratamiento adecuado. Por ello se requiere de un equipo multidisciplinar para llevar a cabo tanto el diagnóstico como el seguimiento de los pacientes. Aun así, la esperanza de vida es similar a la de un individuo sano, y tan solo se ve levemente reducida en los pacientes con DCP.

En algunos casos se pueden mostrar complicaciones porque, aunque el deterioro de la función pulmonar suele ser más lento en comparación con otras enfermedades similares como es el caso de la fibrosis quística, hay algunos pacientes que muestran una afectación pulmonar grave. Asimismo, pueden aparecer otras complicaciones como es el caso de infecciones óticas o sinusales. Todo esto, depende de los defectos en la ultraestructura ciliar, siendo los pacientes de peor pronóstico los que presentan alteraciones en los microtúbulos. Por todas estas complicaciones, es necesario llevar a cabo un seguimiento continuo (Romero *et al.*, 2017).

Para evitar morbilidades, se recomienda ejercicio físico, evitar el tabaco y, en general, llevar un estilo de vida saludable. En combinación con lo anterior, el uso de antibióticos previene la aparición de enfermedades respiratorias.

En cuanto al tratamiento de la DCP, se recomienda la fisioterapia respiratoria para mejorar la ventilación pulmonar y el drenaje de las vías respiratorias o la monitorización frecuente de la función auditiva. Adicionalmente, es conveniente llevar a cabo un control

frente a las infecciones que pueden surgir en los pacientes. Existen estudios que proponen un tratamiento agresivo con antibióticos para mejorar el aclaramiento mucociliar y, de esta forma, minimizar la aparición de enfermedades respiratorias (Iñiguez *et al.*, 2007; Escribano & Armengot, 2013). En los casos más graves, un trasplante de pulmón puede ser la única vía que tienen estos pacientes para mejorar su calidad de vida.

Por último, destacar la importancia del consejo genético, puesto que se trata de una enfermedad hereditaria y, por tanto, se podría transmitir a la descendencia en aquellos pacientes con DCP que quieren tener hijos. Lo más recomendado en casos de varones con espermatozoides inmóviles, sería realizar inyecciones intracitoplasmáticas (ICSI) o fecundación *in vitro*, técnica que también facilita el embarazo a mujeres con DCP con fertilidad reducida (Lin *et al.*, 1998; Armengot *et al.*, 2009).

1.6. CULTIVO EN INTERFAZ AIRE-LÍQUIDO

Actualmente existen líneas celulares humanas de pulmón que crecen en cultivo monocapa como las A549 y NCI-H29 (Morier *et al.*, 1996). Estas resultan un modelo celular con muchas limitaciones, puesto que no imitan la estructura común de las células pulmonares ni se diferencian a células ciliadas. Por ello, actualmente se emplean organoides, que son agregados de células cultivadas en tres dimensiones. Estas estructuras permiten imitar las condiciones y complejidad celular, reproduciendo así un órgano en miniatura (Bourguignon *et al.*, 2020). Los organoides presentan múltiples aplicaciones, empleándose en diversos tejidos como organoides cerebrales (Dang *et al.*, 2021), de riñón (Zeng *et al.*, 2021) o de corazón (Lee *et al.*, 2020; Drakhlis *et al.*, 2021).

El cultivo de las células humanas epiteliales nasales (HNEC) o la línea celular inmortalizada de células epiteliales basales de las vías respiratorias BCI-NS1.1 (Walters *et al.*, 2013) permite imitar las condiciones fisiológicas del epitelio nasal mediante el uso del cultivo interfaz Aire-Líquido (ALI), y lograr así el epitelio pseudoestratificado pulmonar. Los cultivos de interfaz aire-líquido se han convertido en el modelo básico de estudio para los epitelios de las vías respiratorias y pacientes con enfermedades crónicas respiratorias (Ghosh *et al.*, 2020). Puesto que generan poblaciones similares a lo que se observa *in vivo*. La obtención de HNEC presenta algunas ventajas como la menor invasividad y la permisión múltiple de las biopsias en el paciente, sin generar efectos secundarios (Müller *et al.*, 2013).

El cultivo ALI se utiliza como modelo no solo para las células epiteliales nasales, sino para otros tejidos como el epitelial del aparato reproductor femenino o los epitelios que se originan en la mucosa intestinal (Chen & Schoen, 2019). También es utilizado para estudios de toxicidad, debido a que presenta reacciones fisiológicas similares a las patológicas *in vivo* (Mathis *et al.*, 2013).

1.7. PERFIL OXIDATIVO

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) son moléculas que se generan a partir del metabolismo celular, y desempeñan un papel fisiológico muy importante en la señalización celular actuando como mensajeros tanto inter como intracelularmente, mantenimiento del potencial redox e incluso protegen frente al estrés oxidativo mediante

un mantenimiento de la homeostasis celular y modulación de la actividad enzimática celular (Lee & Yang, 2012; Rahman *et al.*, 2012).

Sin embargo, una sobreproducción de ROS puede alterar el equilibrio oxidante-antioxidante, provocando una acumulación de ROS que conduce a un metabolismo anómalo celular, lo que causa daños en la estructura de macromoléculas como proteínas, lípidos y especialmente ácidos nucleicos. (Barzilai & Yamamoto, 2004). Estos daños pueden llegar a generar atrofia en los órganos debido al aumento de la muerte celular (Ogura & Shimosawa, 2014).

Asimismo, estas moléculas no son tan solo generadas a partir del metabolismo celular, sino que agentes externos como la radiación ionizante o ultravioleta, xenobióticos como los pesticidas, medicamentos como el tacrolimus, tabaco (Domej *et al.*, 2014), la contaminación ambiental y los metales pesados, también contribuyen al incremento de ROS como los radicales libres, que dan lugar al desbalance en el equilibrio oxidante-antioxidante (Pizzino *et al.*, 2017), produciendo un estado de estrés oxidativo (EO). Tanto la muerte celular como el envejecimiento tienen un papel crucial en el EO (Luo *et al.*, 2020).

Una miríada de patologías se ven afectadas de una u otra forma por el EO y encontramos estudios en enfermedades tan dispares como en Alzheimer (Radi *et al.*, 2014; Tönnies & Trushina, 2017), la infertilidad masculina (Bisht *et al.*, 2017), diabetes (Yaribeygi *et al.*, 2020) o las enfermedades respiratorias como el asma o la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) (Pizzino *et al.*, 2017).

Centrándonos en los casos concretos de las enfermedades raras respiratorias, en el Déficit de Alfa-1-Antitripsina se muestra un aumento del estrés oxidativo generado por un déficit en moléculas antioxidantes, como son la catalasa o el glutatión (Escribano *et al.*, 2015) y en la DCP, la enfermedad de interés de esta investigación, varios estudios han demostrado que los niveles de óxido nítrico (ON) se ven significativamente reducidos en comparación con individuos sanos (Leigh *et al.*, 2013).

Estas moléculas antioxidantes desempeñan un papel esencial en la fisiología celular, ya que son capaces de metabolizar las ROS. Es el caso, por ejemplo, de la superóxido dismutasa (SOD), enzima que cataliza la dismutación del anión superóxido (mayor precursor de ROS) en peróxido de hidrógeno (H_2O_2). A su vez, este H_2O_2 es eliminado por las enzimas catalasa y glutatión peroxidasa, convirtiéndola en agua y oxígeno (Pamplona *et al.*, 2011).

En el caso del óxido nítrico, este genera peroxinitrito ($ONOO^-$), que es un oxidante muy potente que afecta a las funciones mitocondriales, mediante la reacción con el anión superóxido. El $ONOO^-$ es reducido por acción de reductores mitocondriales, entre ellos el glutatión (GSH), principal molécula antioxidante celular (Sies H *et al.*, 1997 2017).

Por tanto, utilizando las técnicas como el cultivo ALI, que permite imitar las condiciones fisiológicas del epitelio nasal ciliado en mayor grado que los cultivos tradicionales, podremos tener un mejor entendimiento del papel del EO en la fisiopatología de la enfermedad, una de las claves para dilucidar la existencia de heterogeneidad en la sintomatología de la DCP.

2.OBJETIVOS

El problema de la DCP es que se trata de una enfermedad infradiagnosticada, puesto que muchos pacientes presentan la enfermedad, pero manifiestan una sintomatología similar a otras enfermedades respiratorias.

Actualmente, en la literatura disponible no existen resultados que indiquen cómo cambia la expresión de los genes de las enzimas antioxidantes en las distintas fases del cultivo ALI.

Por todo lo expuesto anteriormente, los principales objetivos de este estudio de investigación son:

- Puesta a punto de un cultivo ALI a partir de células del epitelio nasal ciliado humano para su uso como modelo de estudio en la DCP.
- Determinar, mediante RT-qPCR, la expresión de los genes que codifican para las diferentes enzimas del sistema antioxidante celular en las diferentes fases del cultivo ALI.
- Determinar la viabilidad de la transfección de las células del epitelio nasal para sentar la base de futuros experimentos.

3.MATERIAL Y MÉTODOS

Este proyecto ha sido desarrollado en La Fundación para la Investigación del Hospital Clínico de la Comunidad Valenciana (INCLIVA), en el laboratorio de Enfermedades Raras Respiratorias (ERR) dirigido por el Dr. Francisco Dasí Fernández.

Asimismo, ha sido aprobado por el Comité Ético de Investigación con Medicamentos (CEIm) del Hospital Clínico Universitario de Valencia (HCUV), organismo responsable de evaluar la legalidad, ética y metodología empleada en todos los proyectos de investigación, ajustándose a la legalidad vigente.

Para llevar a cabo la puesta a punto del cultivo Interfaz Aire-Líquido se ha seguido el protocolo utilizado por la Universidad Médica de Viena, en el Instituto Karolinska con algunas modificaciones (Martens *et al.*, 2019).

Este cultivo permite observar cómo se comportan las células del epitelio nasal ciliado en un ambiente lo más similar al fisiológico. Para ello, las células epiteliales se siembran sobre una cestilla de colágeno Transwell, que permite el contacto de las células con el medio de cultivo. El soporte filtrante poroso permite la separación de un compartimento apical y otro basal que conforman el sistema de cultivo, tal y como se muestra en la Figura 3. En primer lugar, tiene lugar la pérdida de los cilios y posteriormente las células son sembradas en la cestilla y adquieren la capacidad de adherirse y proliferar sobre la membrana, teniendo lugar la formación de una monocapa celular. Una vez se alcanza la confluencia, el medio de la superficie apical es eliminado, para que tenga lugar la diferenciación de las células, manteniendo el contacto con los nutrientes a través de la membrana porosa. En esta fase del cultivo, se pueden observar células productoras de moco, células epiteliales nasales y células multiciliadas. De tal forma que una vez ha tenido lugar la diferenciación, las células epiteliales con fenotipo mucociliar segregan líquido mucoso en la superficie apical.

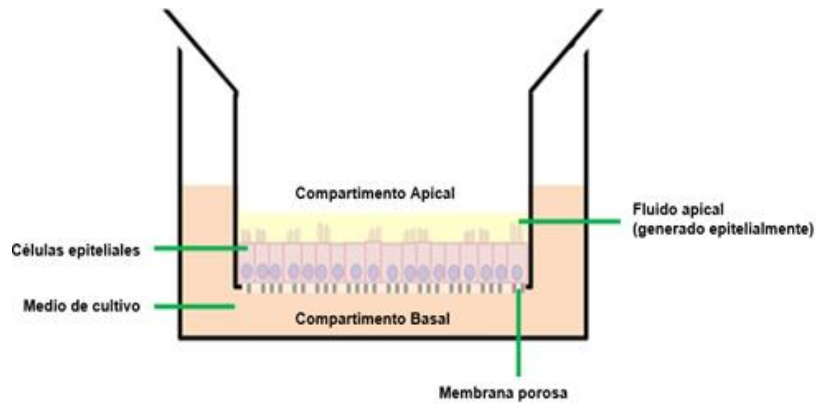


Figura 3. Esquema representativo en sección transversal del cultivo Interfaz Aire-Líquido (ALI) para células epiteliales de fenotipo mucociliar (Adaptada de Chen & Schoen 2019).

3.1. POBLACIÓN DE ESTUDIO

Las muestras han sido tomadas de un paciente sano, no fumador. Sin clínica respiratoria bronquial, enfermedad local o sistémica, alergias o rinosinusitis.

3.2. TOMA DE MUESTRAS

Este cultivo comienza con el raspado del cornete nasal medio, que es el área con mayor densidad de células ciliadas, mediante el uso de un cepillo de citología (Cooper Surgical) tal y como se muestra en la Figura 4. Para ello, previamente, el paciente debe sonarse la nariz para evitar la acumulación de moco en el cepillo y así maximizar la limpieza de la muestra. El paciente debe colocarse en un ángulo de 30° para facilitar la entrada del cepillo por el orificio nasal.

Para la extracción de las HNEC, se introdujo un cepillo de citología diferente en cada una de las fosas nasales y se realizó una rotación suave para favorecer el despegue de las células epiteliales evitando, a su vez, la rotura de algún vaso sanguíneo, puesto que esto produce la aparición de células sanguíneas no deseadas.

Ambos cepillos de citología fueron introducidos en un tubo Falcon cónico de 15 ml (Fisher Scientific), que contenía 8 ml del medio de transporte, preparado añadiendo al medio RPMI 1640 que contiene L-Glutamina (Gibco), un 1% de Antibiótico Antimicótico (Gibco, 15240062) por lo que se adicionaron 80 µl, y un 0.1% de Gentamicina (50 mg/ml) (Gibco), por lo que se añadieron 8 µl, completándose con el medio RPMI hasta alcanzar el volumen de 8 ml.

Una vez se encontraban en el Falcon con el medio de transporte, se procedió a despegar todas las células y el moco que contenían los cepillos, mediante una agitación suave. Una vez recogidas todas las células, se retiró los cepillos del tubo, y éste se mantuvo en hielo.

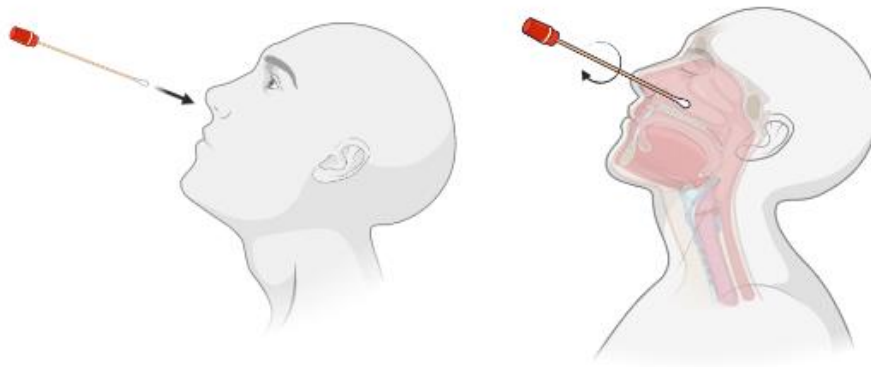


Figura 4.Proceso utilizado para la recogida de células epiteliales nasales humanas del cornete nasal medio, utilizando un cepillo de citología.

3.3. CULTIVO: DÍA 0

El tubo de 15 ml que contenía las células se centrifugó en una centrífuga 5810 (Eppendorf) a 400xg durante 5 minutos, a una temperatura de 4°C. El sobrenadante fue descartado, y el pellet obtenido fue resuspendido en 1 ml de medio PneumaCult-Ex Plus (Ex-P) (Stemcell).

Tras esto, se volvió a centrifugar en las mismas condiciones anteriores, y el pellet resultante se sembró en un pocillo de una placa de 12 (P12) (Corning).

Este pocillo y los adyacentes habían sido previamente colagenados utilizando 500 µl de tampón de colagenado que contenía 5% de Albúmina de Suero Bovino (BSA, Sigma), 1% de PureCol 1:100 (AdvancedBioMatrix) por pocillo y, tras una incubación de 30 minutos a 37°C y 5% CO₂ (Incubador marca Sanyo modelo MCO-19AIC (UV)), se eliminó el tampón y se lavó con PBS.

El pellet resuspendido se introdujo en el primer pocillo colagenado, en este caso como la muestra se trata de HNEC de adulto, aproximadamente la mitad del pellet introducido en el primer pocillo se traspasó al segundo pocillo, mientras que el tercer pocillo quedó vacío. A los dos primeros que contenían las células se les añadió 90 µl de medio Pneumacult Ex Plus ++ (Ex-P ++) (Stemcell), y transcurridas dos horas se les adicionó 50 µl más de medio Ex-P ++. Al utilizarse un volumen tan pequeño de medio forzamos a las células a estar en contacto con el fondo del pocillo, favoreciendo así su adhesión, pero nos surge el inconveniente de la evaporación del medio del pocillo. Para minimizar esto se adicionaron 500 µl de PBS en todos los pocillos sin colágeno.

El medio Ex-P se preparó, con 2% de suplemento 50x del medio (Stemcell), 0,1% de Hidrocortisona (Stemcell), 1% de Antibiótico Antimicótico y 0,1% de Gentamicina. Para preparar el medio Ex-P ++, se toma medio Ex-P, al que se le agrega 5% de suero fetal bovino (FBS, Biowest) y bicarbonato sódico al 2% (Gibco).

3.4. CULTIVO: DÍA 1

Tras 24 horas de cultivo, se analizó la morfología y crecimiento de las células, principalmente en busca de contaminación y para determinar si se habían adherido a la placa.

El medio que se encontraba en el primer y segundo pocillo fue aspirado, se transfirió a un tubo *ependorf* (Eppendorf) y se centrifugó a 400xg durante 5 min a una temperatura de 4°C. El pellet que se obtuvo de esta centrifugación fue resuspendido en 90 µl de medio Ex-P ++, y cultivado en el tercer pocillo de la placa P12, que había sido colagenado el día anterior. Transcurridas dos horas, se adicionaron al igual que en el día 0 de cultivo, 50 µl más de medio.

Paralelamente, se agregaron 250 µl de medio Ex-P y 250 µl de medio Ex-P ++ tanto en el pocillo 1 como en el pocillo 2.

3.5. CULTIVO: MANTENIMIENTO (DÍAS 2-7)

Hay que observar constantemente al microscopio (Microscopio invertido Nikon Eclipse modelo TS100, cámara Moticam 2500 5.0 Mpixel y software de adquisición de imágenes Motic Images Plus) la expansión y adherencia de las células en los pocillos. Para el mantenimiento de las células antes de traspasarlas, se requieren siete días de cultivo, en los que van variando las cantidades de medio a adicionar, recogidas en la Tabla 3. Una vez alcanzan la confluencia aproximadamente al 70 o 80%, es cuando las células son traspasadas a un frasco de 25 cm² (T25) (TPP).

Para el mantenimiento de las HNEC el medio Ex-P fue modificado, puesto que se completó con 50mg/L de gentamicina, para evitar la contaminación.

Tabla 3. Cantidades de medio requeridas para el mantenimiento durante siete días del cultivo fresco de células epiteliales nasales (Adaptada de Martens et al., 2019).

	Pocillo 1	Pocillo 2	Pocillo 3
Día 1	-	-	250 µl Ex-P y 250 µl Ex-P ++
Día 2	250 µl Ex-P y 250 µl Ex-P ++	250 µl Ex-P y 250 µl Ex-P ++	250 µl Ex-P y 250 µl Ex-P ++
Día 3	375 µl Ex-P y 125 µl Ex-P ++	375 µl Ex-P y 125 µl Ex-P ++	375 µl Ex-P y 125 µl Ex-P ++
Día 4	427µl Ex-P y 73 µl Ex-P ++	427µl Ex-P y 73 µl Ex-P ++	427µl Ex-P y 73 µl Ex-P ++
Día 5	427µl Ex-P y 73 µl Ex-P ++	427µl Ex-P y 73 µl Ex-P ++	427µl Ex-P y 73 µl Ex-P ++
Día 6	427µl Ex-P y 73 µl Ex-P ++	427µl Ex-P y 73 µl Ex-P ++	427µl Ex-P y 73 µl Ex-P ++
Día 7	427µl Ex-P y 73 µl Ex-P ++	427µl Ex-P y 73 µl Ex-P ++	427µl Ex-P y 73 µl Ex-P ++

3.6. CULTIVO: EXPANSIÓN

Una vez alcanzada la confluencia deseada, las células pueden ser traspasadas a frascos de un mayor tamaño para favorecer su expansión. Las células del pocillo 1 fueron traspasadas a un frasco T25 debido a su mayor confluencia, en cambio las del pocillo 2 fueron traspasadas a un frasco de 12 cm² (T12) (Deltalab).

Al igual que para el cultivo del día cero, se han de colagenar los frascos durante 30 minutos utilizando 3 ml de tampón de colagenado en el T25 y 1.5 ml en el T12, y posteriormente fueron lavados con PBS.

Se tripsinizan las células mediante la técnica de la doble tripsinización. Para ello se añadieron 500 µl de Tripsina-EDTA al 0.05% (Gibco) calentada a 37°C en el baño (Selecta) y se dejó actuar durante 3 minutos, se lavó y se volvió a añadir tripsina fresca durante máximo 2 minutos para evitar el daño celular. La tripsina se inhibe con medio RPMI 1640 suplementado con suero al 10% en un ratio tripsina:medio de cultivo 1:1. Se centrifugó a 400xg, 5 minutos, 4°C y pellet fue resuspendido con 500 µl de medio y se sembró en frascos.

En el caso en que existan diferencias en la confluencia, se utilizarán frascos con diferentes superficies o se mantendrá el cultivo en la placa. El pellet resuspendido correspondiente al pocillo 1 se cultivó en el frasco T25 con 3 ml de medio Ex-P, y el pellet correspondiente al pocillo 2, se cultivó en el frasco T12 con 1,5 ml de medio, y estos se mantuvieron en el incubador para favorecer el crecimiento y expansión de las células.

Por otra parte, el tercer pocillo se mantuvo en crecimiento en la placa hasta que se alcanzó la confluencia deseada para poder llevar a cabo este procedimiento de expansión.

El medio dependiendo de la confluencia en los frascos, requiere que sea cambiado cada día o cada dos días. De forma que se cambiaron cada día adicionando 3 ml y 1.5 ml, en el T25 y T12 respectivamente, excepto los fines de semana, que se adicionaron 5 ml y 3 ml porque estaban dos días sin cambiarse.

Se monitorizó constantemente en el microscopio la confluencia de las células, su adherencia y expansión, así como se controló que no apareciera contaminación en el cultivo.

3.7. CRIOPRESERVACIÓN

Una vez los frascos han alcanzado la confluencia adecuada, se procede a su criopreservación en nitrógeno líquido (Air Liquide). Para llevarlo a cabo, se eliminó el medio y se tripsinizaron las células siguiendo el procedimiento anterior. El pellet obtenido se resuspendió en 1 ml de medio Ex-P. 10 µl de la resuspensión se reservaron y tiñeron con 10 µ de azul de tripán para realizar el conteo celular utilizando la cámara Neubauer (BrandBlau).

En total, se prepararon 7 viales con 1 millón de células y 1 vial con 1.5 millones de células. Para su realización, se volvió a centrifugar en las condiciones anteriores la suspensión celular que se tenía, y el pellet obtenido fue resuspendido en 1ml del medio de congelación BAMBANKER (Bambanker). Dos de los viales se conservaron en el Ultracongelador vertical -80°C (ThermoScientific), los otros seis se conservaron durante 24 horas dentro del Mr. Frosty™ Freezing Container (ThermoScientific) en el congelador a -80°C, para después ser traspasados al nitrógeno líquido, hasta su utilización para el cultivo.

3.8. DESCONGELACIÓN

Para proceder a la descongelación de las HNEC se tomó un vial que contenía un millón de células del nitrógeno líquido y se redujo gradualmente la temperatura hasta su descongelación.

Una vez descongeladas, se incubaron a 37°C durante 15 segundos y el dimetilsulfóxido (DMSO) presente en el medio se diluyó en el doble de volumen de medio Ex-P para reducir su efecto tóxico.

Se centrifugó a 400 g durante 5 minutos y el pellet fue resuspendido en 1 ml de medio Ex-P y se cultivó en un frasco previamente colagenado que contenía 2 ml de medio.

3.9. CULTIVO: INTERFAZ AIRE-LÍQUIDO

Para efectuar el cultivo ALI, se han de cultivar las células del vial descongelado en las cestillas de colágeno Transwell (Corning) con un poro de 3 μm , en una placa P12. Después de realizar el conteo celular en la cámara Neubauer, se adicionaron 200 μl de células en cada cestilla, previamente colagenada con 500 μl de tampón de colagenado, que se corresponden con aproximadamente 450.000 células, realizándose un total de 6 cestillas.

Para el mantenimiento se adicionaron 1000 μl de medio Ex-P en la zona basal, y 500 μl en la zona apical/cestilla, y se dejaron crecer en el incubador. El medio en la superficie apical ha de ser cambiado diariamente, en cambio la región basal es reemplazada cada dos días.

Como control positivo de la expansión celular en la cestilla, se adicionó la misma cantidad de células en un pocillo, permitiendo asumir la ocupación total de la superficie de la cestilla, cuando este pocillo está completamente confluyente. En este punto se procede a empezar el cultivo ALI.

Para ello se prepara el medio basal PneumaCult ALI, que contiene 10% del suplemento ALI 10x, anticipadamente descongelado a 2-8°C en la nevera y es completado con medio PneumaCult ALI (StemCell). Para preparar el medio de mantenimiento del ALI, se toma el medio basal ALI, al que se le adicionan 1% del suplemento de mantenimiento, el 0.5% de Hidrocortisona y el 0.2% de Heparina (Stemcell).

Esta última fase del cultivo permite la diferenciación del cultivo en las células del epitelio pseudoestratificado nasal. Para ello, una vez se ocupó toda la superficie de la cestilla, se eliminó todo el medio de la parte apical de la cestilla, dejando expuestas las células al aire y en la parte basal se adicionaron 1500 μl de medio de mantenimiento ALI, que se reemplazó diariamente. Asimismo, una vez por semana se realizó un lavado de la parte apical la cestilla con 500 μl de PBS durante 10 minutos o una hora para eliminar el moco producido por las células.

Este cultivo requiere de 28 días al tratarse de células adultas, por lo que se llevó a cabo un control continuo del crecimiento y diferenciación de las células bajo el microscopio.

3.10. EXTRACCIÓN ARN

Para el análisis del perfil oxidativo se necesita extraer el ARN. Para ello se tomaron muestras en diferentes puntos del cultivo de las células:

- Extraídas del cornete nasal medio.
- Primera semana en cestilla con medio Ex-P.
- Primera semana con medio ALI.

- Segunda semana con medio ALI.
- Tercera semana con medio ALI-Diferenciadas.

Estas muestras se mantuvieron en RNAlater (Invitrogen) en el congelador a -80°C hasta que se llevó a cabo la extracción en la que se utilizó el kit de extracción de NucleoSpin®TriPrep, siguiendo las instrucciones del fabricante.

Una vez el ARN se extrajo siguiendo este protocolo, fue cuantificado en el Nanodrop 2000®espectrofotómetro. Una vez cuantificado, el ARN se retrotranscribió a cDNA utilizando el High Capacity RNA-to-cDNA Kit. Para la PCR, se adiciona en un tubo 9 µl de ARN a una concentración de 100 ng completado con agua libre de RNAsas y 11 µl de master mix que contiene Buffer mix junto con la enzima. Una vez transcurrido este período de tiempo el cDNA se guardó en el congelador hasta su próximo uso.

3.11. PCR CUANTITATIVA

Para realizar la PCR cuantitativa se utiliza el kit TaqMan™ Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems) siguiendo las instrucciones del fabricante. Por ello se prepararon 9 µl de la master mix junto con 1 µl de cDNA por muestra. El total de cDNA que se añadió por pocillo fue de 2 ng.

La qPCR se llevó a cabo utilizando una placa de 384 pocillos (P384, Applied Biosystems), en la que se analizó la expresión de los genes que se muestran en la Tabla 4 para diferentes estados del cultivo celular de las células epiteliales nasales.

Se utilizó un programa de 4 pasos: (1) 50 °C 2 min, (2) 95 °C 10 min, (3) 40 ciclos de PCR 95°C 15 s y 60 °C 1 min, y (4) 25 °C ∞ utilizando el termociclador QuantStudio® 5 (Applied Biosystems).

Tabla 4.Listado de genes analizados en la PCR cuantitativa y su función (Información adaptada de GeneCards, Database, G. H. G. 1996–2021).

GENES	FUNCIÓN
ARNT: Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator	Codifica una proteína que promueve la expresión de genes implicados en el metabolismo de xenobióticos y actúa como cofactor para la regulación transcripcional de HIF1
ARNT2: Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator 2	Codifica una proteína que responde a estímulos ambientales y de desarrollo asociada con proteínas sensoras.
ARNTL: Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator Like	La proteína forma un heterodímero con CLOCK activando la transcripción de los genes Period y Cryptochrome, gracias a la unión del heterodímero con los elementos potenciadores E-box
B2M: Beta-2-Microglobulin	Codifica una proteína antimicrobiana con actividad en el líquido amniótico.
CAT: Catalase	Enzima antioxidante, esencial en la defensa frente al estrés oxidativo en el organismo.
EPAS1: Endothelial PAS Domain Protein 1	Codifica un factor de transcripción que induce genes reguladores cuando disminuyen los niveles de oxígeno.
GADPH: Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase	Codifica una proteína pluriempleada: Cataliza en el metabolismo de carbohidratos, la fosforilación oxidativa reversible del gliceraldehído-3-fosfato en presencia de fosfato inorgánico y nicotinamida adenina dinucleótido (NAD).

	También tiene actividad uracilo ADN glicosilasa en núcleo y antimicrobiana.
GCLC: Glutamate-Cysteine Ligase Catalytic Subunit	Limita la tasa de síntesis de glutatión, este gen codifica la subunidad catalítica.
GCLM: Glutamate-Cysteine Ligase Modifier Subunit	Consta tanto de una subunidad catalítica pesada como de una subunidad reguladora ligera, siendo la primera enzima limitadora de la tasa de síntesis de glutatión.
GPX1: Glutathione Peroxidase 1	Protegen del daño oxidativo, catalizando la reducción de los hidroperóxidos orgánicos y del peróxido de hidrógeno por el glutatión, también modulan la función mitocondrial y el equilibrio redox de los tioles.
GSR: Glutathione-Disulfide Reductase	Enzima esencial en la defensa antioxidante celular, y reducción del disulfuro de glutatión oxidado a sulfhidrilo que actúa como antioxidante
GUSB: Glucuronidase Beta	La hidrolasa codificada se encarga de degradar los glicosaminoglicanos.
HIF1A: Hypoxia Inducible Factor 1 Subunit Alpha	Regulador de la homeostasis, metabolismo energético, angiogénesis, apoptosis y vascularización en condiciones de hipoxia.
HTERT: Telomerase Reverse Transcriptase	Papel clave en la senescencia celular, provocando un acortamiento de los telómeros.
NFE2L2: Nuclear Factor, Erythroid 2 Like 2	Regula genes implicados en la inflamación y respuesta a lesiones, que contienen en sus promotores elementos de respuesta antioxidante
NOS1: Nitric Oxide Synthase 1	Sintetiza óxido nítrico a partir de L-arginina que actúa como mediador biológico en la neurotransmisión y actividades antimicrobianas y antitumorales
NOS2: Nitric Oxide Synthase 2	Participa en la neurotransmisión y actividades antimicrobianas y antitumorales, como medidor biológico.
NOS3: Nitric Oxide Synthase 3	Participa en la neurotransmisión y actividades antimicrobianas y antitumorales, como medidor biológico.
RPL13A: Ribosomal Protein L13a	Represión de genes inflamatorios.
SOD1: Superoxide Dismutase 1	Eliminación de los radicales libres de superóxido convertidos en oxígeno y peróxido de hidrógeno. Actividad antibacteriana, antifúngica y anti-MRSA.
SOD2: Superoxide Dismutase 2	Codifica una proteína mitocondrial que convierte en peróxido de hidrógeno y oxígeno diatómico el superóxido obtenido en la fosforilación oxidativa.

3.12. TRANSFECCIÓN

Por último, se llevó a cabo la puesta a punto de un sistema de transfección de las células epiteliales nasales humanas utilizando Lipofectamine 3000 (ThermoFisher). En este procedimiento, se realizó la transfección de las células con la proteína verde fluorescente GFP, la cual presenta dos picos de excitación: el primero en torno a 395 nm, con un pico de emisión a 508 nm, y el segundo a 475 nm con una emisión a 503 nm (Verela Rodríguez, 2014).

El protocolo se realizó para una de las cestillas y para un pocillo que no contenía cestilla Transwell. En el caso de la cestilla la mezcla preparada se adicionó en la zona apical y el medio con la lipofectamina se mantuvo durante 1 día. Adicionalmente, se realizó el mantenimiento habitual de las células. Para el otro pocillo se siguió el protocolo del fabricante, se dejó actuar durante una hora, y después se adicionó el medio de cultivo.

Para observar la fluorescencia emitida, se utilizó el microscopio de fluorescencia (Leica, modelo DMI3000B) que utiliza la luz azul de fluorescencia. Este emite luz verde de la proteína GFP, si se ha realizado correctamente la transfección.

4.RESULTADOS

Con el fin de favorecer la comprensión de los resultados, este apartado se ha separado en: Puesta a punto del protocolo de cultivo celular mediante ALI y en análisis del perfil oxidativo.

Se incluyó en el estudio un control adulto sano. Este paciente toleró bien las biopsias con cepillo nasal, tan solo en una de las muestras se observaron pequeños rastros de sangre. No se generaron efectos adversos.

4.1. PUESTA A PUNTO DEL PROTOCOLO DE CULTIVO CELULAR MEDIANTE ALI

Algunos de los aspectos mencionados en el protocolo de Martens *et al.*, (2019) fueron modificados, como por ejemplo la doble tripsinización al levantar las células y el uso de frascos T12 para la expansión, entre otros.

Con el fin de obtener un modelo de estudio para la discinesia ciliar primaria, se realizó un cultivo de células del cornete nasal medio mediante la técnica ALI. Los resultados parecen indicar que la puesta a punto de este sistema de cultivo fue realizada correctamente, puesto que se obtuvieron células ciliadas.

4.1.1. Extracción

En primer lugar, al llevar a cabo la biopsia utilizando el cepillo nasal, no se adicionó DNasa I que, según estudios como el de García-Higuera *et al.*, (2001) lisa células envejecidas o disfuncionales y permite la destrucción de las células neoplásicas. Según los resultados obtenidos, este paso no es indispensable para obtener buenos resultados en la extracción de las células nasales. Asimismo, a diferencia del protocolo, en nuestro caso se adicionó gentamicina al medio para evitar contaminación, y no se vio afectado el cultivo por este cambio en el medio de tal forma que, el cultivo consiguió adherirse y expandirse por el frasco como se muestra en la Figura 5.

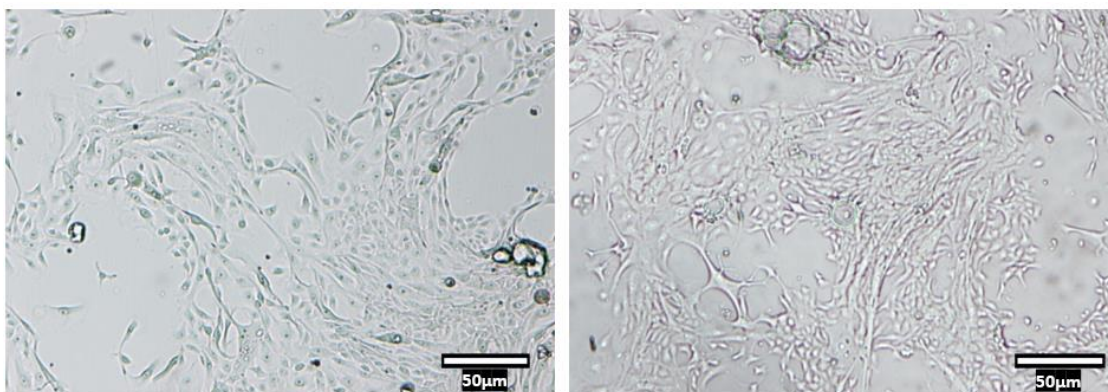


Figura 5. Biopsia de células nasales epiteliales humanas adheridas al pocillo tras siete días de cultivo.

En la figura 5, se muestran los resultados de las HNEC a los siete días de cultivo, caracterizadas por la adherencia a la placa y direccionalidad de las células. Este resultado indica que la extracción celular del cornete nasal medio fue eficaz, además que no se detectó presencia de otro tipo celular, cosa que habría dificultado el cultivo.

4.1.2. Congelación/Descongelación

Para determinar la eficacia de la congelación se llevó a cabo un conteo en la cámara Neubauer de 10 µl de células de uno de los viales congelados, junto con 10 µl de azul tripán.

En el conteo de los cuatro cuadrantes se obtuvo un total de 141 células vivas, que son aquellas que se muestran impermeables al tinte, frente a 64 células muertas, las cuales se muestran teñidas debido a la rotura de su membrana. El total de células cuantificado fue 205 células teniendo en cuenta tanto las vivas como las muertas.

La tabla 5, muestra el conteo celular obtenido en cada cuadrante de la cámara Neubauer, junto con el total de células vivas y muertas.

Tabla 5. Contaje realizado en la cámara Neubauer para determinar la eficacia de la descongelación de las células HNEC.

	Primer cuadrante	Segundo cuadrante	Tercer cuadrante	Cuarto cuadrante	TOTAL
VIVAS	26	32	53	30	141
MUERTAS	16	14	17	17	64

Teniendo en cuenta que, de un total de 205 células, 64 se corresponden a aquellas que no consiguieron sobrevivir al proceso de congelación y posterior descongelación, se estimó que existe un 31,22% de células muertas. Este resultado muestra un valor de viabilidad celular aproximadamente de un 70%, mostrando este una eficacia adecuada en el procedimiento realizado, puesto que las células epiteliales nasales son difíciles de mantener y son sensibles a los cambios sufridos, por lo que un porcentaje del 70% de viabilidad es un resultado aceptable.

Asimismo, este conteo es muy importante para poder establecer las condiciones de cultivo, y conocer el número de células que se cultivan por pocillo.

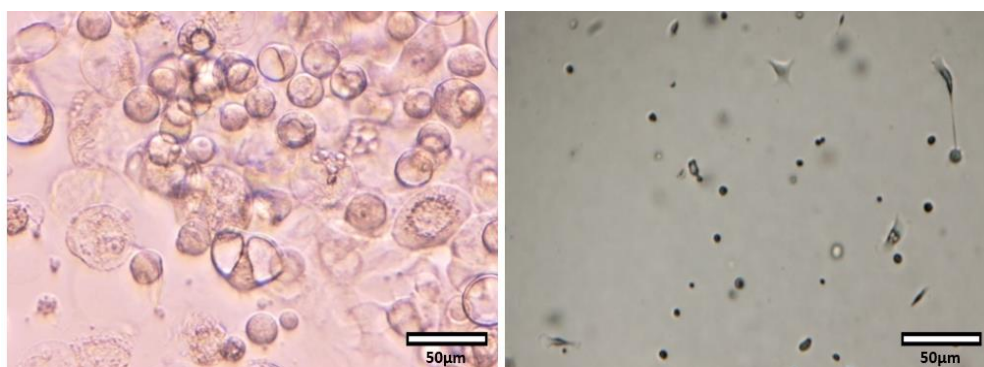


Figura 6. Células epiteliales nasales descongeladas del nitrógeno líquido y cultivadas en un pocillo de una placa P12.

De forma que conociendo el número de células vivas se llevó a cabo el cálculo que se muestra en la Ecuación 1 para conocer el número de células contenido en el vial descongelado de un mililitro.

$$\frac{\text{Células}}{\text{ml}} = \frac{26 + 32 + 53 + 30}{4} \cdot 10000 \cdot 2 = 705.000 \text{ células/ml}$$

Ecuación 1. Conteo en la cámara Neubauer. Número de células correspondientes a un mililitro de células descongeladas.

Los dos frascos de células que se dejaron crecer conteniendo cada uno 500 μl del vial, mostraron un crecimiento adecuado a aquello que se esperaba obtener, como se muestra en las Figuras 7, 8 y 9.

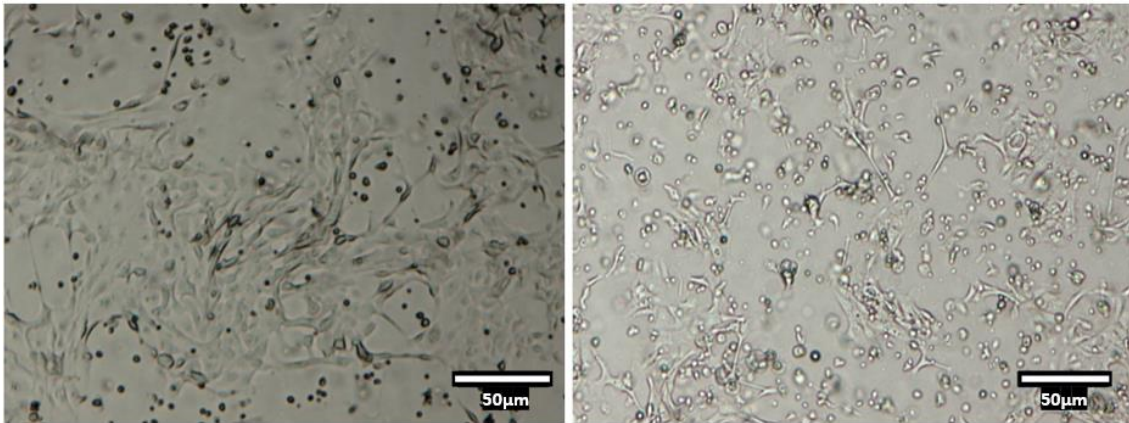


Figura 7. Segundo día de descongelación de las células epiteliales nasales. Se muestra adherencia en algunas de las células caracterizada por la forma alargada, frente a otras que continúan despegadas definidas por una estructura redondeada.

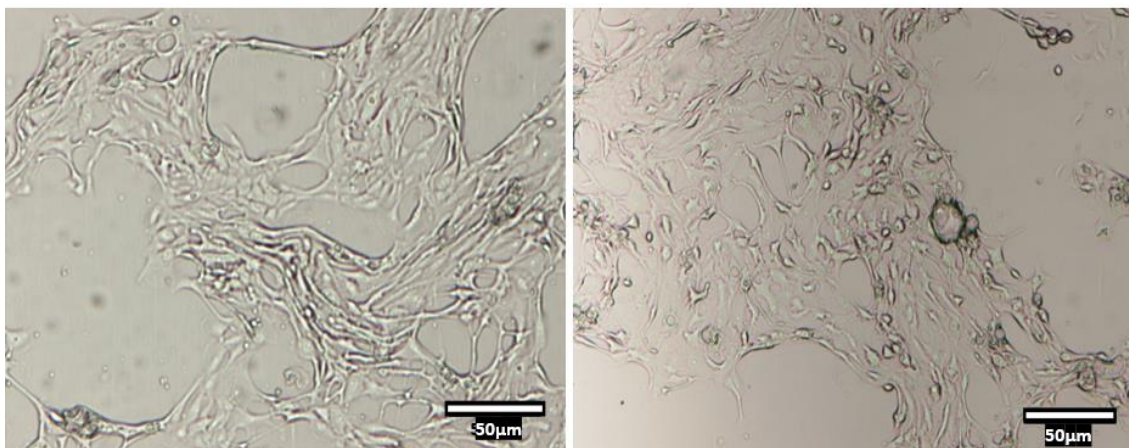


Figura 8. Séptimo día de descongelación de las células epiteliales nasales. Se muestra adherencia total de las células, manifestada por la disposición estirada que se observa en las células

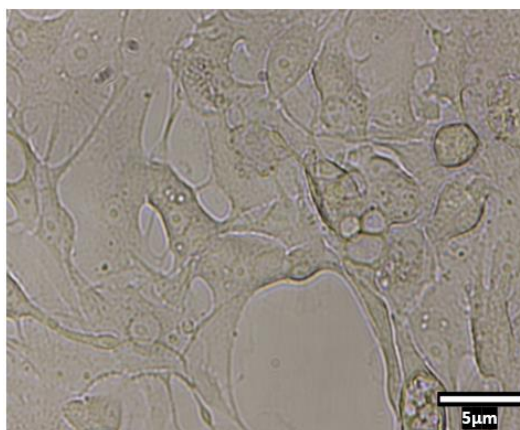


Figura 9. Adherencia de las células epiteliales nasales. Enfoque 40x en el microscopio invertido, en el que se evidencia la adherencia de las células al frasco.

Una vez, se había alcanzado aproximadamente el 80% de confluencia en el frasco, se volvió a realizar el conteo de las células para conocer la concentración celular. En este caso se obtuvo una concentración celular de 2.800.000 células teniendo en cuenta la suma de los dos frascos. Como para sembrar en la cestilla se requieren 300.000-500.000 células, se cultivaron 6 pocillos con un valor aproximado de 450.000 células/cestilla.

4.1.3. Cultivo ALI

Para llevar a cabo el cultivo a ALI, previamente las células son cultivadas con el medio Ex-P para su expansión por toda la cestilla. Para ello se realizó un pocillo control para comprobar cuando se ocupaba toda la superficie y por tanto poder cambiar al medio ALI completo.

A diferencia del protocolo de Martens *et al.*, (2019) en el que adicionan 800 μl de medio bajo y 200 μl arriba, nosotros adicionamos 1000 μl bajo y 500 arriba, puesto que nuestras cestillas tienen un tamaño de poro más grande que las utilizadas en este protocolo. Estos cambios permitieron que el cultivo se pudiera llevar con éxito y así permitir la expansión de las células por toda la cestilla Transwell.

De tal forma que, hasta ajustarnos a las condiciones idóneas para poder llevar a cabo el cultivo con éxito, se realizaron dos cultivos previamente. Estos cultivos fueron descartados, ya que no alcanzaron las condiciones de diferenciación propias de las células multiciliadas.

Uno de ellos mostró contaminación una vez transcurrida la primera semana (Figura 10). A diferencia del primero, el segundo de los cultivos consiguió alcanzar los 28 días necesarios para que tenga lugar la diferenciación celular y poder por tanto observar el movimiento en el cultivo. Sin embargo, una vez alcanzado el final del cultivo no se pudo determinar el movimiento celular, y muchas de las células que se encontraban en el cultivo estaban sufriendo procesos de muerte celular.

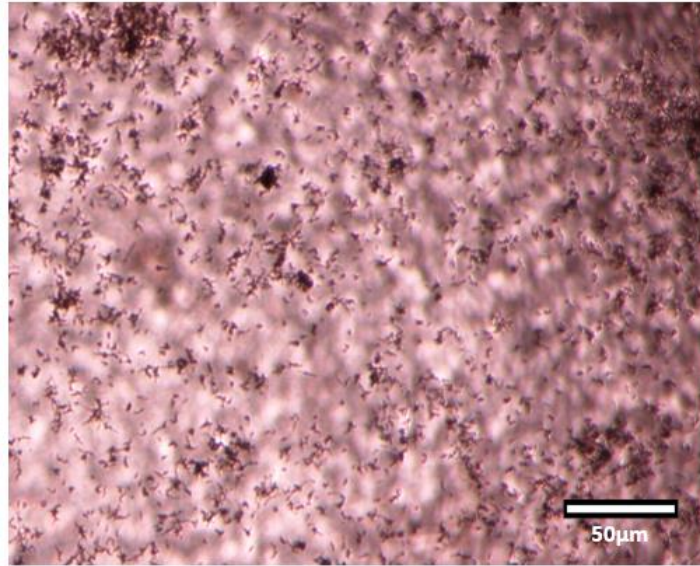


Figura 10.Contaminación por hongos detectada en el primero de los cultivos en las cestillas Transwell realizado de las células epiteliales nasales humanas.

Lo ocurrido en este cultivo fue que se siguió exactamente el volumen indicado en el protocolo sin tener en cuenta el tamaño de poro de la cestilla. Y, por tanto, las células no tenían el acceso necesario al medio para poder sobrevivir 28 días de cultivo. Por tanto, estas dos pruebas realizadas, permitieron establecer las nuevas condiciones de cultivo ajustadas al tamaño de poro de nuestro Transwell, y favoreciendo así la supervivencia y diferenciación de las HNEC.

Los resultados obtenidos a lo largo de las diferentes etapas del cultivo se muestran a continuación:

En la Figura 11, se distingue en un color más oscuro que se corresponde con las tight junctions o uniones estrechas características de las células cuando son cultivadas con el medio EX-P, puesto que sufren procesos de crecimiento. Estas uniones indican que la etapa de proliferación, expansión y adherencia estaba teniendo lugar de forma correcta.

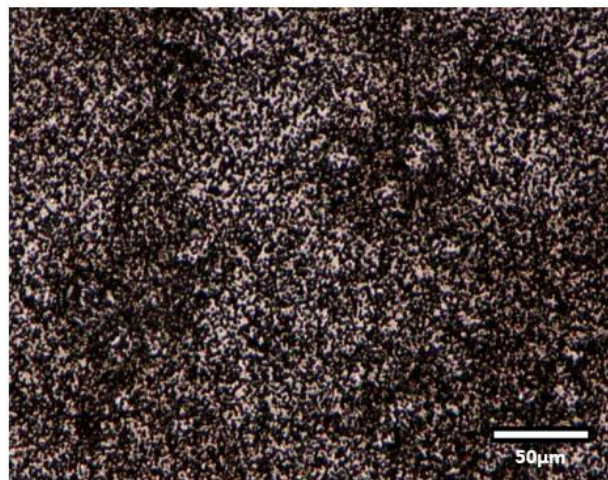


Figura 11.Enfoque 4x en el microscopio invertido manifestando las tight junctions (uniones estrechas) que se establecen entre las células durante la etapa de proliferación y crecimiento.

En la figura 12, se muestra la comparación entre la ausencia celular en una cestilla frente a una cestilla en las que las células han proliferado y ocupado toda la superficie del pocillo, y por tanto se visualiza la direccionalidad característica de estas células que también podíamos determinar cuándo crecían en frasco.

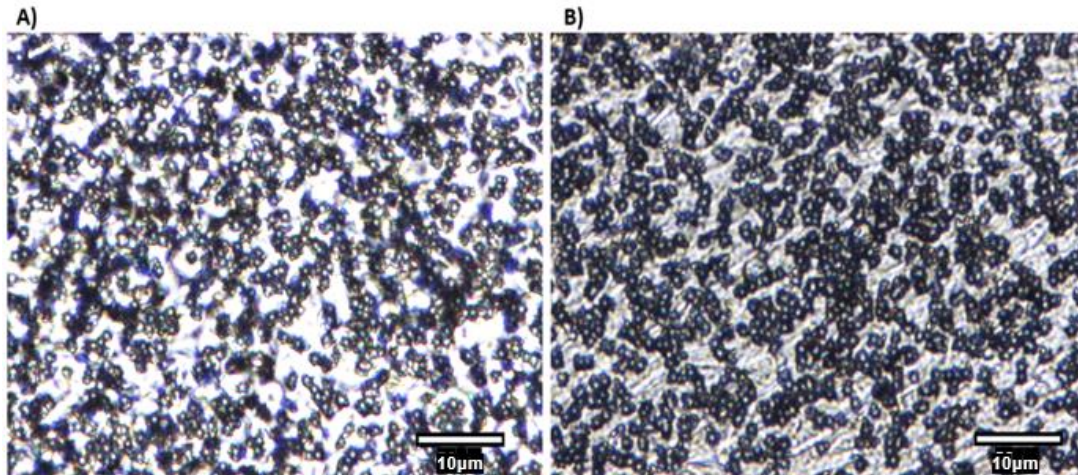


Figura 12.A) Cestilla sin células. Enfoque a los poros de la cestilla y la ausencia de células. **B)** Células nasales epiteliales cultivadas en una cestilla Transwell, se determina la presencia celular caracterizada por la direccionalidad de las células.

Una vez las células ocupaban toda la superficie de la cestilla, se inicia el cultivo propiamente conocido como ALI. La importancia de este cultivo reside en alcanzar la diferenciación celular, por ello hay que llevar especial cuidado una vez se elimina el medio de la superficie apical.

A medida que avanza el cultivo con el medio ALI, debería aparecer producción de moco, representando la diferenciación de las células productoras de mucosidades. Durante el transcurso de nuestro cultivo, se manifestó producción de moco a partir de la segunda semana del cultivo ALI como se muestra en las figuras 13 y 14, determinando que el cultivo estaba avanzando de forma adecuada y que estaba teniendo lugar la diferenciación celular.

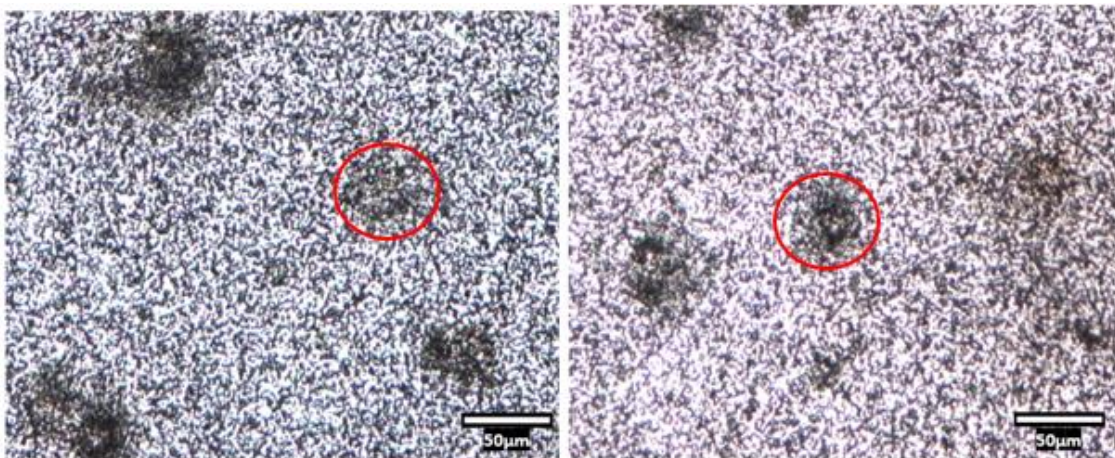


Figura 13.Producción de moco detectada a partir de la segunda semana cultivada con el medio ALI completo del cultivo en interfaz aire-líquido, por parte de las células productoras de mucosidades.

Según el protocolo de Martens *et al.*, (2019) para eliminar el moco se adiciona PBS y se deja actuar durante diez minutos en el incubador. En nuestro caso, como la producción de moco era elevada, en una de las ocasiones se dejó actuar durante una hora, observando que disminuía notablemente el contenido de moco en la cestilla. Por tanto, se puede sugerir que la actuación del PBS durante una hora, es más eficaz que durante diez minutos.

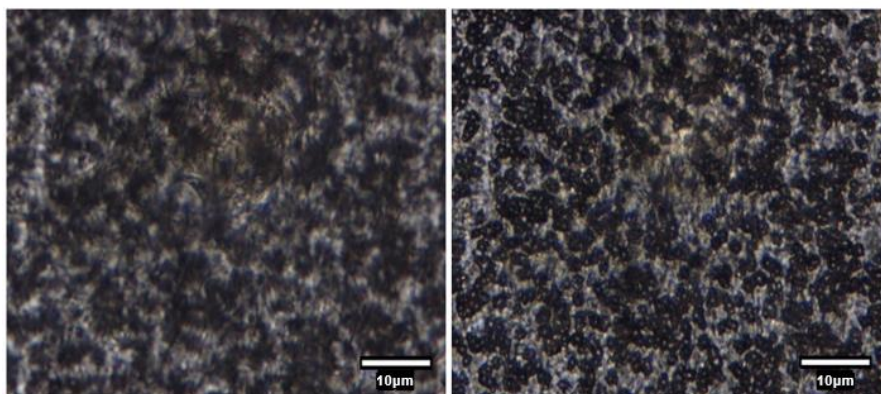


Figura 14. Producción de moco detectada a partir de la segunda semana cultivada con el medio ALI completo del cultivo en interfaz aire-líquido, por parte de las células productoras de mucosidades, con un enfoque de 40x en el microscopio.

Una vez transcurrieron aproximadamente 25 días del cultivo se pudo distinguir movimiento, indicando la diferenciación de las células multiciliadas. Por tanto, los cilios son la confirmación de que se ha puesto a punto del cultivo ALI para una muestra biológica.

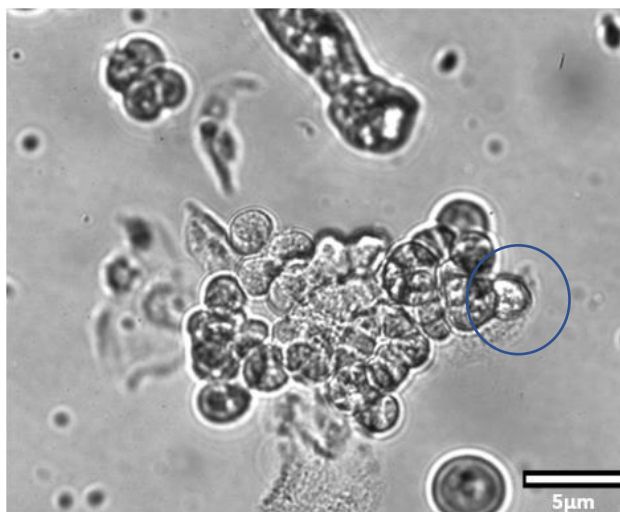


Figura 15. Célula ciliada observada a los 28 días del cultivo ALI, caracterizada por la presencia de cilios y el movimiento generado.

Una vez alcanzada la diferenciación celular a los 28 días, se mantuvo el cultivo durante 14 días más, sugiriendo que una vez alcanzada la diferenciación estas células son capaces de mantenerse durante dos semanas para realizar las investigaciones necesarias.

4.1.4. Extracción ARN

Los resultados obtenidos de la extracción de ARN fueron los que se muestran en la Tabla 6:

Tabla 6. Cuantificación de ARN en Nanodrop 2000@espectrofotómetro en cada una de las diferentes etapas del cultivo en interfaz aire-líquido..

	Biopsia del cornete nasal	Cultivo medio Ex-P	Primera semana ALI	Segunda semana ALI	Tercera semana ALI (Diferenciación)
ARN (ng/μl)	50,6	13,2	10,5	40,4	43,7

Para la extracción de la cestilla, había que tener especial cuidado en evitar la ruptura de la membrana porosa, puesto que esto dificulta la extracción celular. Esto se ve plasmado en la extracción realizada en el Transwell de la primera semana con el cultivo ALI, puesto que la concentración de ARN fue de 10,5 ng/μl, mucho menor en comparación con la extracción de la cestilla de la segunda o tercera semana, producido por la rotura de la membrana. De forma que se puede confirmar que, para realizar una adecuada extracción, el desgarro de la membrana ha de evitarse.

4.1.5. Transfección

La comprobación de la viabilidad de la transfección con Lipofectamina 3000 para las células epiteliales nasales humanas obtuvo buenos resultados.

Al realizar la primera transfección, algunas de las células se mostraron transfectadas con GFP, pero la luz emitida era muy pobre. En cambio, los resultados obtenidos al realizar la segunda transfección mostraron una emisión de luz fluorescente mucho más potente, pudiendo indicar que la transfección con 0,75 μl de Lipofectamine 3000 como se muestra en la Figura 17, es mucho más eficiente que la transfección con 1,5 μl observada en la Figura 16, para las células epiteliales nasales humanas.

De tal forma que, aunque se requieren más ensayos y estudios, para determinar qué se trata de células que permiten la transfección, en esta primera puesta a punto del sistema de transfección se podría estimar que son células que sí que lo posibilitan.

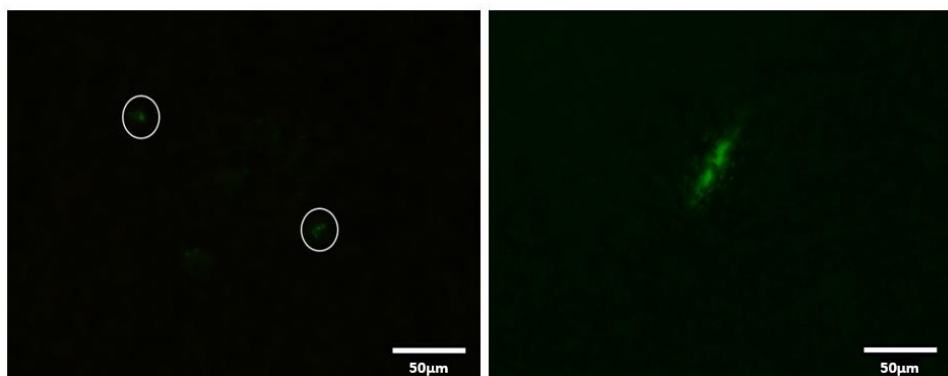


Figura 16. Fluorescencia detectada tras la transfección de GFP con 1,5 μl de Lipofectamine 3000 de las células epiteliales nasales humanas.

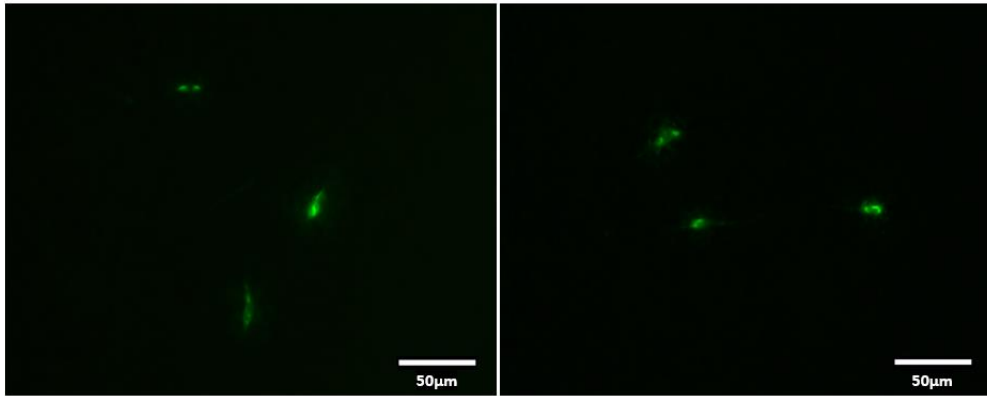


Figura 17. Fluorescencia detectada tras la transfección de GFP con 0,75 µl de Lipofectamine 3000 de las células epiteliales nasales humanas.

Asimismo, se pudo visualizar una fluorescencia muy potente en el moco producido por las células, reflejado en la Figura 18. Esto podría deberse a que las “goblet cells” que constituyen el epitelio nasal, fueron transfectadas con el GFP, y por tanto al generar el moco, este emite el GFP.

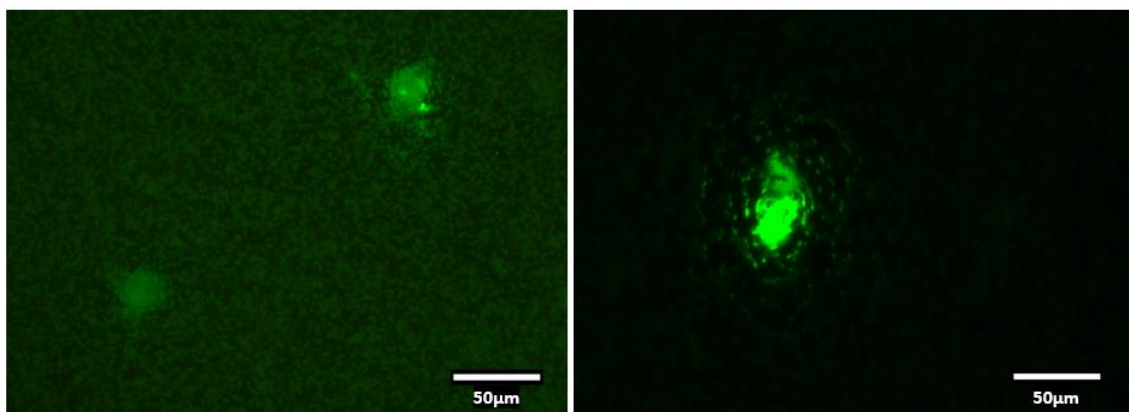


Figura 18. Fluorescencia observada en el moco una vez realizada la transfección con GFP de las células epiteliales nasales humanas en el cultivo ALI.

En la figura 19, se muestra el control negativo, en el que se observa las HNEC en el microscopio sin transfectar con GFP, caracterizado por la ausencia de fluorescencia.

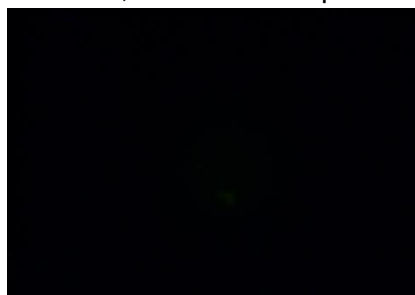


Figura 19. Control negativo de la transfección de las células epiteliales nasales humanas con GFP.

4.2. ANÁLISIS DEL PERFIL OXIDATIVO

Los resultados del análisis del perfil oxidativo se han obtenido siguiendo el método de $2^{-\Delta\Delta CT}$ que se muestra en el estudio realizado por Livak & Schmittgen (2001). Permitiendo determinar la expresión génica mediante la representación gráfica.

Para la obtención de los resultados se ha utilizado como gen HouseKeeping el gen GUSB. Puesto que otros genes analizados que podrían haberse utilizado para normalizar las condiciones fueron, RPL13A, pero este no amplificó por lo que no se pudo utilizar. Y el otro es B2M, pero el control negativo también amplificó, por lo que fue descartado. Además, GAPDH no se mostró suficientemente estable por lo que tampoco se utilizó como gen para estandarizar.

A partir de la Ct media obtenida para cada gen en cada estadio de cultivo, se calculó ΔCT según la Ecuación 2. Una vez obtenido este valor se realizó el cálculo $\Delta\Delta CT$ restando siempre frente a la muestra basal como se muestra en la Ecuación 3. Finalmente, ya se puede obtener el valor de expresión mediante $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Ecuación 4).

$$\Delta CT = Ct \text{ media (Gen a analizar)} - Ct \text{ media GUSB}$$

Ecuación 2.Cálculo de ΔCT .

$$\Delta\Delta CT = \Delta CT - \Delta CT \text{ (muestra basal)}$$

Ecuación 3.Cálculo de $\Delta\Delta CT$.

$$\text{Expresión del gen} = 2^{-\Delta\Delta CT}$$

Ecuación 4.Cálculo de los niveles de expresión de cada gen en cada fase del cultivo.

Los siguientes resultados fueron obtenidos en la prueba que se realizó con una única muestra para poner a punto el método ALI:

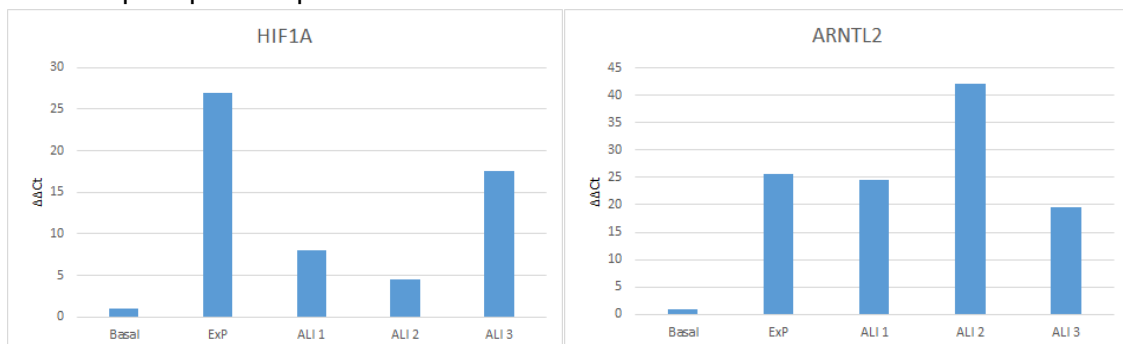




Figura 20. Genes relacionados con hipoxia en un cultivo de células epiteliales nasales en ALI. El eje X describe las etapas del cultivo: Basal: Células extraídas directamente del cornete nasal medio; ExP: Células cultivadas con medio Ex-P en la superficie apical y basal; ALI1: Células cultivadas una semana en interfaz aire líquido; ALI2: Células cultivadas dos semanas en interfaz aire líquido; ALI3: Células cultivadas tres semanas en interfaz aire líquido. El eje Y representa la diferencia de expresión del gen con respecto a la muestra recién extraída (basal).

Estos cinco genes de la Figura 20, están regulados por condiciones de hipoxia, donde en comparación con el basal en todos se muestra una mayor expresión en las condiciones de proliferación celular (medio Ex-P). De forma que, se muestra un mayor estrés oxidativo durante la expansión celular que disminuye a medida que avanza el cultivo, a excepción de la segunda semana en el cultivo ALI, que se manifiesta una mayor expresión en algunos de los genes.

ARNTL2 forma complejos con HIF1A, por lo que se podría llegar a pensar que por eso la expresión del cultivo fresco y la del cultivo diferenciado en la tercera semana son similares en ambos. Lo mismo ocurre con EPAS1 y ARNT, estos actúan como heterodímeros y por ello las gráficas muestran expresiones similares, y además ambas muestran una clara tendencia similar, de elevados niveles en el medio Ex-P, y de las tres semanas en el cultivo ALI, la segunda semana es la que muestra una mayor expresión.

En general, en estos cinco genes la tendencia que se muestra es la mayor expresión durante la etapa de crecimiento.

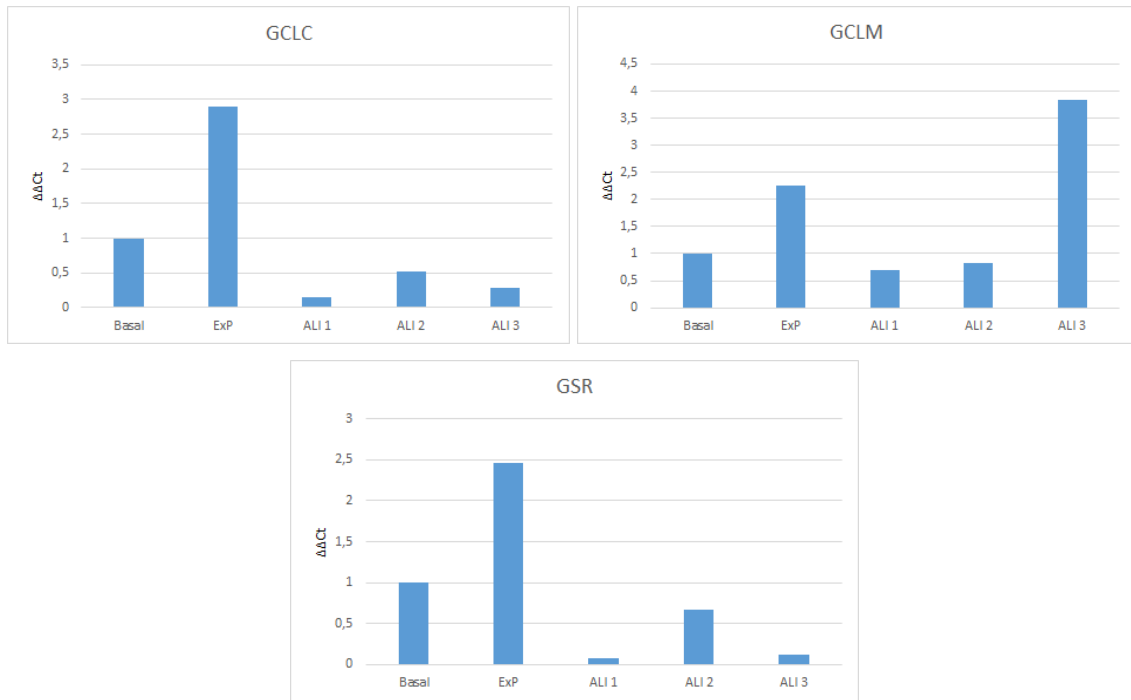


Figura 21. Genes relacionados con la síntesis del glutatión en un cultivo de células epiteliales nasales en ALI. El eje X describe las etapas del cultivo: Basal: Células extraídas directamente del cornete nasal medio; ExP: Células cultivadas con medio Ex-P en la superficie apical y basal; ALI1: Células cultivadas una semana en interfaz aire líquido; ALI2: Células cultivadas dos semanas en interfaz aire líquido; ALI3: Células cultivadas tres semanas en interfaz aire líquido. El eje Y representa la diferencia de expresión del gen con respecto a la muestra recién extraída (basal).

Estos tres genes de la Figura 21, están implicados en la síntesis de glutatión. Al igual que en los anteriores, durante el cultivo con el medio Ex-P es cuando se observa una mayor expresión, indicando que en esta etapa es cuando tiene lugar una mayor producción de glutatión. El glutatión está implicado en la proliferación celular, es por ello, por lo que se ve el claro aumento durante esta etapa, frente a los cultivos ALI en el que tiene lugar la diferenciación celular.

No obstante, también hay una mayor expresión de GCLM a lo largo de la tercera semana del cultivo ALI.

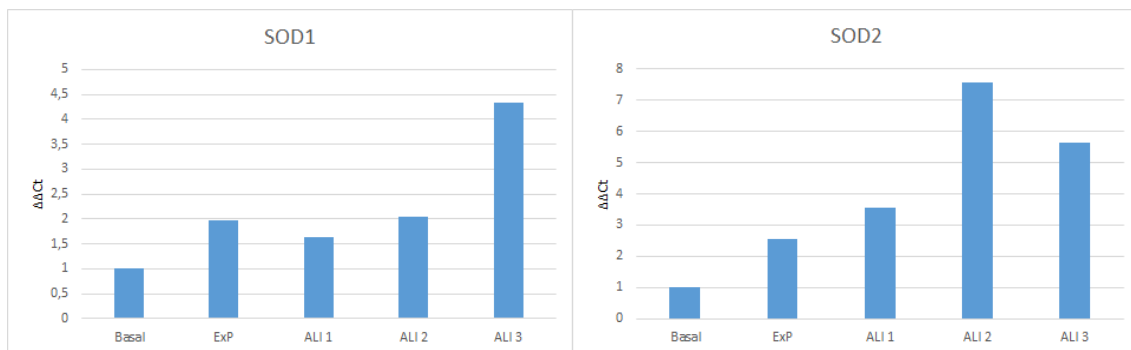


Figura 22. Genes relacionados con la dismutación de los superóxidos a peróxido de hidrógeno y oxígeno en un cultivo de células epiteliales nasales en ALI. El eje X describe las etapas del cultivo: Basal: Células extraídas directamente del cornete nasal medio; ExP: Células cultivadas con medio Ex-P en la superficie apical y basal; ALI1: Células cultivadas una semana en interfaz aire líquido; ALI2: Células cultivadas dos semanas en interfaz aire líquido; ALI3: Células cultivadas tres semanas en interfaz aire líquido. El eje Y representa la diferencia de expresión del gen con respecto a la muestra recién extraída (basal).

A diferencia de todos los anteriores, las superóxido dismutasas implicadas en la dismutación de los superóxidos a peróxido de hidrógeno y oxígeno, muestran una mayor expresión cuando tiene lugar la diferenciación celular en el cultivo ALI, y no cuando se encuentran las HNEC cultivadas en el medio Ex-P.

En ambas gráficas de la Figura 22, se muestra una tendencia al alza de los niveles de expresión a medida que transcurre el tiempo de cultivo.

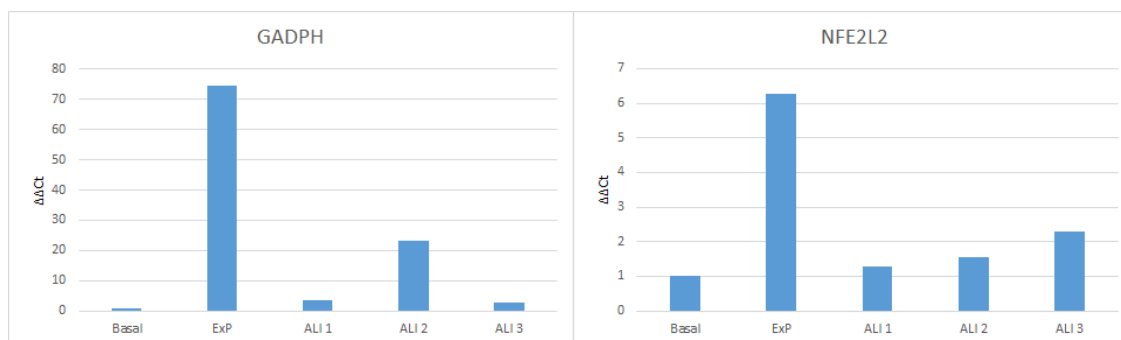


Figura 23. Genes relacionados con la proliferación celular y el estrés oxidativo en un cultivo de células epiteliales nasales en ALI. El eje X describe las etapas del cultivo: Basal: Células extraídas directamente del cornete nasal medio; ExP: Células cultivadas con medio Ex-P en la superficie apical y basal; ALI1: Células cultivadas una semana en interfaz aire líquido; ALI2: Células cultivadas dos semanas en interfaz aire líquido; ALI3: Células cultivadas tres semanas en interfaz aire líquido. El eje Y representa la diferencia de expresión del gen con respecto a la muestra recién extraída (basal).

GADPH no ha sido utilizado para normalizar, puesto que como se muestra en la gráfica 23 sus niveles de expresión varían mucho.

Este gen está también relacionado con la proliferación celular, de ahí los elevados niveles de expresión en el cultivo con Ex-P en comparación con los niveles de expresión reducidos a lo largo del cultivo ALI.

NFE2L2 es un gen que tan solo se expresa en condiciones de estrés oxidativo, sugiriendo que durante el crecimiento celular las células están sometidas a un mayor estrés oxidativo por los niveles de expresión más elevados durante esta etapa, como se observa en la Figura 23.

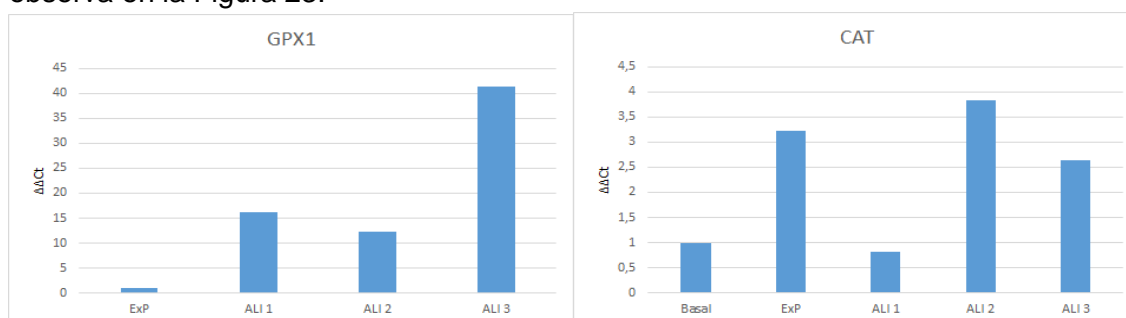


Figura 24. Genes relacionados con la defensa antioxidante en un cultivo de células epiteliales nasales en ALI. El eje X describe las etapas del cultivo: Basal: Células extraídas directamente del cornete nasal medio; ExP: Células cultivadas con medio Ex-P en la superficie apical y basal; ALI1: Células cultivadas una semana en interfaz aire líquido; ALI2: Células cultivadas dos semanas en interfaz aire líquido; ALI3: Células cultivadas tres semanas en interfaz aire líquido. El eje Y representa la diferencia de expresión del gen con respecto a la muestra fresca (basal).

Los resultados para GPX1 no se amplificaron para la muestra basal. De forma que en el resto de las etapas la gráfica 24, muestra que durante la diferenciación se expresa más que en condiciones de expansión celular.

La catalasa, en general presenta niveles elevados de expresión durante todas las etapas del cultivo, excepto en la primera semana del cultivo ALI, representado en la Figura 24.

Teniendo en cuenta todos los resultados visualizados en las gráficas, se observa una mayor expresión de los genes cuando se encuentran en el cultivo con el medio Ex-P, es decir durante la etapa de crecimiento, expansión y adhesión.

Del mismo modo, en la mayoría de los resultados obtenidos se muestra unos valores en las condiciones basales muy similares a los de la tercera semana en el cultivo ALI, indicando que el cultivo se había realizado correctamente y que ha conseguido la diferenciación celular.

Los últimos resultados obtenidos fueron que tanto HTERT como las tres sintetasas de óxido nítrico (NOS1, NOS2 y NOS3) no amplificaron.

5.DISCUSIÓN

Presentamos un estudio que permite llevar a cabo la puesta a punto de un cultivo en interfaz Aire-Líquido, para generar modelos de cultivo diferenciados de las HNEC para el estudio de la Discinesia Ciliar Primaria. Este cultivo imita al epitelio nasal, estableciendo condiciones lo más similares a las fisiológicas posibles.

Muchos estudios como el de Schangen *et al.*, (2018) demuestran la importancia de este cultivo ALI como modelo de estudio de enfermedades respiratorias. Debido a que, varias líneas celulares inmortalizadas, como es el caso de las células de carcinoma de pulmón A549, no son capaces de reproducir algunas características del epitelio pulmonar. De tal forma que, aunque pueden ser cultivadas y subcultivadas con relativa facilidad, no alcanzan la organización pseudoestratificada característica de la capa broncoepitelial. Es por ello que, el establecimiento de un cultivo ALI para la diferenciación del epitelio pseudoestratificado se utiliza para favorecer el análisis de las interacciones entre las células y su estudio *in vitro* (Schangen *et al.*, 2018). Con este método se consiguió una diferenciación exitosa, puesto que nuestro modelo de cultivo mostró las características propias de un epitelio respiratorio nasal. Es decir, presencia de células basales (epiteliales nasales), células productoras de moco (caliciformes), uniones estrechas (tight junctions) y células ciliadas con movimiento (Conzens *et al.*, 2018).

Este sistema de cultivo es mínimamente invasivo y permite la obtención de una forma sencilla y segura de la HNEC del cornete nasal medio de los pacientes. Hay estudios como el de Martens *et al.*, (2019) que muestran la facilidad, seguridad y viabilidad en el aislamiento y cultivo de este tipo celular en recién nacidos tanto prematuros, moderados o tardíos. Asimismo, el crecimiento en ALI permite la diferenciación mucociliar, característica que no es conseguida con los cultivos en monocapa. Una de las condiciones de cultivo utilizadas para la diferenciación celular fue la elección del medio

ALI completo de StemCell, debido a que estudios anteriores habían conseguido alcanzar el final del cultivo utilizando este medio en relativamente poco tiempo.

En nuestro caso, la diferenciación de las HNEC en el cultivo ALI requiere de aproximadamente 25 días desde la eliminación del medio de la superficie apical, a diferencia de estudios como el de Schangen *et al.*, (2018) y Cozens *et al.*, (2018) donde la diferenciación requería de un mayor tiempo de cultivo. De tal forma que, después de tres semanas de cultivo con el medio ALI, se generó un epitelio pseudoestratificado que incluía los tres tipos celulares diferenciados. Hay que destacar que el epitelio diferenciado se mantuvo estable durante dos semanas más, una vez transcurrida la diferenciación. Permitiendo la realización de experimentos durante 14 días, hasta que tuvo lugar la desdiferenciación celular y la pérdida de la ciliación.

Las células basales fueron el primer tipo celular en diferenciarse una vez eliminado el medio de la superficie apical, caracterizado por la configuración longitudinal celular que se observaba en las cestillas. Durante el transcurso de la segunda semana del cultivo ALI tuvo lugar la aparición de moco, indicando la presencia de las células productoras de mucosidad en el cultivo. Este moco atrapa las moléculas patógenas del aire y posteriormente es transportado fuera del pulmón por las células ciliadas (Bluhmki *et al.*, 2020), por ello la necesidad de presencia de los tres tipos celulares para conseguir un buen modelo para la enfermedad. Esta producción de moco fue escasa durante la primera semana del cultivo ALI, sin embargo, a medida que avanzaron las semanas del cultivo, aumentó el contenido mucoso depositado en agrupaciones, lo que podría deberse a la distribución heterogénea de los diferentes tipos celulares.

Como se muestra en los resultados, las células ciliadas fueron el último tipo celular en diferenciarse, puesto que no se observaron evidencias de movimiento hasta la tercera semana en el cultivo ALI. Este tipo celular es esencial para el transporte de moco y eliminación de patógenos que provienen del exterior, conocidos como aclaramiento mucociliar (Schangen *et al.*, 2018). Y para el estudio de la DCP es esencial que tenga lugar la diferenciación de este tipo celular, puesto que permite examinar la frecuencia del latido ciliar o la ultraestructura de los cilios. El número de células ciliadas tuvo una evolución creciente, manteniéndose constante aproximadamente a partir del día 28 de cultivo. La presencia de cilios indicaba que el modelo de HNEC diferenciadas había sido realizado con éxito, puesto que la importancia del cultivo reside en el desarrollo de las células ciliadas, para poder llevar a cabo el estudio de la ultraestructura ciliar y en análisis de la frecuencia del batido ciliar de estas células que se consiguieron desarrollar en nuestro cultivo.

Según Rayneret *et al.*, (2019) los medios más adecuados para una correcta diferenciación de este tipo celular son los medios Pneumacult-Ex Plus y ALI de StemCell. Se puede corroborar con nuestro estudio esta afirmación, puesto que se alcanzó con éxito el cultivo.

Durante la puesta a punto del cultivo, se comprobó la viabilidad del mismo tras la congelación, ya que la congelación facilita enormemente las labores de experimentación al no tener que depender de las tomas de muestras de voluntarios. Estas reservas de células congeladas en viales resultan muy beneficiosas, puesto que favorecen el

establecimiento del cultivo de nuevo, evitando repetir la biopsia en el paciente. Además, un solo vial de reserva con un millón de células congeladas es suficiente para establecer el cultivo, ya que no se mostraron evidencias de alteración de la morfología o función celular en estos viales.

En conclusión, en este estudio se obtuvo un cultivo en interfaz Aire-Líquido de las células epiteliales nasales diferenciado, caracterizado por la presencia de células basales, productoras de moco y ciliadas. Proporcionando un protocolo optimizado y seguro para el uso de cestillas con un mayor tamaño de poro, para generar modelos de HNEC diferenciadas. Estas HNEC diferenciadas proporcionan un modelo excelente del epitelio respiratorio humano para la investigación de patologías respiratorias, entre ellas la Discinesia. Además, ofrece la posibilidad de dos semanas durante las cuales se pueden llevar a cabo un gran número de investigaciones. Por lo que se demuestra que el protocolo seguido conduce a la diferenciación del epitelio nasal, mostrando integridad tisular, generación de moco y ciclogénesis.

En la bibliografía, los estudios del estrés oxidativo celular intrínseco a este método de cultivo ALI y la comparación con muestras de voluntarias son escasos o inexistentes, por lo que, caracterizando sus condiciones, podremos aumentar la robustez de los datos obtenidos de experimentos futuros que utilicen este cultivo

El primer grupo de genes se trata de genes que se regulan en condiciones de hipoxia. Entre ellos se encuentra HIF, una proteína heterodimérica formada por dos subunidades que pertenecen a la familia helix-loop-helix-PAS, la alfa y la beta. Cuando estas dimerizan se produce la unión a los elementos sensibles a la hipoxia en las secuencias de ADN de los genes diana. HIF-1 alfa es una isoforma de la subunidad alfa fundamental en el control del oxígeno del cultivo (Klasvagt *et al.*, 2017). Según estudios anteriores como el de Klasvagt *et al.*, 2017 se determinó un contenido notablemente mayor de HIF-1 alfa en el cultivo sumergido comparado con el cultivo ALI. Esto genera una mayor fosforilación oxidativa y suprime la glucólisis en condiciones ALI. Esta reducción de HIF-1 alfa en ALI es generada por la mejora del suministro de oxígeno.

En el cultivo sumergido el contenido de oxígeno aumenta si se reduce el volumen de la superficie apical, y una vez el medio de este compartimento es eliminado se obtiene un claro aumento de la cantidad de oxígeno recibido para las células.

Expresiones similares ocurren en nuestro estudio donde, se detecta un aumento en la expresión de HIF-1 alfa en el cultivo sumergido, indicativo del estrés oxidativo al que se encuentran sometidas las células en estas condiciones, generado por la posible falta de oxígeno que sufren las células en este estado. Se puede suponer que el aumento de la cantidad de medio de 200 μ l a 500 μ l en la superficie apical con el medio Ex-P en nuestro caso, generan una menor disponibilidad de oxígeno, y por tanto una mayor expresión de estos genes regulados por hipoxia. De forma que, en estas condiciones de cultivo sumergido se puede conjeturar que las células se encuentran en condiciones de estrés oxidativo.

Además, como muestran estudios como el de Klasvagt *et al.*, 2017 se sabe que en condiciones hipóxicas HIF-1 alfa activa genes como por ejemplo GADPH. Explicando la

mayor expresión de este durante el cultivo de proliferación y una menor expresión durante el cultivo de diferenciación.

En cuanto a NRF-2, este codifica un factor de transcripción, miembro de la familia de proteínas básicas de cremallera de leucina, que regula la respuesta antioxidante. En condiciones normales, es ubiquitinado y degradado por el complejo BCR(KEAP1) en el citoplasma. En cambio, en condiciones de estrés oxidativo, este complejo es inhibido por la presencia de metabolitos electrófilos, promoviendo la acumulación de NFE2L2/NRF2, que se une a los elementos ARE de los genes citoprotectores, para neutralizar estos electrófilos reactivos (Database, G. H. G. 1996–2021). Esto sugiere que, en condiciones de proliferación y crecimiento celular, las células están sometidas a un mayor estrés oxidativo, por los niveles de expresión elevados de NRF2.

NRF-2 se encarga de inducir la expresión de genes como la glutamato-cisteína ligasa (GCLC), que participa en un paso limitante de la síntesis de GSH, activando la protección frente al estrés oxidativo del organismo (Simões *et al.*, 2011). Esto explicaría la similitud de resultados que muestran las gráficas de NRF-2 y GCLC, puesto que al haber mayor expresión de NRF-2, implica una mayor expresión en GCLC, en ambos casos mostrando un mayor estrés oxidativo en condiciones de cultivo con el medio Ex-P.

Junto con GCLC, existen otros genes implicados en el metabolismo del glutatión como es el caso de GSR, esto podría explicar que se obtengan niveles de expresión similares en ambos casos. GSR participa en la defensa antioxidante, reduciendo el disulfuro de glutatión oxidado (GSSG) a glutatión (GSH) (Simões *et al.*, 2011). Indicando un mayor estrés oxidativo en condiciones de crecimiento, puesto que el glutatión está implicado en el crecimiento.

NRF2 no solo media la respuesta al estrés oxidativo de GCLC, sino también la de otros genes como SOD1, GSR, SOD2 y CAT (Simões *et al.*, 2011).

La glutatión peroxidasa (GPX1), protege del daño oxidativo generando glutatión que actúa como uno de los principales antioxidantes en el organismo. La GPX1 protege catalizando la conversión de peróxido de hidrógeno o de los hiperóxidos orgánicos en glutatión, que se conjuga con el H₂O₂ para la transformación en agua y oxígeno. La catalasa (CAT) está implicada en la defensa del organismo frente al estrés oxidativo, manteniendo el equilibrio oxidante/antioxidante. Cataliza la conversión del peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno. Asimismo, la catalasa está implicada en el crecimiento celular (Database, G. H. G. 1996–2021).

Se ha observado que la catalasa actúa en altas concentraciones de H₂O₂ y el GPX1 en concentraciones bajas (Céspedes Miranda *et al.*, 1996), esto podría explicar los mayores niveles de CAT en condiciones de cultivo Ex-P, sumado a que está implicada en el crecimiento celular. Y también explicaría los elevados niveles de GPX1 en condiciones de cultivo ALI.

En la qPCR se llevó a cabo el análisis de expresión de dos superóxidos dismutasas (SOD). Las SOD ejercen su papel como defensa principal contra especies reactivas, catalizando la dismutación del ·O₂⁻ (oxígeno radical) a peróxido de hidrógeno.

Una de las analizadas fue SOD1 o SOD de cobre-zinc, elimina el anión superóxido de núcleo, citoplasma y espacio intermembrana de mitocondrias (Ivars Santacreu, 2010; Domínguez & Elizabeth, 2021). Según estudios como el de Afonso *et al.*, (2007) los niveles de SOD1 aumentan en condiciones de estrés oxidativo, sugiriendo que, en la tercera semana del cultivo, las HNEC se encontraban sometidas a un mayor estrés. Por otro lado, SOD2 o de manganeso mitocondrial, su sobreexpresión protege frente al estrés oxidativo en el epitelio alveolar (Ivars Santacreu 2010; Domínguez Flores, 2021). Al igual que SOD1, sus mayores niveles de expresión se encuentran en el cultivo ALI, indicando un mayor estrés oxidativo.

EPAS1, es también conocido como factor inducible por hipoxia 2, este factor de transcripción es inducido cuando disminuyen los niveles de oxígeno. Por tanto, al actuar en las mismas condiciones que HIF1 alfa se muestran niveles de expresión similares, es decir, un valor más elevado en condiciones de cultivo Ex-P. Además, EPAS1 heterodimeriza con ARNT, explicando la semejanza en los resultados obtenidos. El heterodímero se une dentro de los elementos de respuesta a la hipoxia (HRE) a la secuencia central, funcionando como regulador transcripcional de la respuesta a la hipoxia (Database, G. H. G., 1996–2021).

En nuestro estudio se ha utilizado una línea celular no inmortalizada, lo que explicaría el hecho de que HTERT no amplificara durante la realización de la PCR cuantitativa. Además, la telomerasa se expresa en células en proliferación la cual es mínima en las células del epitelio nasal ciliado.

En relación con las sintetasas de óxido nítrico NOS1, NOS2 y NOS3, no hubo amplificación, porque en nuestro caso el modelo de cultivo se realizó a partir de un paciente sano. Tomando los datos de los controles del estudio de Dvorak *et al.*, (2011) en referente a las NOS, observamos que no se encuentra expresión. Esto explicaría la no amplificación en las diferentes etapas del cultivo para estos genes.

6.CONCLUSIONES

Las conclusiones que se extraen de esta investigación son:

- El cultivo en interfaz Aire-Líquido para las células epiteliales nasales humanas, resulta un modelo muy útil para el estudio de la Discinesia Ciliar Primaria.
- Se requieren entre 7-14 días para el crecimiento de las HNEC en un frasco T25 hasta ocupar toda la superficie.
- Se requieren entre 25-28 días para la diferenciación completa de las células ciliadas en el cultivo ALI. Los estudios necesarios para la enfermedad se pueden llevar a cabo, a lo largo de las dos semanas posteriores a la diferenciación.
- Las HNEC están sometidas a un mayor estrés oxidativo cuando se encuentran en la etapa de crecimiento y proliferación, en comparación con la etapa de diferenciación celular.
- Las HNEC en el método de cultivo ALI aceptan la transfección mediante métodos químicos, por lo que es posible realizar modificaciones génicas y observar los

cambios que ocurren con unos niveles de organización celular mayores que los del cultivo 2D.

En conclusión, se ha establecido un modelo de estudio para la Discinesia ciliar Primaria mediante el uso de la técnica ALI, caracterizado por una diferenciación celular a los 28 días del cultivo. Durante esta etapa de diferenciación se genera un menor estrés oxidativo en comparación con la etapa de crecimiento celular. Finalmente, se indica la posibilidad de llevar a cabo la transfección de las células HNEC en el método de cultivo ALI.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Afonso, V., Champy, R., Mitrovic, D., Collin, P., & Lomri, A. (2007). Reactive oxygen species and superoxide dismutases: Role in joint diseases. *Joint Bone Spine*, 74(4), 324–329. <https://doi.org/10.1016/j.jbspin.2007.02.002>

Afzelius, B. A. (2004). Cilia-related diseases. *The Journal of Pathology*, 204(4), 470-477. <https://doi.org/10.1002/path.1652> Afzelius, B. A. (1985). The immotile-cilia syndrome: A microtubule-associated defect. *CRC Critical Reviews in Biochemistry*, 19(1), 63-87. <https://doi.org/10.3109/10409238509086788>

Armengot Carceller, M., Mata Roig, M., Milara Payá, X., & Cortijo Gimeno, J. (2010). Discinesia ciliar primaria. Ciliopatías. *Acta Otorrinolaringológica Española*, 61(2), 149-159. <https://doi.org/10.1016/j.otorri.2009.01.013>

Barzilai, A., & Yamamoto, K.-I. (2004). DNA damage responses to oxidative stress. *DNA Repair*, 3(8), 1109-1115. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2004.03.002>

Bisht, S., Faiq, M., Tolahunase, M., & Dada, R. (2017). Oxidative stress and male infertility. *Nature Reviews. Urology*, 14(8), 470-485. <https://doi.org/10.1038/nrurol.2017.69>

Bluhmki, T., Bitzer, S., Gindele, J. A., Schruf, E., Kiechle, T., Webster, M., Schymeinsky, J., Ries, R., Gantner, F., Bischoff, D., Garnett, J., & Heilker, R. (2020). Development of a miniaturized 96-Transwell air-liquid interface human small airway epithelial model. *Scientific Reports*, 10(1), 13022. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-69948-2>

Bourguignon, C., Vernisse, C., Mianné, J., Fieldès, M., Ahmed, E., Petit, A., Vachier, I., Bertrand, T. L., Assou, S., Bourdin, A., & Vos, J. D. (2020). Les organoïdes pulmonaires. *médecine/sciences*, 36(4), 382-388. <https://doi.org/10.1051/medsci/2020056>

Céspedes Miranda, E. M., Hernández Lantigua, I., & Llópiz Janer, N. (1996). Enzimas que participan como barreras fisiológicas para eliminar los radicales libres: II. Catalasa. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*, 15(2), 0-0.

Chen, S., & Schoen, J. (2019). Air-liquid interface cell culture: From airway epithelium to the female reproductive tract. *Reproduction in Domestic Animals = Zuchthygiene*, 54 Suppl 3, 38-45. <https://doi.org/10.1111/rda.13481>

Cozens, D., Sutherland, E., Marchesi, F., Taylor, G., Berry, C. C., & Davies, R. L. (2018). Temporal differentiation of bovine airway epithelial cells grown at an air-liquid interface. *Scientific Reports*, 8(1), 14893. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-33180-w>

Dang, J., Tiwari, S. K., Agrawal, K., Hui, H., Qin, Y., & Rana, T. M. (2021). Cellular diversity of human cerebral organoids revealed by single cell RNA-seq. *Molecular Psychiatry*, 26(4), 1043-1043. <https://doi.org/10.1038/s41380-021-01064-7>

Database, G. H. G. (1996–2021). GeneCards - Human Genes | Gene Database | Gene Search. GeneCards. The human gene database. <https://www.genecards.org/>

Domej, W., Oettl, K., & Renner, W. (2014). Oxidative stress and free radicals in COPD--implications and relevance for treatment. *International Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease*, 9, 1207-1224. <https://doi.org/10.2147/COPD.S51226>

- Domínguez Flores, N. E. (2021). Estudio del estrés oxidativo e inflamación a nivel celular previa exposición a ceniza volcánica. (Tesis doctoral). Universidad de las fuerzas armadas de Ecuador, Sangolquí. Recuperado de: <http://repositorio.espe.edu.ec/jspui/handle/21000/24219>
- Drakhlis, L., Biswanath, S., Farr, C.-M., Lupanow, V., Teske, J., Ritzenhoff, K., Franke, A., Manstein, F., Bolesani, E., Kempf, H., Liebscher, S., Schenke-Layland, K., Hegermann, J., Nolte, L., Meyer, H., de la Roche, J., Thiemann, S., Wahl-Schott, C., Martin, U., & Zweigerdt, R. (2021). Publisher Correction: Human heart-forming organoids recapitulate early heart and foregut development. *Nature Biotechnology*, 39(6), 775-775. <https://doi.org/10.1038/s41587-021-00960-1>
- Dvorak, A., Tilley, A. E., Shaykhiev, R., Wang, R., & Crystal, R. G. (2011). Do Airway Epithelium Air–Liquid Cultures Represent the In Vivo Airway Epithelium Transcriptome? *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 44(4), 465–473. doi:10.1165/rcmb.2009-0453oc
- Eley, L., Yates, L. M., & Goodship, J. A. (2005). Cilia and disease. *Current Opinion in Genetics & Development*, 15(3), 308-314. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2005.04.008>
- Escribano, A., Amor, M., Pastor, S., Castillo, S., Sanz, F., Codoñer-Franch, P., & Dasí, F. (2015). Decreased glutathione and low catalase activity contribute to oxidative stress in children with α -1 antitrypsin deficiency. *Thorax*, 70(1), 82-83. <https://doi.org/10.1136/thoraxjnl-2014-205898>
- Escribano, A., & Armengot, M. (2013). Discinesia ciliar primaria. *Anales de Pediatría Continuada*, 11, 38-45. [https://doi.org/10.1016/S1696-2818\(13\)70116-1](https://doi.org/10.1016/S1696-2818(13)70116-1)
- Fliegauf, M., Benzing, T., & Omran, H. (2007). When cilia go bad: Cilia defects and ciliopathies. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 8(11), 880-893. <https://doi.org/10.1038/nrm2278>
- García-Higuera, M., Alvarado-Vásquez, N., Alcázar-Leyva, S., Meneses-Flores, M., Cerón-Rodríguez, E., & Zamudio-Cortés, P. (2001). Efectos de la desoxirribonucleasa I sobre células del melanoma murino B16-F10. *Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias*, 14(2), 79-84.
- Ghosh, B., Park, B., Bhowmik, D., Nishida, K., Lauver, M., Putcha, N., Gao, P., Ramanathan, M., Hansel, N., Biswal, S., & Sidhaye, V. K. (2020). Strong correlation between air-liquid interface cultures and in vivo transcriptomics of nasal brush biopsy. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology*, 318(5), L1056-L1062. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00050.2020>
- Horani, A., Ferkol, T. W., Dutcher, S. K., & Brody, S. L. (2016). Genetics and biology of primary ciliary dyskinesia. *Paediatric Respiratory Reviews*, 18, 18-24. <https://doi.org/10.1016/j.prrv.2015.09.001>
- Hornef, N., Olbrich, H., Horvath, J., Zariwala, M. A., Fliegauf, M., Loges, N. T., Wildhaber, J., Noone, P. G., Kennedy, M., Antonarakis, S. E., Blouin, J.-L., Bartoloni, L., Nüsslein, T., Ahrens, P., Griese, M., Kuhl, H., Sudbrak, R., Knowles, M. R., Reinhardt, R., & Omran, H. (2006). DNAH5 mutations are a common cause of primary ciliary dyskinesia with outer dynein arm defects. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 174(2), 120-126. <https://doi.org/10.1164/rccm.200601-084OC>
- Iñiguez C, R., Fonseca A, X., Hernández C, J., González B, S., & Sánchez D, I. (2007). Disquinesia ciliar: Diagnóstico ultraestructural, evolución clínica y alternativas de tratamiento. *Revista médica de Chile*, 135(9), 1147-1152. <https://doi.org/10.4067/S0034-98872007000900008>
- Ivars Santacreu, D. (2010). Tabaco, estrés oxidativo e inflamación en vías aéreas. Papel del AMPc (Tesis doctoral). Universitat de València, Valencia. Recuperado de: <https://roderic.uv.es/handle/10550/23450>
- Klasvogt, S., Zuschratter, W., Schmidt, A., Kröber, A., Vorwerk, S., Wolter, R., Isermann, B., Wimmers, K., Rothkötter, H.-J., & Nossol, C. (2017). Air-liquid interface enhances oxidative phosphorylation in intestinal epithelial cell line IPEC-J2. *Cell Death Discovery*, 3, 17001. <https://doi.org/10.1038/cddiscovery.2017.1>
- Lee, I.-T., & Yang, C.-M. (2012). Role of NADPH oxidase/ROS in pro-inflammatory mediators-induced airway and pulmonary diseases. *Biochemical Pharmacology*, 84(5), 581-590. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2012.05.005>
- Lee, J., Sutani, A., Kaneko, R., Takeuchi, J., Sasano, T., Kohda, T., Ihara, K., Takahashi, K., Yamazoe, M., Morio, T., Furukawa, T., & Ishino, F. (2020). In vitro generation of functional murine heart organoids via FGF4 and extracellular matrix. *Nature Communications*, 11(1), 4283. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-18031-5>
- Leigh, M. W., Hazucha, M. J., Chawla, K. K., Baker, B. R., Shapiro, A. J., Brown, D. E., LaVange, L. M., Horton, B. J., Qaqish, B., Carson, J. L., Davis, S. D., Dell, S. D., Ferkol, T. W., Atkinson, J. J., Olivier, K. N.,

- Sagel, S. D., Rosenfeld, M., Milla, C., Lee, H.-S., ... Knowles, M. R. (2013). Standardizing Nasal Nitric Oxide Measurement as a Test for Primary Ciliary Dyskinesia. *Annals of the American Thoracic Society*, 10(6), 574-581. <https://doi.org/10.1513/AnnalsATS.201305-110OC>
- Leigh, M. W., Pittman, J. E., Carson, J. L., Ferkol, T. W., Dell, S. D., Davis, S. D., Knowles, M. R., & Zariwala, M. A. (2009). Clinical and genetic aspects of primary ciliary dyskinesia/Kartagener syndrome. *Genetics in Medicine: Official Journal of the American College of Medical Genetics*, 11(7), 473-487. <https://doi.org/10.1097/GIM.0b013e3181a53562>
- Lin, T. K., Lee, R. K., Su, J. T., Liu, W. Y., Lin, M. H., & Hwu, Y. M. (1998). A successful pregnancy with in vitro fertilization and embryo transfer in an infertile woman with Kartagener's syndrome: A case report. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 15(10), 625-627. <https://doi.org/10.1023/a:1020341629516>
- Lucas, J. S., Burgess, A., Mitchison, H. M., Moya, E., Williamson, M., Hogg, C., & National PCD Service, UK. (2014). Diagnosis and management of primary ciliary dyskinesia. *Archives of Disease in Childhood*, 99(9), 850-856. <https://doi.org/10.1136/archdischild-2013-304831>
- Lucas, J. S., Davis, S. D., Omran, H., & Shoemark, A. (2020). Primary ciliary dyskinesia in the genomics age. *The Lancet. Respiratory Medicine*, 8(2), 202-216. [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(19\)30374-1](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(19)30374-1)
- Luo, J., Mills, K., le Cessie, S., Noordam, R., & van Heemst, D. (2020). Ageing, age-related diseases and oxidative stress: What to do next? *Ageing Research Reviews*, 57, 100982. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2019.100982>
- Martens, A., Amann, G., Schmidt, K., Gaupmann, R., Böhm, B., Dehlink, E., Szépfalusi, Z., Förster-Waldl, E., Berger, A., Fyhrquist, N., Alenius, H., & Wisgrill, L. (2019). An optimized, robust and reproducible protocol to generate well-differentiated primary nasal epithelial models from extremely premature infants. *Scientific Reports*, 9(1), 20069. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-56737-9>
- Mathis, C., Poussin, C., Weisensee, D., Gebel, S., Hengstermann, A., Sewer, A., Belcastro, V., Xiang, Y., Ansari, S., Wagner, S., Hoeng, J., & Peitsch, M. C. (2013). Human bronchial epithelial cells exposed in vitro to cigarette smoke at the air-liquid interface resemble bronchial epithelium from human smokers. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology*, 304(7), L489-503. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00181.2012>
- Meeks, M., & Bush, A. (2000). Primary ciliary dyskinesia (PCD). *Pediatric Pulmonology*, 29(4), 307-316. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-0496\(200004\)29:4<307::AID-PPUL11>3.0.CO;2-2](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-0496(200004)29:4<307::AID-PPUL11>3.0.CO;2-2)
- Morier, L., Pérez, L., Cancio, R., Savón, C., González, Z., & Goyenechea, A. (1996). [A comparison of the NCI-H292 line with other continuous lines for the multiplication of respiratory viruses]. *Revista Cubana De Medicina Tropical*, 48(3), 171-173.
- Müller, L., Brighton, L. E., Carson, J. L., Fischer, W. A., & Jaspers, I. (2013). Culturing of human nasal epithelial cells at the air liquid interface. *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, 80. <https://doi.org/10.3791/50646>
- Napolitano, C. V., González C.G., Iñíguez R. C., Fonseca X. A. (2002). Disquinesia Ciliar Primaria: Revisión Bibliográfica, 62, 191-198. [https://www.sochiorl.cl/uploads/15\(16\).pdf](https://www.sochiorl.cl/uploads/15(16).pdf)
- Ogura, S., & Shimosawa, T. (2014). Oxidative Stress and Organ Damages. *Current Hypertension Reports*, 16(8), 452. <https://doi.org/10.1007/s11906-014-0452-x>
- Pamplona, R., & Costantini, D. (2011). Molecular and structural antioxidant defenses against oxidative stress in animals. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 301(4), R843-863. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00034.2011>
- Pizzino, G., Irrera, N., Cucinotta, M., Pallio, G., Mannino, F., Arcoraci, V., Squadrito, F., Altavilla, D., & Bitto, A. (2017). Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, vol. 2017, 13, 8416763. <https://doi.org/10.1155/2017/8416763>
- Popatia, R., Haver, K., & Casey, A. (2014). Primary Ciliary Dyskinesia: An Update on New Diagnostic Modalities and Review of the Literature. *Pediatric Allergy, Immunology, and Pulmonology*, 27(2), 51-59. <https://doi.org/10.1089/ped.2013.0314>
- Radi, E., Formichi, P., Battisti, C., & Federico, A. (2014). Apoptosis and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Journal of Alzheimer's Disease: JAD*, 42 Suppl 3, S125-152. <https://doi.org/10.3233/JAD-132738>

- Rahman, T., Hosen, I., Islam, M. M. T., & Shekhar, H. U. (2012). Oxidative stress and human health. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 03(07), 997-1019. <https://doi.org/10.4236/abb.2012.327123>
- Rayner, R. E., Makena, P., Prasad, G. L. & Cormet-Boyaka, E. (2019). Optimization of Normal Human Bronchial Epithelial (NHBE) Cell 3D Cultures for *in vitro* Lung Model Studies. *Scientific Reports* 9, 500, <https://doi.org/10.1038/s41598-018-36735-z>.
- Reula, A., Lucas, J. S., Moreno-Galdó, A., Romero, T., Milara, X., Carda, C., Mata-Roig, M., Escribano, A., Dasi, F., & Armengot-Carceller, M. (2017). New insights in primary ciliary dyskinesia. *Expert Opinion on Orphan Drugs*, 5(7), 537-548. <https://doi.org/10.1080/21678707.2017.1324780>
- Romero R, M.T., Rovira A, S., Caballero R, M.A. (2017) Manejo del paciente afecto de discinesia ciliar primaria. *Protoc diagn ter pediatri*. (1), 423-437.
- Rossman, C. M., & Newhouse, M. T. (1988). Primary ciliary dyskinesia: Evaluation and management. *Pediatric Pulmonology*, 5(1), 36-50. <https://doi.org/10.1002/ppul.1950050109>
- Rovira A, S. (2011). Discinesia ciliar primaria. *Medicina respiratoria*, 4(1), 49-56.
- Satir, P., & Christensen, S. T. (2008). Structure and function of mammalian cilia. *Histochemistry and Cell Biology*, 129(6), 687-693. <https://doi.org/10.1007/s00418-008-0416-9>
- Schagen, J., Sly, P. D., & Fantino, E. (2018). Characterizing well-differentiated culture of primary human nasal epithelial cells for use in wound healing assays. *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology*, 98(11), 1478-1486. <https://doi.org/10.1038/s41374-018-0100-1>
- Sies, H. (1997). Oxidative stress: Oxidants and antioxidants. *Experimental Physiology*, 82(2), 291-295. <https://doi.org/10.1113/expphysiol.1997.sp004024>
- Sies, H., Berndt, C., & Jones, D. P. (2017). Oxidative Stress. *Annual Review of Biochemistry*, 86, 715-748. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-061516-045037>
- Simões, T., Charro, N., Blonder, J., Faria, D., Couto, F. M., Chan, K. C., Waybright, T., Isaaq, H. J., Veenstra, T. D., & Penque, D. (2011). Molecular profiling of the human nasal epithelium: A proteomics approach. *Journal of Proteomics*, 75(1), 56-69. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2011.05.012>
- Tönnies, E., & Trushina, E. (2017). Oxidative Stress, Synaptic Dysfunction, and Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's Disease: JAD*, 57(4), 1105-1121. <https://doi.org/10.3233/JAD-161088>
- Toriello, H. V., & Parisi, M. A. (2009). Cilia and the ciliopathies: An introduction. *American Journal of Medical Genetics. Part C, Seminars in Medical Genetics*, 151C(4), 261-262. <https://doi.org/10.1002/ajmg.c.30230>
- Verele Rodríguez, Bárbara María (2014). Expresión en levaduras de genes GFP recombinantes en el mutante nup84 del Complejo del Poro Nuclear (Máster). Universidad da Coruña, La Coruña. Recuperado de: https://ruc.udc.es/dspace/bitstream/handle/2183/19642/VarelaRodriguez%2C_BarbaraMaria_TFM_2014.pdf?sequence=2&isAllowed=y
- Walters, M. S., Gomi, K., Ashbridge, B., Moore, M. A. S., Arbelaez, V., Heldrich, J., Ding, B.-S., Rafii, S., Staudt, M. R., & Crystal, R. G. (2013). Generation of a human airway epithelium derived basal cell line with multipotent differentiation capacity. *Respiratory Research*, 14, 135. <https://doi.org/10.1186/1465-9921-14-135>
- Yaribeygi, H., Sathyapalan, T., Atkin, S. L., & Sahebkar, A. (2020). Molecular Mechanisms Linking Oxidative Stress and Diabetes Mellitus. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, vol. 2020, 13, 8609213. <https://doi.org/10.1155/2020/8609213>
- Zeng, Z., Huang, B., Parvez, R. K., Li, Y., Chen, J., Vonk, A. C., Thornton, M. E., Patel, T., Rutledge, E. A., Kim, A. D., Yu, J., Grubbs, B. H., McMahon, J. A., Pastor-Soler, N. M., Hallows, K. R., McMahon, A. P., & Li, Z. (2021). Generation of patterned kidney organoids that recapitulate the adult kidney collecting duct system from expandable ureteric bud progenitors. *Nature Communications*, 12(1), 3641. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-23911-5>

8.ANEXOS

Anexo 1. Informe del comité ético de investigación con medicamentos del hospital clínico universitario de Valencia



Hospital Clínic Universitari



INFORME DEL COMITE ETICO DE INVESTIGACION CON MEDICAMENTOS DEL HOSPITAL CLINICO UNIVERSITARIO DE VALENCIA

Don Esteban Morcillo Sánchez, Vicepresidente del Comité Ético de Investigación con Medicamentos del Hospital Clínico Universitario de Valencia

CERTIFICA

Que este Comité, en su reunión de comisión ordinaria (Acta nº370) de fecha 17 de junio de 2021, ha analizado los aspectos éticos y científicos relacionados a la siguiente modificación sustancial:

Nº DE ORDEN: 2020/010

TÍTULO: Terapia génica en discinesia ciliar primaria

ENMIENDA: MS nº1 de fecha 2 de junio de 2021

- Nuevo investigador colaborador: Victoria Muriach Pérez

CLASIFICACIÓN: TESIS Daniel Pellicer

Emite un **DICTAMEN FAVORABLE** para la realización de dicho proyecto por el Dr. Francisco Dasi Fernández en la Fundación de Investigación Sanitaria INCLIVA.

Lo que certifico a efectos oportunos.

Valencia, 17 de junio de 2021

MORCILLO
SANCHEZ,
ESTEBAN JESUS
(FIRMA)

Firmado digitalmente por
MORCILLO SANCHEZ,
ESTEBAN JESUS (FIRMA)
Fecha: 2021.06.17
19:13:15 +02'00'

Fdo. Don Esteban Morcillo Sánchez