



Campus de Huesca
Universidad Zaragoza

Trabajo de Fin de Grado:

Impacto de distintos Medios de Cultivo Celulares en la Función Mitocondrial: Revisión y Experimentación

Autor del trabajo: Saioa Aguas Mezquita

Grado: Nutrición Humana y Dietética

Director: David Pacheu Grau, Departamento de Bioquímica y Biología Molecular.

Fecha de presentación: 29 / 05 / 2024

Abreviaturas empleadas

- FBI: Fibroblastos Humanos Inmortalizados
- OXPHOS: Fosforilación oxidativa.
- TSFM: Factor de elongación de traducción mitocondrial Ts
- ATP: Adenosín trifosfato
- DNAm: DNA mitocondrial
- DNAn: DNA nuclear
- DMEM: “Medio Eagle modificado de Dulbecco”
- FBS: Suero fetal bovino (Fetal Bovine Serum, en inglés)
- HPLM: Medio similar al plasma Humano.
- RPMI: Medio Roswell Park Memorial Institute.
- ECAR: Tasa de acidificación extracelular media
- OCR: Tasa de consumo de oxígeno
- TFAM: Factor de transcripción mitocondrial A
- PUFA: Ácidos grasos polinsaturados
- EPA: Ácido eicosapentaenoico
- DHA: Ácido docosahexaenoico

Contenido

1. Resumen	4
2. Introducción	5
3. Metodología	8
3.1. Búsqueda Bibliográfica	8
3.2. Líneas Celulares.....	8
3.3. Medios de Cultivo	9
3.4. Materiales:.....	9
3.4.1. Reactivos:.....	9
3.4.2. Aparataje:.....	10
3.5. Procedimientos Experimentales	10
3.5.1. Cultivos celulares:	10
3.5.2. Recuento celular:.....	11
3.5.3. Efecto de los medios sobre el crecimiento celular:	11
3.5.4. Estudio de la bioenergética celular:.....	12
4. Resultados	13
4.1. Revisión Bibliográfica.....	13
4.2. Parte Experimental	18
5. Discusión	24
6. Limitaciones	27
7. Conclusión	27
8. Bibliografía.....	28

1. Resumen

Las mitocondrias son esenciales para la producción de energía en forma de adenosín trifosfato (ATP) mediante la fosforilación oxidativa (OXPHOS). La función mitocondrial depende de la correcta operación del sistema OXPHOS, crucial para la producción de ATP y la regeneración de NAD⁺ a partir de NADH. Sin embargo, los medios de cultivo convencionales no reflejan las concentraciones plasmáticas de metabolitos, afectando la biogénesis mitocondrial y la función del OXPHOS. Este estudio analiza la influencia de los medios de cultivo en la función mitocondrial mediante una revisión bibliográfica y una parte experimental. La revisión destaca la importancia de la concentración de glucosa y suero fetal bovino (FBS), la suplementación con uridina y piruvato, y el uso de medios fisiológicos como Plasmax y HPLM. Por ejemplo, la uridina y el piruvato restauraron la actividad metabólica en fibroblastos con disfunción OXPHOS y mejoraron la supervivencia en modelos animales. En la parte experimental, se cultivaron dos líneas de fibroblastos humanos inmortalizados (una control y una con mutación en TSMF) en medios con diferentes concentraciones de glucosa (25 mM y 5 mM) y FBS (10% y 2,5%). Se evaluó el efecto de los medios en parámetros como el crecimiento y la morfología celular y mitocondrial, incluyendo la producción de ATP. Los resultados mostraron que el tipo de medio influye significativamente en el crecimiento celular, destacando que la concentración de FBS tiene un mayor impacto que la de glucosa. Además, al comparar el control con el mutante, se observó que la reducción de glucosa y/o FBS alteró fenotipos como la tasa de crecimiento celular. Se concluye que, aunque los medios de cultivo proporcionan un ambiente óptimo para el crecimiento celular, no reflejan condiciones fisiológicas, lo que puede enmascarar fenotipos presentes en pacientes y afectar la interpretación de los estudios celulares.

Abstract:

Mitochondria are essential for the production of energy in the form of adenosine triphosphate (ATP) through oxidative phosphorylation (OXPHOS). Mitochondrial function depends on the proper operation of the OXPHOS system, which is crucial for ATP production and the regeneration of NAD⁺ from NADH. However, conventional culture media do not reflect plasma metabolite concentrations, affecting mitochondrial biogenesis and OXPHOS function. This study analyses the influence of culture media on mitochondrial function through a literature review and an experimental component. The review highlights the importance of glucose and fetal bovine serum (FBS) concentrations, supplementation with uridine and pyruvate, and the use of physiological media such as Plasmax and HPLM. For example, uridine and pyruvate restored metabolic activity in fibroblasts with OXPHOS dysfunction and improved survival in animal models. In the experimental part, two lines of immortalized human fibroblasts (one control and one with a TSMF mutation) were cultured in media with different glucose (25 mM and 5 mM) and FBS (10% and 2.5%) concentrations. The effect of the media on

parameters such as cellular and mitochondrial growth and morphology, including ATP production, was evaluated. The results showed that the type of medium significantly influences cell growth, with FBS concentration having a greater impact than glucose concentration. Additionally, when comparing the control with the mutant, it was observed that the reduction of glucose and/or FBS altered phenotypes such as the rate of cell growth. It is concluded that, although culture media provide an optimal environment for cell growth, they do not reflect physiological conditions, which can mask phenotypes present in patients and affect the interpretation of cellular studies.

2. Introducción

Las mitocondrias son orgánulos presentes en el citoplasma de las células eucariotas y son las encargadas de realizar múltiples funciones como la homeostasis del calcio (1–3), la beta oxidación de ácidos grasos, entre otros. Pero la principal función es la producción de energía en forma de adenosín trifosfato (ATP) (2,4), mediante el sistema de fosforilación oxidativa (OXPHOS) (2). Este sistema consta de cuatro complejos enzimáticos de la cadena de transporte de electrones, llamados complejos I-IV, y dos transportadores móviles de electrones (Fig. 1), que, al transferir electrones hasta el oxígeno molecular, generan un gradiente de protones entre la membrana mitocondrial interna y el espacio intermembrana, que actúa como una fuerza motriz para la síntesis de ATP, gracias a la ATP sintasa (complejo V). El ATP generado se transloca al citoplasma, donde proporciona energía química para una variedad de procesos celulares (5). Además de la función energética, el sistema OXPHOS es vital en el mantenimiento del equilibrio redox celular mediante la preservación de un alto equilibrio NAD^+/NADH , que a su vez son cofactores de numerosas reacciones metabólicas (6). Por lo tanto, la disfunción de OXPHOS también tiene impacto indirecto pero importante en numerosas reacciones metabólicas celulares que dependen de esos cofactores.

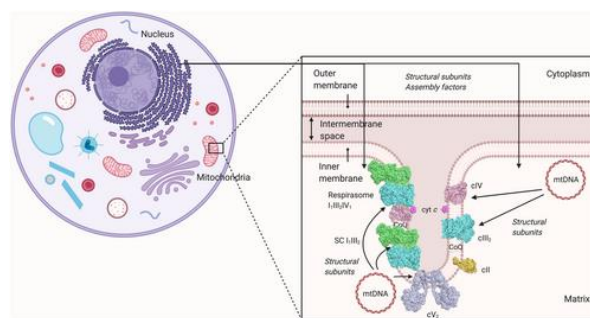


Figura 1 Representación de una parte de la estructura mitocondrial y la posición de este orgánulo en la célula eucariota.

Fuente: (5)

Otra característica distintiva de las mitocondrias es la posesión de un genoma propio, conocido como DNA mitocondrial (DNAm_t), que difiere del DNA nuclear. Se trata de un genoma circular de 16,6 kb (2) que contiene 37 genes, de los cuales solo 13 codifican proteínas del sistema de fosforilación oxidativa (OXPHOS) (7). Las, al menos, 70 proteínas del sistema OXPHOS restantes (2), son

codificadas por el genoma nuclear (DNAn) y deben ser translocadas dentro del orgánulo, lo que subraya la interdependencia entre ambos genomas para el óptimo funcionamiento mitocondrial.

La disfunción o enfermedad mitocondrial se definen como los “trastornos de la generación de energía que afectan directa o indirectamente la producción de ATP a través del sistema de fosforilación oxidativa (OXPHOS)” (7) y se originan por la presencia de mutaciones en el DNA mitocondrial (DNAm) o en genes nucleares, en algunos casos con la influencia adicional de factores externos como drogas o toxinas. Estas alteraciones pueden presentarse a cualquier edad en asociación con una gran heterogeneidad clínica, con síntomas que afectan a un solo órgano o tejido, o afectación multisistémica. La heteroplasmia, donde coexisten copias del DNAm mutante y otras copias sin la mutación en las células, contribuye a esta diversidad clínica. No existe cura para la disfunción mitocondrial que sufren la gran mayoría de los pacientes con enfermedad mitocondrial (2).

Existen diferentes indicadores que se pueden medir para analizar la función mitocondrial. Uno de ellos es la tasa de consumo de oxígeno (OCR, en inglés *Oxygen Consumption Rate*), puesto que el oxígeno celular se consume principalmente en la producción de ATP mediante el sistema OXPHOS. Otro indicador podría ser precisamente la propia producción de ATP mitocondrial. Finalmente, la integridad del sistema OXPHOS se puede analizar mediante medidas de la actividad enzimática de los complejos I-V o incluso analizando los niveles de subunidades de los complejos (mediante electroforesis y western blot) (8).

Para validar nuevas mutaciones (tanto en el DNAn o DNAm) como causantes de una enfermedad mitocondrial, se utilizan diferentes modelos celulares resumidos en la siguiente imagen:

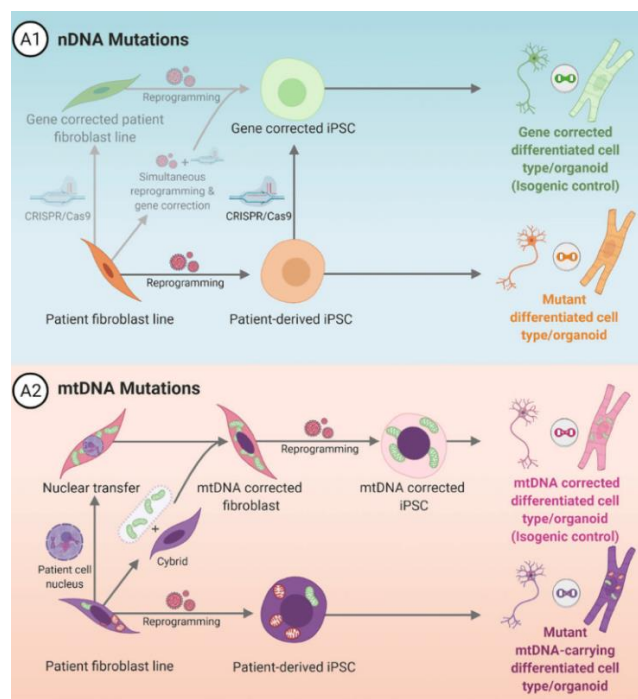


Figura 2: Modelos para estudiar las enfermedades mitocondriales. Fuente: (7)

Como se observa en la imagen, algunos de los modelos celulares comúnmente utilizados en la investigación de las enfermedades mitocondriales son los híbridos trasmitocondriales y las células madre pluripotentes inducidas (iPSCs).

Los híbridos se crean fusionando un tipo de células del donante como las plaquetas (carentes de núcleo, pero con DNAm) con una línea celular a la que se le ha desprovisto de DNAm (células Rho0) (9). Esto permite estudiar cómo las mutaciones en el DNA mitocondrial afectan la función celular en distintas líneas celulares que comparten el mismo fondo genético nuclear y son crecidas en las mismas condiciones.

Mientras que la técnica de iPSCs, consiste en reprogramar las células somáticas mutadas del paciente o de los controles en iPSC, mediante la introducción de cuatro "factores Yamanaka": Oct3/4, Sox2, c-Myc y Klf4 (3). Por lo tanto, se obtienen tanto las iPSC derivadas del paciente o controles sanos (en el caso de mutaciones en el DNAn, iPSC derivadas de pacientes se pueden corregir mediante herramientas de edición genómica (CRISPR/Cas), eliminando la mutación patológica y por lo tanto generando controles genéticamente idénticos al paciente) y se diferencian en distintos tipos de células diana. Esto permite investigar la fisiopatología de los mismos órganos afectados en los pacientes y desarrollar enfoques de intervención terapéutica para estas enfermedades (3).

Un aspecto crucial en la investigación de la función mitocondrial son los medios de cultivo. En general, las composiciones de estos medios no se asemejan a las del plasma humano y se sabe que la concentración de diferentes metabolitos en estos medios influye en la biogénesis mitocondrial y la función de la fosforilación oxidativa (OXPHOS) (10). Se ha demostrado que incluso una pequeña variación del medio de cultivo, como es la modificación de un sólo componente, puede conllevar cambios drásticos en el metabolismo celular (11–13). Por ejemplo, un aumento en la concentración de glucosa del medio de cultivo de 5.5 a 30 mM (respecto a 4 – 5,4 mM que hay en el plasma) disminuye significativamente el potencial de membrana mitocondrial interna, el consumo de oxígeno, el número de copias de DNAm y los niveles de ARNm del factor de transcripción mitocondrial A (TFAM) en células HepG2 (10).

En cuanto a tipos de medios de cultivo, históricamente se han desarrollado desde formulaciones básicas como el “medio esencial mínimo” (MEM) hacia variantes más complejas como el “Medio Eagle modificado de Dulbecco” (DMEM) (14), que cuadruplica las concentraciones de aminoácidos y vitaminas (15,16). Existen muchas variantes de este medio como es el medio “DMEM F12”, que incluye componentes adicionales como zinc y tiamina (16,17). Como la formulación del DMEM sigue siendo muy diferente a la del plasma humano, recientemente se han desarrollado 2 nuevos medios de cultivo que se asemejan más, por lo que se les conoce como “medios fisiológicos”. Estos medios son el "medio similar al plasma humano" (HPLM) y "Plasmax", desarrollados por los grupos de Sabatini y Tardito, respectivamente (4,16).

En general, la mayoría de los medios de cultivo requieren la suplementación de suero fetal bovino (FBS) (16,18,19), usualmente en concentraciones del 10% al 20% (16). Este suero es una solución rica en proteínas, vitaminas, hormonas, glucosa y una amplia gama de factores de crecimiento esenciales para un óptimo crecimiento y mantenimiento celular (16,17). Sin embargo, la FDA (*Food and Drug Administration*) y la EMA (*European Medicines Agency*) han recomendado limitar el uso del FBS debido a su baja reproducibilidad, el riesgo de contaminación y los problemas éticos asociados con su obtención (16,18). La variabilidad del FBS se atribuye a la presencia de un conjunto indefinido y generalmente no analizado de metabolitos y lípidos polares, cuyas concentraciones pueden variar según el lote y origen del suero (14,16). Existen alternativas en medios de cultivo especializados que utilizan albúmina, transferrina, insulina, factores de crecimiento, péptidos o hidrolizados de proteínas en sustitución del suero (16,18). Además, el FBS se obtiene de fetos bovinos no nacidos, cuya sangre es recolectada mediante punción cardíaca o umbilical, durante el proceso de sacrificio de las vacas gestantes. Por lo tanto, plantea preocupaciones éticas debido a la necesidad de sacrificar animales (18). En respuesta a la recomendación de la FDA y EMA, los medios fisiológicos presentan una reducción significativa del contenido de FBS. En particular, el HPLM utiliza un suero dializado libre de metabolitos polares (20), mientras que Plasmax contiene solo un 2,5% de FBS (16).

El objetivo de este estudio es analizar cómo diferentes medios de cultivo afectan a la función mitocondrial. Mediante una combinación de revisión bibliográfica y experimentación, este trabajo busca reproducir hallazgos previos y aportar nueva información que enriquezca nuestra comprensión del impacto de los medios de cultivo en la función mitocondrial.

3. Metodología

3.1. Búsqueda Bibliográfica

Inicialmente, se realizó una búsqueda en PubMed utilizando la estrategia de búsqueda “cell culture media and mitochondrial function” que obtuvo unos 2000 resultados. Se excluyeron aquellos que incluían la palabra “disease” y los publicados hace más de 5 años, lo que resultó en 203 artículos.

Seguidamente, se realizó otra búsqueda centrada en los medios fisiológicos. Para ello, se utilizó la estrategia de búsqueda: "PLAMAX or HPLM", que inicialmente produjo 44 artículos. Se refinó esta búsqueda excluyendo aquellos artículos que fuesen escritos hace más de 5 años, año en el que lo que resultó en un total ajustado de 27 artículos.

3.2. Líneas Celulares

Se utilizaron dos líneas de fibroblastos humanos inmortalizados (FBI): fibroblastos sanos de un individuo de 15 años, denominados "FBI 15 años", y fibroblastos mutantes "FBI 2469". La línea mutante presentaba una transversión homocigótica en el gen del factor de elongación de traducción mitocondrial

Ts (TSMF), específicamente una sustitución de guanina (G) por citosina (C) en la posición 719 (c.719G>C) del exón 6. Esta mutación produjo un cambio en un aminoácido cisteína (Cys) por serina (Ser) en la posición 240 de la proteína EFTs (Elongation Factor Ts), (Cys240Ser), lo que afectó la función normal de la proteína al disminuir los niveles de EFTs en los fibroblastos del paciente (21).

Las células utilizadas en este estudio ya estaban inmortalizadas, mediante la sobreexpresión del TAg del SV40, un oncogén capaz de inmortalizar las células (22). Este proceso se llevó a cabo transduciendo los fibroblastos de interés con partículas virales que contienen el gen codificante para TAg, utilizando un vector comercial llamado “pLOX-Ttag-iresTK”. La inmortalización se confirmó mediante la observación directa al microscopio invertido durante al menos 10 días en cultivo, donde se observaron cambios en el tiempo de duplicación celular y en la morfología celular.

3.3. Medios de Cultivo

Se prepararon cuatro configuraciones distintas de medios de cultivo para estudiar el impacto de la variación de la concentración de suero fetal bovino (FBS) y glucosa:

Medio 1: Alta Glucosa (25Mm) + Alto FBS (10%): Este medio representa una condición rica en nutrientes, comúnmente utilizada para promover un rápido crecimiento y proliferación celular. Por lo tanto, este es el medio “control”. También se utilizó como medio de mantenimiento celular entre experimentos para asegurar condiciones de crecimiento óptimas y semejantes a la mayoría de los artículos publicados.

Medio 2: Baja Glucosa (5mM) + Alto FBS (10%): Este ajuste reduce la disponibilidad de glucosa mientras mantiene alta la concentración de otros factores de crecimiento y nutrientes a través del FBS.

Medio 3: Alta Glucosa (25mM) + Bajo FBS (2,5%): Aunque la glucosa es abundante, la reducción en el porcentaje de FBS puede afectar otros aspectos del soporte nutricional y hormonal.

Medio 4: Baja Glucosa (5mM) + Bajo FBS (2,5%): Este es el medio más restrictivo en términos de nutrientes, simulando condiciones de estrés metabólico que podrían influir en la dinámica mitocondrial y la preferencia metabólica de las células.

3.4. Materiales:

3.4.1. Reactivos:

- Medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) con Glutamax, que contiene 1 g/L de D-Glucosa y piruvato y 2mM de glutamina.
- Medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) basic (1X) con 4,5 g/L de glucosa.
- TrypLE™ Express.

- PBS pH 7.4 para lavados celulares.
- Suero fetal bovino (FBS) como suplemento para enriquecer los medios de cultivo.
- CellTiter-Fluor™ Cell Viability Assay
- CellTiter-Glo® Buffer
- Colorante azul de tripán

3.4.2. Aparataje:

- Material plástico (placas de 100, tubos eppendorf, falcón de 50 y 15 mL...)
- Microscopio para visualizar y fotografiar las células.
- Countess™ II Automated Cell Counter, con sus respectivos portaobjetos de cámara para el recuento celular Countess™: utilizada para el recuento celular.
- Centrifuga
- Campana de flujo laminar
- Incubador: permite incubar las muestras a una atmosfera de CO₂ al 5% y 37°C.
- Baño termostático: para elevar rápidamente la temperatura de los reactivos a 37°C.
- NOVostar microplate reader de BMG Labtech: sirvió para cuantificar la producción de ATP. Seguidamente, se analizaron los datos utilizando la aplicación NOVostar.

3.5. Procedimientos Experimentales

3.5.1. Cultivos celulares:

Inicialmente, se descongelaron los FBI sacándolos del nitrógeno líquido y colocándolas inmediatamente en un baño a 37°C para una descongelación rápida. Después, se resuspendieron en 1 mL de DMEM con 25 mM de glucosa y 10% FBS o medio control, y se centrifugaron 1000xg durante 5 minutos. Se retiró el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 2 mL de DMEM con 25 mM de glucosa y 10% de FBS, sembrándolo en 10 mL del medio control en una placa Petri de 100 mm para cada línea celular. Las placas se incubaron durante 24 horas a una atmósfera de CO₂ al 5% y 37°C.

Tras 24 horas, se cambió el medio de las placas de cultivo. Estos cambios se realizan eliminando el medio anterior por aspiración y reemplazándolo o bien por el mismo medio, para evitar el agotamiento de los nutrientes o bien por otro medio diferente, en cuyo caso, se requiere un paso intermedio de lavado que consiste en añadir 5mL de solución salina o “PBS”. De esta manera, se lavan los restos del medio anterior.

Cuando las células han ocupado toda la superficie de cultivo, es necesario cambiarlas a una superficie mayor. Para ello se procede a tripsinizar las células, proceso que consiste en utilizar una

enzima llamada tripsina, la cual degrada las proteínas de adhesión celular permitiendo separar las células de la placa donde se cultivan. Para ello, primero se eliminaron los restos de medio realizando un lavado con PBS y se procedió a añadir 1 mL de TrypLE™ Express, incubando las células durante 5 minutos a 37°C, para fomentar la acción de la enzima. Este procedimiento se utilizó de manera rutinaria para mantener las células en cultivo mientras se iban realizando los experimentos.

3.5.2. Recuento celular:

Para el recuento de las células totales y viables presentes en la muestra, se utilizó el colorante llamado “azul de tripán”. Este colorante permite distinguir las células no viables, las cuales se tiñen de azul debido a la permeabilidad de sus membranas dañadas, mientras que las células viables no captan el colorante.

El procedimiento a seguir es el siguiente: Coger 20 μ L de la disolución celular tripsinizada (previa a la centrifugación) y posteriormente 20 μ L del colorante azul de tripán. Cabe destacar que, debido a la tendencia a formar precipitados, se recomienda coger el colorante introduciendo lo mínimo la pipeta. Pipetear varias veces arriba y abajo para homogeneizar la muestra. Coger un portaobjetos de cámara para el recuento celular Countess™ y rellenar ambas cámaras encapsuladas con 20 μ L de la disolución anterior. A continuación, introducir el portaobjetos en el Counter y medir con el método automático. Mediante este procedimiento se obtiene tanto el porcentaje como el recuento numérico de células viables y no viables en la muestra.

El tiempo de doblaje se calculó en Roth V. 2006 Doubling Time Computing, Available from: <http://www.doubling-time.com/compute.php>.

3.5.3. Efecto de los medios sobre el crecimiento celular:

Se llevaron a cabo dos experimentos de curvas de crecimiento para evaluar el impacto de la concentración de glucosa y FBS del medio de cultivo sobre la proliferación celular. El primer experimento se centró en analizar el efecto de cuatro medios de cultivo distintos en la proliferación de fibroblastos humanos de 15 años (FBI 15). El segundo experimento evaluó si uso de los medios menos y más restrictivos (medio 1 y medio 4 respectivamente) modificaban el crecimiento celular del mutante comparado con el control sano. Para ambos experimentos, las líneas celulares se sembraron a una densidad inicial de 30,000 células por pocillo en un volumen de 2 mL de medio de cultivo control en placas de seis pocillos, y se incubaron durante 24 horas a 37°C. Posteriormente, se aspiró el medio, se lavaron las células con 1 mL de PBS, y se reemplazó con 2 mL del medio de cultivo a estudiar. Los medios de cultivo evaluados fueron los siguientes: (**medio 1**: DMEM con 25 mM de glucosa y 10% de FBS; **medio 2**: DMEM con 5 mM de glucosa y 10% de FBS; **medio 3**: DMEM con 25 mM de glucosa y 2.5% de FBS; **medio 4**: DMEM con 5 mM de glucosa y 2.5% de FBS).

En el primer experimento, las células se dejaron incubar durante 72 horas en una atmósfera controlada de 5% de CO₂ a 37°C. En el segundo experimento, la incubación fue de 48 horas bajo las mismas condiciones. En ambos casos, se realizó un recuento celular cada 24 horas y se cambió el medio de cultivo en los pocillos restantes para prevenir el agotamiento de nutrientes. Además, se aseguró que las células no superaran una confluencia del 80% en ningún momento durante el experimento.

3.5.4. Estudio de la bioenergética celular:

En una placa de 96 pocillos con fondo blanco para lectura posterior, se sembraron 30,000 células por pocillo, por quintuplicado, en 100 µL de medio que contenía 25 mM de DMEM y 10% de suero fetal bovino (FBS). La distribución fue la siguiente: dos filas de cada uno de los cuatro medios, donde la primera fila consistía en FBI 15 años y la segunda en "FBI 2469". Los primeros cuatro pocillos de cada fila solo contenían los reactivos y el medio correspondiente, utilizados como blanco. La placa se incubó durante 24 horas a 37°C para permitir la adhesión celular, luego se aspiró el medio con una bomba de aspiración y se lavó cada pocillo con 100 µL de solución salina tamponada con fosfato (PBS). Se aspiró el PBS y se cambió el medio de siembra por 100 µL de medio correspondiente (**medio 1:** DMEM con 25 mM de glucosa y 10% de FBS; **medio 2:** DMEM con 5 mM de glucosa y 10% de FBS; **medio 3:** DMEM con 25 mM de glucosa y 2.5% de FBS; **medio 4:** DMEM con 5 mM de glucosa y 2.5% de FBS). Se incubaron durante 1 hora para permitir la adaptación celular al nuevo medio.

A continuación, se añadieron 100 µL de CellTiter-Fluor™ a cada pocillo y se incubó con una atmósfera de CO₂ al 5% y a 37°C durante 30 minutos. Luego, se cuantificó la viabilidad celular mediante fluorescencia. Esta medición se realizó por fluorescencia en el instrumento "NOVOstar", con una excitación de 380 nanómetros (nm) con un ancho de banda de 10 nm, y una emisión de 520 nm, con una agitación de doble orbital a 600 rpm. Esto permitió cuantificar el número de células viables en cada pocillo.

Posteriormente, se realizaron dos lavados de cada pocillo con PBS. Se añadieron 100 µL de CellTiter-Glo® por pocillo y se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente. El reactivo CellTiter-Glo® se agregó directamente a las células en cultivo, provocando su lisis y la liberación de ATP. Este reactivo contiene una forma estable de la enzima luciferasa (LucPpe2m), que, en presencia de ATP y oxígeno molecular, cataliza la oxidación de la proteína luciferina. Este proceso genera oxiluciferina, utilizando la energía del ATP, y produciendo luz como subproducto (Fig. 3). La intensidad de la luz emitida es proporcional a la cantidad de ATP presente (23). Para la determinación se midió la producción de ATP total (tanto el glucolítico como el OXPHOS) mediante luminiscencia, utilizando un programa disponible en "NOVOstar".

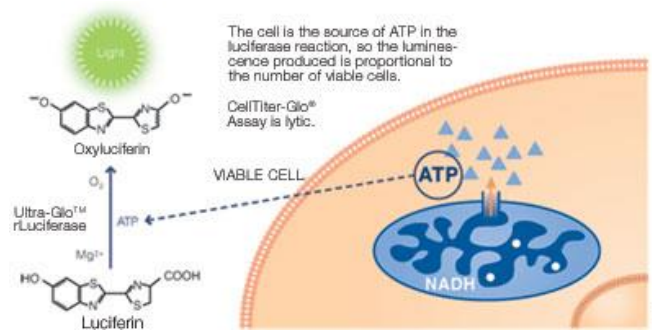


Figura 3: Marco teórico de la medición de ATP mediante luminiscencia. Fuente: (23).

4. Resultados

4.1. Revisión Bibliográfica

Como ya se ha comentado, las investigaciones sobre la función mitocondrial suelen realizarse utilizando un medio DMEM, el cual puede presentar una composición muy variable.

Una de las variaciones más frecuentes es la concentración de glucosa. Pinho et al. analizaron la relación entre la concentración de glucosa del medio de cultivo y los parámetros bioenergéticos mitocondriales. Para ello, cultivaron fibroblastos humanos en 3 variantes del medio DMEM: OXPHOSm que carecía de glucosa debido al reemplazo de glucosa por galactosa, LGm y HGm que consistía en DMEM con 5mM y 25mM de glucosa, respectivamente. Al medir la tasa de consumo de oxígeno (OCR) y la tasa de acidificación extracelular del medio (ECAR) de las células cultivadas en los distintos medios se observó que solo el OXPHOSm proporcionaba la capacidad de reaccionar a las demandas energéticas celulares. Por otro lado, se observó un aumento interesante en el ECAR en las células cultivadas en LGm, mientras que no se observaron diferencias en el medio HGm. El aumento de la OCR observado en el medio OXPHOSm se relacionó con un incremento general en la capacidad celular para oxidar los sustratos del ciclo del TCA y una mayor preferencia por los ácidos grasos, el lactato y el glicerol fosfato. Por lo tanto, concluyeron que el reemplazo de glucosa por galactosa en el medio de cultivo hace que los fibroblastos sean más eficientes ante las demandas de energía y que no dependan de la glucosa para la obtención de ATP. Además, se observó un aumento de la biogénesis mitocondrial, reflejado en un incremento de la concentración de PGC1- α , el regulador principal de la biogénesis mitocondrial. En cuanto a los medios con glucosa, se observó que el DMEM con 5 mM de glucosa, en comparación con el DMEM con 25 mM, aumentó la masa mitocondrial pero no la actividad mitocondrial, ya que se incrementó el área de la red mitocondrial, pero no se observaron cambios significativos en la OCR. Además, no se detectaron cambios significativos en el metabolismo de las células cultivadas en cada uno de estos medios, ya que no hubo variaciones en los niveles de transcripción ni en la preferencia de sustrato (24).

En la línea del estudio de Pinho y colaboradores, otros estudios proponen el reemplazo de la glucosa por galactosa en el medio de cultivo para fomentar la actividad de OXPHOS (24–26). Como, por ejemplo, Pereira et al., quienes analizaron el efecto de suplementar el medio de cultivo con galactosa y glutamina. Para ello, cultivaron fibroblastos humanos en 2 medios DMEM: “HGm” y “OXPHOSm”, cuyas diferencias eran el remplazo 25mM de la glucosa del medio HGm por 1,8 g/L de galactosa, 0,584 g/L de L-glutamina en el OXPHOSm. Ambos medios se suplementaron con 1,8 g/L de bicarbonato de sodio, 0,11 g/L de piruvato de sodio y 10% FBS. Se midieron la tasa de consumo de oxígeno, la producción de ATP y la remodelación mitocondrial a nivel transcripcional, entre otros parámetros. Se observó que las células cultivadas en OXPHOSm mostraron una red mitocondrial más alargada y un aumento en la actividad de la ATP sintasa en comparación con las células cultivadas en HGm. Además, en otro estudio donde se cultivaron células de cáncer de hígado humano “HepG2” en OXPHOSm, se concluyó que la tasa de crecimiento celular no se alteraba independientemente del medio de cultivo utilizado, mientras que el consumo de oxígeno (OCR) y los niveles de ATP aumentaban cuando las células se cultivaban en OXPHOSm. Por otro lado, se observó un incremento en la concentración de la proteína TOM20, un indicador de la masa mitocondrial, así como otros indicadores indirectos de la masa mitocondrial, como el DNAmT y la citrato sintasa, lo que confirma un aumento en la masa mitocondrial y posiblemente en la biogénesis mitocondrial. A diferencia de Pinho y colaboradores, no se encontraron aumentos en la concentración de PGC1- α . De manera similar, se demostró que en mioblastos C2C12 de músculo de ratón, la biogénesis mitocondrial puede ser inducida por niveles suprafisiológicos de piruvato de sodio a través de un mecanismo independiente de PGC1- α (26).

Otra de las variaciones más frecuentes del medio DMEM es la concentración de suero fetal bovino (FBS) empleada. Para analizar si concentración de FBS afectaba a los parámetros bioenergéticos mitocondriales, Bernardini et al. cultivaron células IPEC-J2, células epiteliales porcinas intestinales del yeyuno, en un medio DMEM con 4,5 g/L glucosa suplementado con 5 o 10% de FBS. Se observó que la suplementación de 10% FBS, respecto al 5%, aumentó la producción de ATP total y OXPHOS, sin afectar la glucólisis. Por lo que concluyeron que a mayor concentración de FBS, se aumenta la dependencia de OXPHOS para la producción de ATP (4). Una de las hipótesis de este hallazgo podría ser la cantidad de lípidos que contiene el suero fetal bovino. En las investigaciones de Pinho y colaboradores, el medio OXPHOSm se relacionó con un incremento en la capacidad para oxidar ácidos grasos, los cuales eran obtenidos principalmente del FBS (24). Además, según Bayona y colaboradores, la suplementación del medio con 10% FBS aporta un 1% de los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) que hay en los tejidos humanos, los cuales no son capaces de generar por la célula y deben suministrarse de forma endógena. El motivo de que sea una cifra tan baja se debe a que en el rumen de los bovinos se hidrogenan la mayoría de los PUFA administrados con la dieta (10). Lee et al. analizaron la relación entre la concentración de PUFA en el medio de cultivo y la función mitocondrial. Para ello cultivaron mioblastos C2C12 de ratón en DMEM sin tratamiento (control) o con 50 μ M de ácido palmítico (PA),

ácido eicosapentaenoico (EPA) o ácido docosahexaenoico (DHA). Se midieron el número de copias de DNAm_t mediante real time PCR midiendo la expresión de ciertos genes como PGC-1 α y TFAM. Se observó un aumento significativo en el número de copias de DNAm_t en las células del músculo esquelético de los ratones, concluyendo que la suplementación con EPA y DHA podría mejorar la replicación mitocondrial en las células del músculo esquelético. Además, se observó que las células cultivadas suplementadas con EPA y DHA aumentaron el potencial de la membrana mitocondrial interna y la producción de ATP, y regularon al alza genes que codifican factores regulatorios para la biogénesis mitocondrial y el metabolismo oxidativo (10,27).

En ocasiones, se añaden suplementos a los medios de cultivo comerciales para facilitar el estudio de ciertas enfermedades a investigar. En el caso de las enfermedades mitocondriales, los suplementos más comunes son la uridina y el piruvato (28). Se comprobó que las células con deficiencias de DNAm_t dependían de estos compuestos para su crecimiento debido a la ausencia de una cadena respiratoria funcional. La uridina es vital en la síntesis de novo de pirimidinas. Mientras que el piruvato ayuda a la utilización del exceso de NADH citosólico que se acumula en ausencia de una cadena respiratoria funcional, por la acción de la lactato deshidrogenasa (LDH), catalizando la conversión de piruvato en lactato y regenerando el NAD⁺ citosólico (29,30). En el estudio de Adant et al. se quería comprobar los efectos de suplementar el medio de cultivo con piruvato y uridina en células con una disfunción OXPHOS. Para ello, se reclutaron fibroblastos de la piel tanto de pacientes sanos, empleados como grupo de control, como de 17 líneas celulares de pacientes con enfermedades mitocondriales. Estas líneas celulares abarcaban disfunciones complejas aisladas, incluyendo 8 líneas celulares con defectos en el complejo I, 2 líneas celulares con defectos en el complejo IV y 2 líneas celulares con defectos en el complejo V, así como 5 líneas celulares con deficiencias combinadas que afectaban la maquinaria de traducción mitocondrial. Dichas células se cultivaron en un medio DMEM con glucosa 5,5 mM y glutamina 2 mM, suplementado con 1 mM piruvato y 200 μ M uridina. Se observó una restauración completa de las actividades metabólicas en el grupo con deficiencia de OXPHOS tras el tratamiento con piruvato y uridina en términos de abundancia. También se probó que al alimentar a larvas de pez cebra expuesta 7 días a rotenona con 25 mM de piruvato y uridina, la tasa de supervivencia de los peces aumentaba al 80%. De la misma manera, este parámetro aumentaba al 44% tras 4 h de la administración de 150 mM y 200 mM de rotenona en comparación con los que no fueron alimentados con piruvato y uridina, respectivamente. Sin embargo, en un estudio similar, pero utilizando otro organismo modelo, la suplementación con uridina a larvas de *Caenorhabditis elegans* en estadio L3, previamente tratadas con bromuro de etidio, rescató la detención larval en un pequeño porcentaje de animales, probablemente debido a limitaciones en la biodisponibilidad, mientras que la suplementación con piruvato empeoró el fenotipo (30). El bromuro de etidio induce la detención de larvas en el estadio L3 en este nematodo, por lo que dicho estadio se considera un indicador de disfunción mitocondrial en este modelo celular. La transición del estadio L3 a L4 implica un mecanismo de detección de energía

que actúa como un punto de control del desarrollo, activado en mutantes o en animales tratados con fármacos cuando surge un déficit energético. Por lo tanto, la uridina resultó mejorar la función OXPHOS levemente, pero el piruvato no (28).

En otro estudio se observó una correlación positiva entre las concentraciones elevadas de piruvato (1 mM) y la presencia del factor inducible por hipoxia 1α (HIF1 α) en células de cáncer de mama triple negativo “BT549” cultivadas en DMEM-F12 y Plasmax (10,12). Estos medios presentan concentraciones supranormales de piruvato ya que el plasma contiene entre 9,3 y 59,7 μ M de piruvato. Se concluyó que las concentraciones supranormales de piruvato estabilizan el factor inducible por hipoxia 1α (HIF1 α) incluso en condiciones de normoxia. Además, la supresión de la biogénesis mitocondrial, mediada por la vía HIF, redujo el número de mitocondrias en este modelo de células cancerosas (10).

Como se ha mencionado anteriormente, el principal problema de los medios de cultivo en el estudio de las enfermedades mitocondriales es que no reproducen las condiciones fisiológicas presentes en el plasma humano, lo que puede interferir en la actividad del sistema OXPHOS, entre otros procesos. Por ello, resulta interesante estudiar los medios fisiológicos, como HPLM y Plasmax, cuyas configuraciones se asemejan a las concentraciones del plasma. Golikov et al(13). investigaron cómo el cultivo celular en medio Plasmax afecta la función mitocondrial. Cultivaron cuatro líneas celulares (Huh 7.5, un hepatoma humano; A549, un adenocarcinoma humano; HeLa, un adenocarcinoma cervical; y Vero E6, células renales de mono verde) en Plasmax y en diferentes medios de control: Huh 7.5 en DMEM con 25 mM de glucosa, A549 en DMEM-F12, HeLa en MEM (los tres medios se suplementaron con 10% FBS y 2mM de glutamina) y Vero E6 en DMEM con 25 mM de glucosa suplementado con 2%. Se evaluó la morfología celular, la respiración mitocondrial y se cuantificó la masa mitocondrial y lisosomal y la renovación mitocondrial mediante “Mitotimer”. Se observó un aumento en la respiración mitocondrial en las células cultivadas en Plasmax en comparación con los controles. Esto se relacionó con una reorganización de la red mitocondrial, caracterizado por un incremento en las mitocondrias filamentosas, que muestran una mayor actividad OXPHOS que las fragmentadas. Se sospecha que este aumento en la respiración está vinculado a una mayor disponibilidad de sustratos para el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA), particularmente ácidos grasos, ya que el uso del etomoxir, un inhibidor de la oxidación de ácidos grasos del TCA, resultó más tóxico para las células cultivadas en Plasmax. Esto sugiere que las células en Plasmax dependen más de la oxidación de ácidos grasos, que son suministrados por el suero añadido al medio de cultivo. Plasmax tiene niveles de suero cuatro veces menores que los medios tradicionales, lo que puede implicar un papel clave de moléculas como la carnitina y la prolina, ausentes en DMEM, en este fenómeno. Además, las células cultivadas en Plasmax presentaron una disminución de la masa lisosomal (13). Hay evidencia de que los lisosomas contienen cistina, cuyo exceso provoca la despolarización mitocondrial y probablemente una reducción en la

OXPHOS, por lo que la disminución de la masa lisosomal podría relacionarse con una mejora de la función mitocondrial.

En otro estudio, Moradi et al. analizaron el efecto del Plasmax y la función mitocondrial, pero a diferencia de Golikov et al. también analizaron la influencia de la concentración de oxígeno. Para ello cultivaron 4 líneas celulares cancerígenas (MCF7, células de cáncer de mama; SaOS2, células de osteosarcoma; LNCaP, células de adenocarcinoma de próstata humano sensibles a andrógenos; y Huh7, células de hepatoma humano) en 2 medios diferentes: DMEM con 25mM glucosa y 10% FBS y Plasmax suplementado con 2,5% FBS. Ambos medios se suplementaban con una solución de penicilina (50 UI/mL) /estreptomicina (50 µg/mL). Las células se incubaron tanto a 18% O₂ como a 5% O₂, simulando las condiciones suprafisiológicas y fisiológicas, respectivamente. Se observó que las células cultivadas en DMEM presentaban un aumento de la ECAR y una disminución de la OCR en comparación con las células cultivadas en Plasmax. Se concluyó que, independientemente de la concentración de oxígeno, las células cultivadas en DMEM mostraron un metabolismo más fermentativo en comparación con las células en Plasmax, que exhibieron un metabolismo más oxidativo (11).

El otro medio fisiológico a analizar es el HPLM. Para analizar la relación con la función mitocondrial, Cantor et al. cultivaron 4 líneas celulares: dos líneas de leucemia mieloide aguda (NOMO1 y SEM) y dos líneas de linfoma de células B (P12-Ichikawa y SUDHL4), en HPLM (suplementado con 10% suero dializado) en comparación a RMPI 1640 (suplementado tanto con FBS como con suero dializado al 10%). Midieron el estado redox y la OCR, entre otros, y concluyeron que las células cultivadas en HPLM presentaban una disminución en las concentraciones de las parejas redox GSH/GSSG y NAD/NADH en comparación con las cultivadas en RMPI. Por otro lado, se observó una reducción en las concentraciones de citrato y una disminución en la OCR basal en las células cultivadas en HPLM. Esto sugiere que el medio HPLM influye en la función mitocondrial al alterar el estado redox y disminuir la capacidad respiratoria basal (14).

Dada la evidencia encontrada en la literatura sobre la relación entre la función OXPHOS y los medios de cultivo, hemos decidido estudiar experimentalmente el efecto del FBS y de la disponibilidad de la glucosa sobre la función OXPHOS. Como se ha comentado, la suplementación de 10% frente al 5% FBS al medio DMEM mejoró la función mitocondrial en células IPEC-J2 (4). Mientras que en las células cultivadas en Plasmax se propuso que el aumento de la respiración celular podría deberse a la disminución de % FBS (13). En cuanto a la glucosa, aunque concentraciones suprafisiológicas de glucosa (25Mm) han mostrado aumentar la proliferación celular, las investigaciones de Pinho et al. y Pereira et al. indican que la sustitución de glucosa por galactosa promueve un incremento en la tasa de consumo de oxígeno (OCR), la producción de ATP y la biogénesis mitocondrial (24,26).

4.2. Parte Experimental

Efecto del medio de cultivo sobre el crecimiento celular en fibroblastos control

La información obtenida en nuestra revisión bibliográfica evidencia que la composición del medio de cultivo puede ser determinante para las funciones celulares. Por ello, para ensayar el efecto de la disponibilidad de glucosa y de la concentración de FBS sobre la función celular, realizamos curvas de crecimiento con fibroblastos control (FBI 15 años), y 4 medios con distintas variantes en estos parámetros (**medio 1:** DMEM con 25mM glucosa y 10%FBS, **medio 2:** DMEM con 5mM glucosa y 10%FBS; **medio 3:** DMEM con 25mM glucosa y 2,5%FBS; **medio 4:** DMEM con 5mM glucosa y 2,5 %FBS) por triplicado.

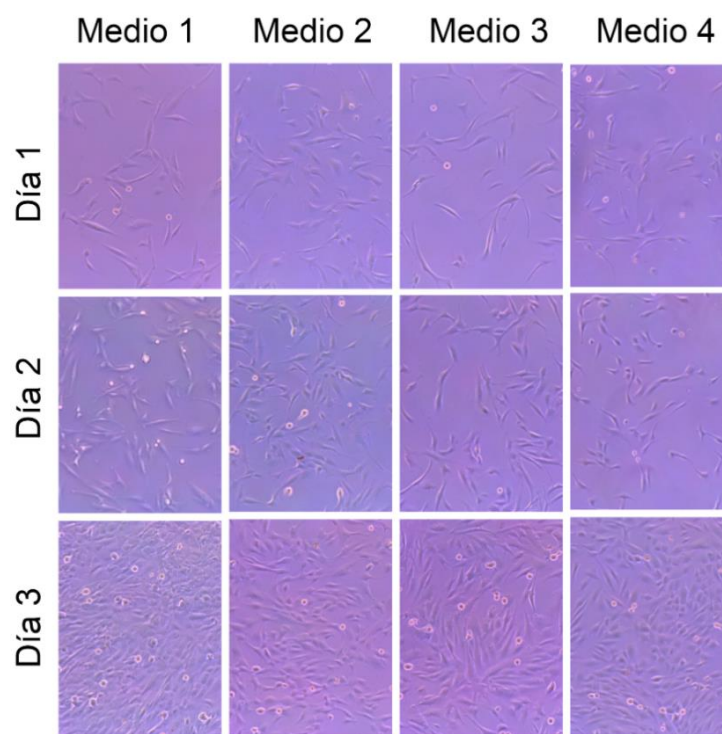


Figura 4: Fotografías de las células de FBI de 15 años cultivadas en los 4 medios de cultivo durante 3 días.

En esta imagen se observan fotografías representativas realizadas a las placas cultivadas en cada uno de los 4 medios durante los 3 días a estudiar. Se puede apreciar un aumento gradual del número de células con el paso de los días. Y parece ser que al tercer día la condición cultivada con alta glucosa y mayor concentración de suero bovino fetal (medio 1) presenta un mayor número celular con las células dispuestas en una monocapa. Por otro lado, a simple vista, no se aprecia ningún cambio a nivel morfológico significativo. Esto indica que los distintos medios ensayados contienen suficientes nutrientes para que las células puedan realizar sus funciones celulares, aunque parecen observarse diferencias cualitativas en la velocidad de crecimiento.

Para poder comparar de manera cuantitativa el crecimiento celular en cada medio de cultivo y valorar la aptitud de cada medio, se procedió al contaje celular. Inicialmente, se analizó el número de células presentes en cada condición al paso del tiempo. Después de haber sembrado las células en medio completo y haber contado el número de células iniciales adheridas a la placa (día 0), se procedió a cambiar el medio por los 4 medios de ensayo y a contar las células cada 24 horas en las distintas condiciones. Los resultados se muestran en la siguiente gráfica:

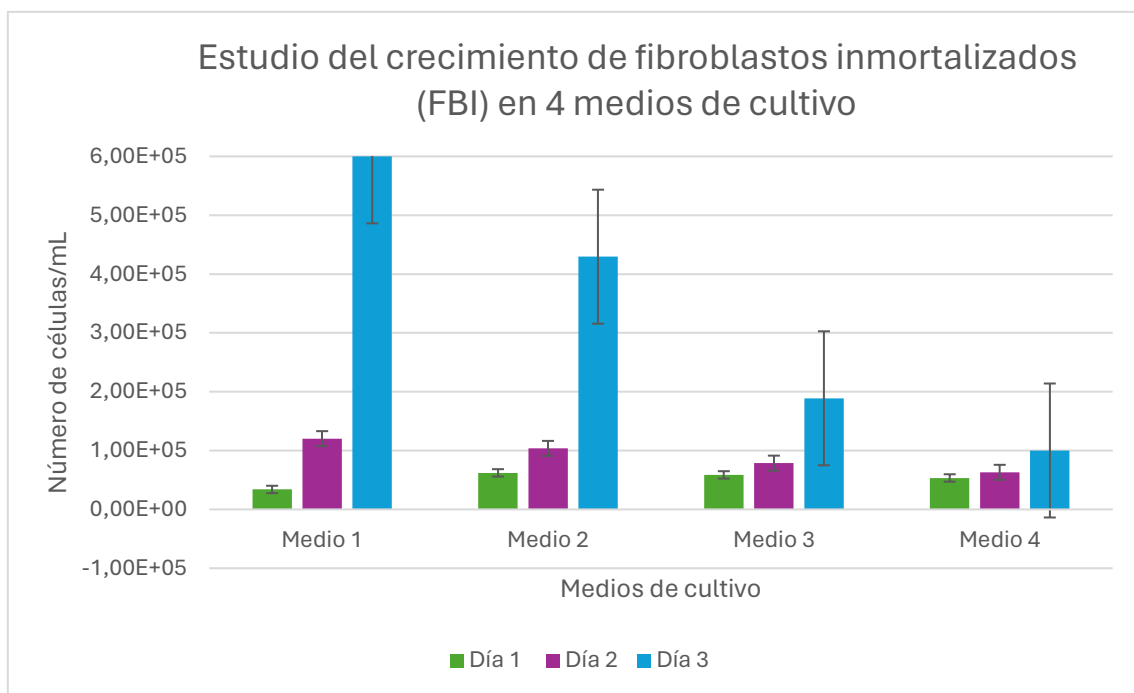


Figura 5: Número de FBI cultivados en 4 medios durante 3 días. Se presenta la media \pm desviación estándar (N=3)

Pudimos observar que, en todos los medios, el número de células aumentaba con el paso del tiempo. Este resultado concuerda las observaciones anteriores derivadas de las imágenes obtenidas de estos experimentos. Sin embargo y de forma muy interesante, el análisis reveló patrones de crecimiento celular distintos entre los medios:

Pudimos observar que los medios 3 y 4 (con menor concentración de FBS) presentan un menor número de células en el punto final del experimento (día 3) y también un menor aumento de número de células en días consecutivos. De la misma manera, los medios con menor concentración de glucosa (medios 2 y 4) presentan unos números absolutos menores que los medios con alta glucosa (1 y 3), al igual que parecen tener aumentos menores del número de células entre los distintos días.

Tasa de Crecimiento celular de FBI 15 años en los 4 medios de cultivo:

A pesar de poder confirmar el efecto de los distintos medios de cultivo sobre el crecimiento celular, dado que hay pequeñas variaciones en el número de células sembradas iniciales y contadas cada día en cada condición, resulta complicado poder concluir con este análisis que medios afectan en mayor

y menor medida al crecimiento celular. Por ello, con el fin de realizar una comparación más detallada del comportamiento de las células en cada medio, se calculó la tasa de crecimiento usando la siguiente fórmula, donde la N es el número de células en un determinado día:

$$\text{Tasa de crecimiento (\%)} = \frac{N^{\circ} \text{ células día } N - N^{\circ} \text{ células día } 0}{N^{\circ} \text{ células día } 0} \times 100$$

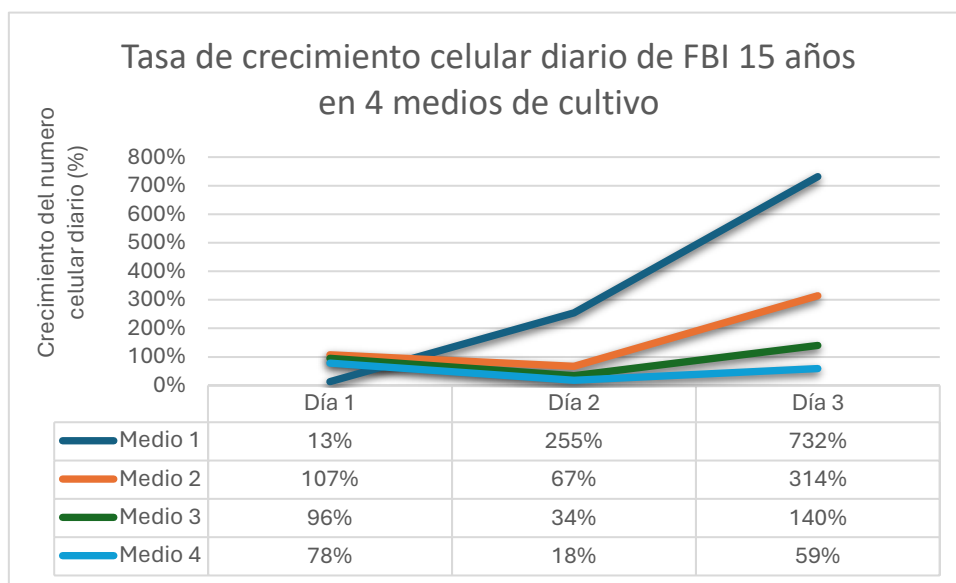


Figura 6: Tasa de crecimiento celular diario (%) de FBI 15 años cultivados en 4 medios de cultivo diferentes.

De manera consistente, pudimos observar que el crecimiento celular aumentaba con el paso del tiempo. En el caso de los medios con una baja concentración de FBS (3 y 4), se observa un crecimiento mucho menor que en los medios con una alta concentración de suero (1 y 2). De manera general, los medios con alta glucosa (1 y 3), mostraron una tasa de crecimiento mayor que los medios con baja glucosa (2 y 4). Por lo tanto, se observa que las células cultivadas en el medio más restrictivo (medio 4), presentaron un menor crecimiento que las cultivadas en el medio menos restrictivo (medio 1) (Figura 6). Para confirmar estos resultados se utilizaron los datos de número de células a día 1 y día 2 en cada condición y se calculó el tiempo de doblaje de las células en cada línea celular. Similarmente a los resultados anteriores, las células crecidas en medios con bajo suero (3 y 4) necesitaban más tiempo para doblarse que las de medios con alto suero (1 y 2), una alta concentración de glucosa (1 y 3) disminuyó el tiempo de doblaje comparado con baja glucosa (2 y 4) y el medio más restrictivo septuplicó el tipo de doblaje en comparación con el medio menos restrictivo (medio 1) (Figura 7).

Medio 1	Medio 2	Medio 3	Medio 4
13,14	32,46	56,75	100,5

Figura 7: Tiempo de doblaje calculado con la media del número de células entre los días 1 y 2. (horas)

Como hemos visto que en una línea control las células crecen de distinta manera, puede ser que la elección del medio sea determinante cuando queramos estudiar la función celular de líneas celulares mutantes, en comparación con las control. Para ello seleccionamos dos medios de cultivo (más y menos restrictivos, medio 1 o control y el medio 4, respectivamente) y repetimos los estudios de crecimiento celular con fibroblastos control y una línea celular con una mutación en TSFM, a los cuales hemos denominado FBI 2469.

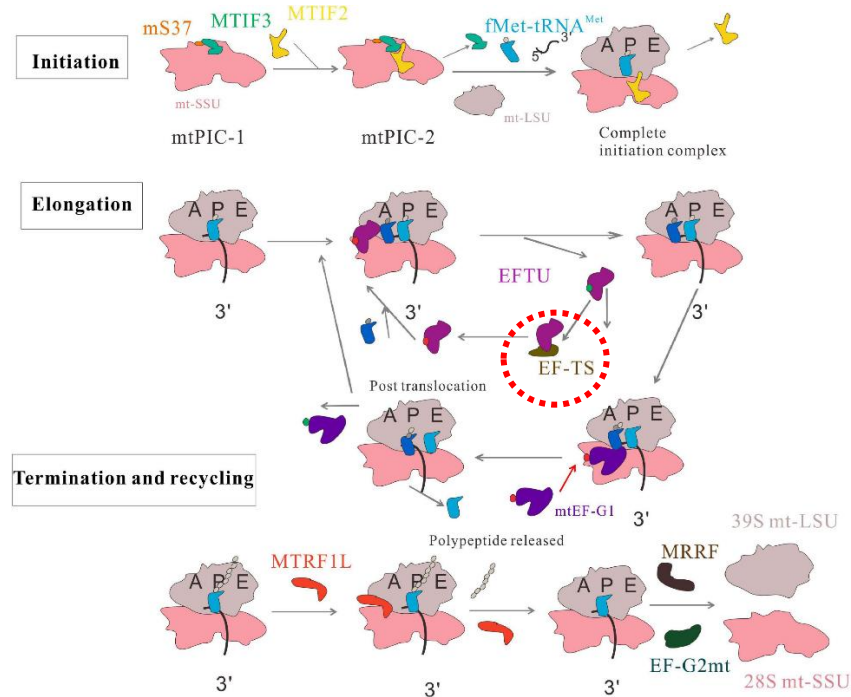


Figura 8: Papel del gen TSFM en la traducción. Fuente: (31)

Cabe destacar que la línea mutante empleada (FBI 2469) presenta una mutación en el exón 6 del gen TSFM, que codifica la proteína conocida como "factor de elongación de la traducción mitocondrial Ts" (EF-Tsmt) (21). Esta proteína participa en la síntesis proteica mitocondrial. Exactamente su función es la de facilitar la liberación de GDP del complejo EFTU · GDP para formar un heterodímero estable EFTU · EF-TS. Luego, el GTP promueve la separación de EF-TS de este complejo, regenerando el EFTU · GTP, que se une a otro aminoacil-tRNA (aa-tRNA). Este complejo ternario se combina con el sitio A del ribosoma. Cuando se establece el reconocimiento correcto del codón: anticodón, el GTP se hidroliza, se libera el EFTU · GDP y el ciclo se repite (31).

La mutación específica, (Cys240Ser), ocurre en la cisteína 240, ubicada en la cadena C β 5 del subdominio EFT del dominio central de EF-Tsmt. Este subdominio interactúa con el dominio III del factor de elongación mitocondrial EFTu. Sin embargo, la sustitución de cisteína por serina se encuentra en el lado opuesto de la hoja β y no afecta la superficie de contacto con EFTu. A pesar de ello, y aunque los niveles de EFTu no variasen, la traducción mitocondrial en fibroblastos de este paciente disminuyó considerablemente comparándola con controles sanos (21).

Por lo tanto, para estudiar el efecto del medio de cultivo sobre la línea mutante, respecto a la control, se realizó la curva de crecimiento cultivando ambas líneas celulares en el medio control: 25mM glucosa suplementado con 10% FBS y el medio más restrictivo que consistía en 5 mM glucosa y 5% FBS. Se cultivaron las células 24 h y se obtuvieron las siguientes imágenes:

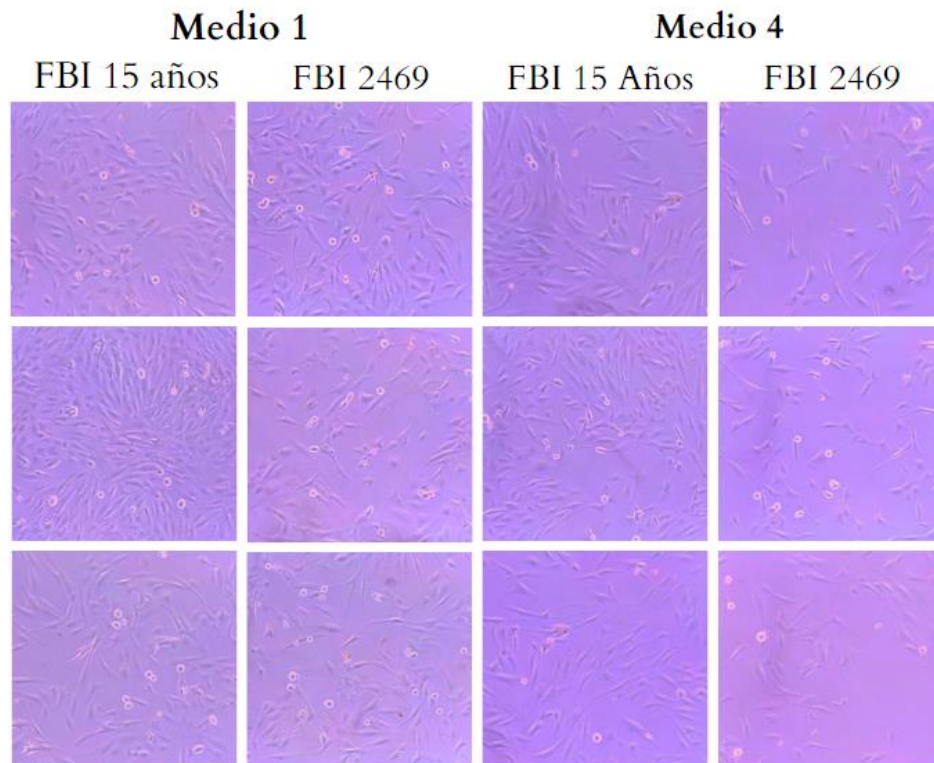


Figura 9: Imágenes obtenidas al microscopio de 2 líneas celulares de FBI (15 años y 2469) tras 24 h de cultivados en 2 medios de cultivo diferentes (medios 1 y 4).

De manera interesante, en el medio menos restrictivo (medio 1) se observa una ligera disminución en el número de células de la línea celular mutante, llegando en algunas imágenes a no apreciarse un cambio importante con el número de las células control. Sin embargo, en el medio más restrictivo (medio 4) se observa claramente una disminución del crecimiento de la línea mutante de TSFM en comparación con el control. De esta manera, parece que el medio de cultivo es importante para poder evidenciar efectos fenotípicos entre mutantes mitocondriales y controles.

Como se ha comentado anteriormente, la función mitocondrial se define como las alteraciones en OXPHOS y, por tanto, alteraciones en la producción de ATP. Por ello, a continuación, se trató de analizar la bioenergética celular. Este experimento nos servirá tanto para comprobar si el crecimiento diferente que observamos en la línea control con distintos medios de cultivo es debido a diferencias en la producción de energía. Por otro lado, podremos confirmar si las diferencias entre control y mutante según el medio, se deben también (al menos en parte) a la bioenergética celular. Para ello se midió el ATP total que producían las células (FBI 15años y FBI 2469) en cada uno de los 4 medios de cultivo. Para representar estos datos gráficamente, empleamos el ATP generado por los fibroblastos de 15 años

en el medio 1 como punto de referencia, asignándole un valor del 100%. Posteriormente, comparamos todos los otros valores con este estándar. Esta normalización de datos permitió identificar las diferencias entre ambas líneas celulares (control y mutante) en cada medio de cultivo.

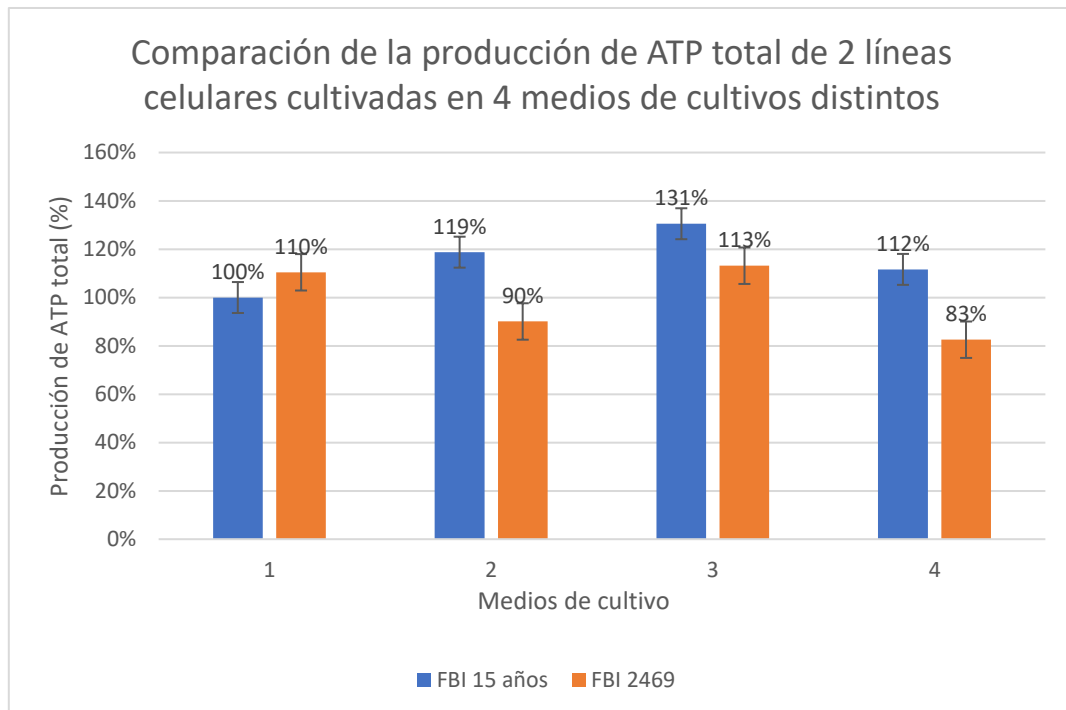


Figura 10: Comparación de la producción de ATP total de FBI cultivadas en 4 medios de cultivos distintos.

El análisis de la gráfica, tras la normalización de los datos, revela que la reducción de glucosa en el medio intensifica las diferencias entre ambas líneas celulares. Por ejemplo, en los FBI 15 años cultivados tanto en el medio 2 como en el 4, se observa un aumento del 29% en la producción de ATP total en comparación con los mutantes cultivados en dichos medios. Por otro lado, una reducción en el contenido de FBS del medio fomenta las diferencias entre ambas líneas celulares. Los FBI 15 años cultivados en los medios 3 y 4, es decir, con bajo suero, presentan un aumento en la producción de ATP del 18% y 29%, respectivamente, en comparación con los fibroblastos mutantes cultivados en dichos medios. En contraste, la variación en la producción de ATP en el medio con alta concentración de glucosa y FBS, medio 1, no fue tan marcada como en el resto de los medios ya que los mutantes produjeron un 10% más de ATP que los controles. Por lo tanto, las mayores discrepancias entre las células control y una línea mutante de TFSM se observan en los medios con baja glucosa y FBS, concluyendo que el medio de cultivo es crucial para evidenciar efectos fenotípicos entre una línea celular con mutación en el gen TFSM y otra línea control.

5. Discusión

Los resultados obtenidos en este estudio ofrecen una visión integral de cómo las condiciones de cultivo influyen en el crecimiento y la bioenergética celular.

En la revisión bibliográfica, se demuestra que la una mínima variación del medio de cultivo puede influir en la función mitocondrial. La concentración de glucosa en los medios de cultivo ejerce un impacto significativo en la función mitocondrial, como se observa en varios estudios (10,24–26). El reemplazo de glucosa por galactosa en el medio (OXPHOSm) mejora la capacidad de las células para responder a demandas energéticas, promoviendo la oxidación de sustratos del ciclo del TCA y aumentando la biogénesis mitocondrial, reflejada en niveles elevados de PGC1- α en algunos estudios. Además, se observa una red mitocondrial más alargada y mayor actividad de la ATP sintasa en células cultivadas en OXPHOSm, en comparación con las cultivadas en medios con alta concentración de glucosa (HGm) (24). Por otro lado, concentraciones elevadas de glucosa en medios como DMEM y RPMI-1640 disminuyen el potencial de membrana mitocondrial, el consumo de oxígeno y la biogénesis mitocondrial, como se observa en células de cáncer de hígado humano HepG2, tal como señalan estudios anteriores (10). Reducciones en la concentración de glucosa promueven una mayor dependencia del metabolismo mitocondrial, aumentando el consumo de oxígeno, la actividad de los complejos respiratorios y los niveles de DNAm y ARNm de genes mitocondriales en diversas líneas celulares (24,26) Además, la disminución de glucosa a niveles fisiológicos o incluso más bajos parece inducir un estado metabólico más oxidativo, esencial para estudiar las enfermedades mitocondriales (26). Las células con mutaciones en genes relacionados con OXPHOS muestran un déficit de función bajo condiciones de glucosa baja, déficit que no se manifiesta en presencia de concentraciones altas de glucosa debido a la supresión de la función OXPHOS en células de tipo silvestre (WT) (10).

La influencia del suero fetal bovino (FBS) en la función mitocondrial también ha sido objeto de investigación. Estudios como el de Bernardini et al. han demostrado que un mayor porcentaje de FBS en el medio de cultivo aumenta la dependencia de la OXPHOS para la producción de ATP y reduce el tiempo de doblaje celular, lo que resalta la importancia de considerar este componente en los protocolos experimentales(4). Esto podría deberse a la concentración de lípidos, pero sobre todo a los PUFA, los cuales han demostrado fomentar la biogénesis mitocondrial (27).

Además de los EPA y DHA, hay varios componentes alimentarios que, según se ha informado, inducen la biogénesis mitocondrial, como el resveratrol, los polifenoles del té verde y la curcumina. Específicamente, el resveratrol aumentó la masa mitocondrial y el contenido de DNA mitocondrial, y la expresión de ARNm de NRF1, TFAM y PGC-1 α en células endoteliales. Además, los polifenoles del té verde aumentaron el número de copias del DNAm y la expresión del ARNm de PGC-1 α y TFAM en los riñones de ratas. Se ha demostrado que la curcumina aumenta el número de copias del DNA

mitocondrial y la desacetilación de PGC-1 α en el músculo esquelético durante el entrenamiento de resistencia de ratas (27).

Por otro lado, la adición de suplementos como uridina y piruvato puede tener un impacto significativo en la función mitocondrial, especialmente en células con deficiencias OXPHOS. Mientras que la uridina puede mejorar la función OXPHOS, el piruvato puede tener efectos variables dependiendo del modelo celular y las condiciones experimentales (6).

Como ya se ha comentado, la concentración de diferentes metabolitos de los medios de cultivo comerciales influye en la biogénesis mitocondrial y la función del sistema OXPHOS. Para evitarlo, se estudió la función mitocondrial en medios fisiológicos como Plasmax y HPLM. La investigación de Golikov et al. sugiere que las células cultivadas en Plasmax exhiben una mayor actividad de la OXPHOS debido a una reorganización de la red mitocondrial y una mayor dependencia de la oxidación de ácidos grasos (13). Por otro lado, Cantor et al. observaron que las células cultivadas en HPLM presentan alteraciones en el estado redox y una reducción en la capacidad respiratoria basal, lo que indica un efecto adverso sobre la función mitocondrial (14).

En cuanto a la parte experimental, nuestros experimentos han demostrado que tanto la concentración de glucosa como la de FBS en el medio de cultivo influyen significativamente en el crecimiento celular de fibroblastos control (FBI 15 años). Las observaciones iniciales a partir de las imágenes tomadas durante los tres días de cultivo indicaron que el medio con alta glucosa y concentración de FBS (medio 1) favorecía un mayor crecimiento celular, con las células organizadas en una monocapa densa al tercer día y sin alteraciones morfológicas apreciables. Esto sugiere que los 4 medios de cultivo probados proporcionan nutrientes suficientes para el mantenimiento celular, aunque con diferencias en la tasa de crecimiento. El conteo celular confirmó estas observaciones cualitativas. Los medios con menor concentración de FBS (medios 3 y 4) mostraron un crecimiento reducido y un mayor tiempo de doblaje en comparación con aquellos con mayor FBS. Estos hallazgos concuerdan con una investigación de Bernardini y colaboradores, que sugiere que mayores concentraciones de FBS resultaron en una mejor proliferación celular y que incrementar la concentración de FBS del medio de cultivo del 5% al 10% reducía el tiempo de duplicación celular (4). De manera similar, los medios con baja glucosa (medios 2 y 4) presentaron un menor número de células que los medios con alta glucosa (medios 1 y 3). Esto indica que tanto la glucosa como el FBS son cruciales para el crecimiento óptimo de los fibroblastos.

Respecto a la concentración de glucosa en los medios de cultivo, aunque las variaciones no fueron tan marcadas como con el FBS, se observó que los medios con mayores concentraciones de glucosa (medios 1 y 3) favorecieron una mayor proliferación celular en comparación con aquellos con menor concentración de glucosa (medios 2 y 4), manteniendo constante la cantidad de suero. Aunque la relación entre la concentración de glucosa y el crecimiento celular ha sido ampliamente debatida y

algunos estudios sugieren que no existe una relación directa, nuestros resultados indican que, al menos para los fibroblastos FBI de 15 años, existe una correlación positiva entre estas dos variables.

Además, durante las observaciones visuales del tercer día de cultivo en el medio 1, se planteó la posibilidad de que las células no crecieran en una monocapa uniforme debido a un posible solapamiento. Este fenómeno podría indicar una alta densidad celular y sugiere la necesidad de futuras investigaciones para medir parámetros como la resistencia eléctrica transepitelial (TEER) en estas condiciones, aunque este parámetro no se analizó en el presente estudio, en las investigaciones de Bernardini y colaboradores concluyeron que la suplementación del medio con 10% FBS en lugar del 5% provocaron un aumento del TEER, lo que indica que crecieron en forma de una monocapa más compacta. Medir la TEER podría ofrecer información adicional sobre la integridad y la confluencia de las monocapas celulares, proporcionando así una comprensión más profunda de las dinámicas de crecimiento celular bajo diferentes condiciones de cultivo (4).

Para comprobar si otras líneas celulares eran tan dependientes del medio de cultivo como los fibroblastos control, y por lo tanto la elección del medio sea determinante a la hora de evidenciar diferencias fenotípicas entre controles y mutantes, se repitió la curva en los dos medios de cultivo más y menos restrictivos. Como se observó mediante las imágenes al microscopio, los fibroblastos cultivados en el medio más restrictivo (medio 4) mostraron una cantidad de células inferior que los controles, mientras que en el medio menos restrictivo (medio 1) las diferencias en el número celular entre ambas líneas celulares no fueron tan significativas. Esto sugiere que los ciertos parámetros fenotípicos de los fibroblastos con mutación en el gen TSMF, como la tasa de crecimiento celular, pueden verse afectados por la condición de baja glucosa y un poco menos, por el bajo FBS. Como ya se ha comentado, este gen codifica una proteína que forma parte de la síntesis proteica mitocondrial. Esto evidencia la importancia crítica que tiene la elección de las condiciones de cultivo en modelos celulares de enfermedad. Ya que esta mutación ha sido descrita en el caso de varias enfermedades entre las cuales se encuentran: encefalomiopatía, miocardiopatía hipertrófica o insuficiencia hepática. Este claro efecto detrimental en condiciones fisiológicas dentro del organismo puede verse enmascarado por medios suprafisiológicos en los modelos celulares (21,31).

La medición de la producción total de ATP en los diferentes medios de cultivo reveló que las mayores discrepancias entre las células control y la línea mutante de TSMF se observan en los medios con baja glucosa y FBS. Sin embargo, la condición de bajo suero o baja glucosa por sí mismas también generaron cambios fenotípicos, evidenciados mediante un menor crecimiento celular. Por lo tanto, se concluye que el medio de cultivo es crucial para evidenciar efectos fenotípicos entre una línea celular con mutación en el gen TSMF y otra línea control.

De manera sorprendente, el medio 3, caracterizado por una alta concentración de glucosa (25 mM) y bajo contenido de suero (2,5% de FBS), fue el que generó mayor cantidad de ATP en ambas

líneas celulares. Este hallazgo podría explicarse por el efecto Warburg o glucólisis aeróbica, que ocurre cuando las concentraciones de glucosa superan un cierto umbral, permitiendo la fermentación alcohólica incluso en presencia de oxígeno (16,19,25). Si esta hipótesis fuese cierta, se esperaría que todas las células cultivadas en alta glucosa (medios 1 y 3) generasen mayores concentraciones de ATP. Sin embargo, este hallazgo solo se cumple en la línea mutante, no en los controles. Por lo tanto, no hay suficiente evidencia para confirmar esta hipótesis de manera concluyente.

Queda aclarar que las investigaciones con los medios de cultivo fisiológicos no siempre pueden extrapolarse a todos los animales, puesto que la composición del plasma y ciertas reacciones metabólicas varían de manera significativa entre especies. Ejemplo de ello es la relación del ácido úrico en el metabolismo de las pirimidinas. No solo se debe a que las concentraciones plasmáticas de ácido úrico sean hasta un orden de magnitud mayores en humanos, chimpancés, gorilas y primates en comparación a otros mamíferos como ratones y vacas, si no que estos últimos metabolizan el ácido úrico a través de otra enzima llamada hepática uricasa, la cual se desactivo durante la evolución de los homínidos (14).

6. Limitaciones

Este trabajo presenta varias limitaciones que deben ser consideradas. En primer lugar, aunque se han analizado algunos parámetros importantes, sería necesario continuar el análisis de más variables que pueden verse modificadas por el medio de cultivo, lo que permitiría una comprensión más completa de la influencia del medio en la función mitocondrial. Además, solo se utilizó una única línea celular mutante. Es posible que otras líneas celulares con defectos en la traducción u otros mecanismos mitocondriales muestren diferencias en su dependencia del medio de cultivo. Por lo tanto, futuros estudios deberían incluir una mayor diversidad de líneas celulares para validar y ampliar estos hallazgos. Por último, el aparato utilizado en el conteo celular es muy sensible al estado de agregación de las células o del colorante utilizado (azul tripán). En ocasiones, observamos valores numéricos de conteo que no encajaban con lo observado de manera visual ni con la velocidad de doblaje de células descrito en la literatura (en varios ordenes de magnitud). Por ello, algunos puntos de las curvas de crecimiento han sido descartados. En cualquier caso, las conclusiones de este TFG, no se han visto afectadas por esta incidencia.

7. Conclusión

En conclusión, el presente estudio destaca la importancia de considerar la composición de los medios de cultivo en los estudios sobre la función mitocondrial. Si bien las concentraciones de glucosa, FBS y otros suplementos del medio de cultivo, como la uridina o el piruvato, pueden proporcionar un ambiente óptimo de crecimiento celular, es fundamental comprender que este entorno no refleja completamente las condiciones fisiológicas. Esta discrepancia puede enmascarar fenotipos relevantes

para las enfermedades mitocondriales, lo que lleva a una interpretación sesgada de los resultados de este tipo de estudios. Por lo tanto, para una comprensión más precisa de los mecanismos subyacentes a la función mitocondrial, es necesario abordar estas limitaciones y considerar cómo los medios de cultivo pueden influir en los resultados experimentales. Una posibilidad sería considerar medios más fisiológicos como Plasmax y HPLM para obtener resultados más representativos de las condiciones in vivo. Alternativamente, se podría reducir la concentración de glucosa o de FBS, siempre y cuando las células mutantes no se vean afectadas negativamente. Estas estrategias ayudarían a avanzar en la comprensión de las enfermedades mitocondriales y a obtener resultados experimentales más fiables y representativos.

8. Bibliografía

1. Diaz F, Moraes CT. Mitochondrial Biogenesis and Turnover. *Cell Calcium* [Internet]. 2008 [cited 2024 May 16];44(1):24. Available from: [/pmc/articles/PMC3175594/](#)
2. Alston CL, Rocha MC, Lax NZ, Turnbull DM, Taylor RW. The genetics and pathology of mitochondrial disease. *J Pathol* [Internet]. 2017 Jan 1 [cited 2024 May 16];241(2):236. Available from: [/pmc/articles/PMC5215404/](#)
3. Chen C, Guan MX. Induced pluripotent stem cells: ex vivo models for human diseases due to mitochondrial DNA mutations. *J Biomed Sci* [Internet]. 2023 Dec 1 [cited 2024 May 16];30(1):1–15. Available from: <https://jbiomedsci.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12929-023-00967-7>
4. Bernardini C, Algieri C, Mantia LD, Zannoni A, Salaroli R, Trombetti F, et al. Relationship between serum concentration, functional parameters and cell bioenergetics in IPEC-J2 cell line. *Histochem Cell Biol* [Internet]. 2021 Jul 1 [cited 2024 Feb 26];156(1):59–67. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33725198/>
5. Fernandez-Vizarra E, Zeviani M. Mitochondrial disorders of the OXPHOS system. *FEBS Lett* [Internet]. 2021 Apr 1 [cited 2024 May 16];595(8):1062–106. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33159691/>
6. Adant I, Bird M, Decru B, Windmolders P, Wallays M, de Witte P, et al. Pyruvate and uridine rescue the metabolic profile of OXPHOS dysfunction. *Mol Metab* [Internet]. 2022 Sep 1 [cited 2024 May 17];63. Available from: [/pmc/articles/PMC9287363/](#)
7. McKnight CL, Low YC, Elliott DA, Thorburn DR, Frazier AE. Modelling Mitochondrial Disease in Human Pluripotent Stem Cells: What Have We Learned? *International Journal of Molecular Sciences* 2021, Vol 22, Page 7730 [Internet]. 2021 Jul 20

- [cited 2024 May 16];22(14):7730. Available from: <https://www.mdpi.com/1422-0067/22/14/7730/htm>
8. Díaz F, Barrientos A, Fontanesi F. Unit 19.4 Evaluation of the Mitochondrial Respiratory Chain and Oxidative Phosphorylation System Using Blue Native Gel Electrophoresis. *Current protocols in human genetics / editorial board, Jonathan L Haines. [et al] [Internet]. 2009 [cited 2024 May 23]; CHAPTER(SUPPL.63): Unit19.4. Available from: /pmc/articles/PMC2771370/*
 9. Wilkins HM, Carl SM, Swerdlow RH. Cytoplasmic hybrid (cybrid) cell lines as a practical model for mitochondriopathies. *Redox Biol [Internet]. 2014 [cited 2024 May 16];2(1):619. Available from: /pmc/articles/PMC4297942/*
 10. Bayona-Bafaluy MP, Montoya J, Ruiz-Pesini E. Oxidative phosphorylation system and cell culture media. *Trends Cell Biol [Internet]. 2021 Aug 1 [cited 2024 May 15];31(8):618–20. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34052102/>*
 11. Moradi F, Moffatt C, Stuart JA. The Effect of Oxygen and Micronutrient Composition of Cell Growth Media on Cancer Cell Bioenergetics and Mitochondrial Networks. *Biomolecules [Internet]. 2021 Aug 1 [cited 2024 Apr 23];11(8). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34439843/>*
 12. Voorde J Vande, Ackermann T, Pfetzer N, Sumpton D, Mackay G, Kalna G, et al. Improving the metabolic fidelity of cancer models with a physiological cell culture medium. *Sci Adv [Internet]. 2019 [cited 2024 Mar 15];5(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30613774/>*
 13. Golikov M V., Karpenko IL, Lipatova A V., Ivanova ON, Fedyakina IT, Larichev VF, et al. Cultivation of Cells in a Physiological Plasmax Medium Increases Mitochondrial Respiratory Capacity and Reduces Replication Levels of RNA Viruses. *Antioxidants (Basel) [Internet]. 2021 Jan 1 [cited 2024 Feb 26];11(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35052601/>*
 14. Cantor JR, Abu-Remaileh M, Kanarek N, Freinkman E, Gao X, Louissaint A, et al. Physiologic Medium Rewires Cellular Metabolism and Reveals Uric Acid as an Endogenous Inhibitor of UMP Synthase. *Cell. 2017 Apr 6;169(2):258-272.e17.*
 15. Avellino G, Deshmukh R, Rogers SN, Charnock-Jones DS, Smith GCS, Tardito S, et al. Physiologically relevant culture medium Plasmax improves human placental trophoblast stem cell function. *Am J Physiol Cell Physiol [Internet]. 2023 Apr 4 [cited 2024 May 9];324(4):C878. Available from: /pmc/articles/PMC10069969/*
 16. Golikov M V., Valuev-Elliston VT, Smirnova OA, Ivanov A V. Physiological Media in Studies of Cell Metabolism. *Mol Biol [Internet]. 2022 Oct 1 [cited 2024 Apr 27];56(5):629. Available from: /pmc/articles/PMC9534458/*

17. Cell Culture Media | Thermo Fisher Scientific - ES [Internet]. [cited 2024 Mar 20]. Available from: <https://www.thermofisher.com/es/es/home/life-science/cell-culture/mammalian-cell-culture/cell-culture-media.html>
18. van der Valk J. Fetal bovine serum-a cell culture dilemma. *Science* [Internet]. 2022 Jan 14 [cited 2024 May 8];375(6577):143–4. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35025663/>
19. Simancas-Escorcía V, Díaz-Caballero A, Simancas-Escorcía V, Díaz-Caballero A. Impacto de la concentración de suero fetal bovino sobre las células epiteliales dentales. *Entramado* [Internet]. 2019 Jan 10 [cited 2024 Feb 26];15(1):276–84. Available from: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1900-38032019000100276&lng=en&nrm=iso&tlng=es
20. Torres-Quesada O, Doerrier C, Strich S, Gnaiger E, Stefan E. Physiological Cell Culture Media Tune Mitochondrial Bioenergetics and Drug Sensitivity in Cancer Cell Models. *Cancers (Basel)* [Internet]. 2022 Aug 1 [cited 2024 May 12];14(16). Available from: </pmc/articles/PMC9405899/>
21. Emperador S, Bayona-Bafaluy MP, Fernández-Marmiesse A, Pineda M, Felgueroso B, López-Gallardo E, et al. Molecular-genetic characterization and rescue of a TSFM mutation causing childhood-onset ataxia and nonobstructive cardiomyopathy. *European Journal of Human Genetics* 2017 25:1 [Internet]. 2016 Sep 28 [cited 2024 May 15];25(1):153–6. Available from: <https://www.nature.com/articles/ejhg2016124>
22. Salmon P, Oberholzer J, Occhiodoro T, Morel P, Lou J, Trono D. Reversible immortalization of human primary cells by lentivector-mediated transfer of specific genes. *Mol Ther* [Internet]. 2000 [cited 2024 May 15];2(4):404–14. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11020357/>
23. Corporation P. CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay Instructions for Use of Products G7570, G7571, G7572 and G7573 [Internet]. Available from: www.promega.com
24. Pinho SA, Costa CF, Deus CM, Pinho SLC, Miranda-Santos I, Afonso G, et al. Mitochondrial and metabolic remodelling in human skin fibroblasts in response to glucose availability. *FEBS J* [Internet]. 2022 Sep 1 [cited 2024 Feb 26];289(17):5198–217. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35213938/>
25. de Kok MJC, Schaapherder AF, Wüst RCI, Zuiderwijk M, Bakker JA, Lindeman JHN, et al. Circumventing the Crabtree effect in cell culture: A systematic review. *Mitochondrion*. 2021 Jul 1; 59:83–95.

26. Pereira SP, Deus CM, Serafim TL, Cunha-Oliveira T, Oliveira PJ. Metabolic and Phenotypic Characterization of Human Skin Fibroblasts After Forcing Oxidative Capacity. *Toxicological Sciences* [Internet]. 2018 Jul 1 [cited 2024 May 23];164(1):191–204. Available from: <https://dx.doi.org/10.1093/toxsci/kfy068>
27. Lee MS, Shin Y, Moon S, Kim S, Kim Y. Effects of Eicosapentaenoic Acid and Docosahexaenoic Acid on Mitochondrial DNA Replication and PGC-1 α Gene Expression in C2C12 Muscle Cells. *Prev Nutr Food Sci* [Internet]. 2016 Dec 1 [cited 2024 May 25];21(4):317. Available from: </pmc/articles/PMC5216882/>
28. Adant I, Bird M, Decru B, Windmolders P, Wallays M, de Witte P, et al. Pyruvate and uridine rescue the metabolic profile of OXPHOS dysfunction. *Mol Metab* [Internet]. 2022 Sep 1 [cited 2024 May 16]; 63:101537. Available from: </pmc/articles/PMC9287363/>
29. King MP, Attardi G. Human cells lacking mtDNA: repopulation with exogenous mitochondria by complementation. *Science* [Internet]. 1989 [cited 2024 May 18];246(4929):500–3. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2814477/>
30. Olgun A, Akman S. Mitochondrial DNA-Deficient Models and Aging. *Ann N Y Acad Sci* [Internet]. 2007 Apr 1 [cited 2024 May 18];1100(1):241–5. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1196/annals.1395.025>
31. Wang F, Zhang D, Zhang D, Li P, Gao Y. Mitochondrial Protein Translation: Emerging Roles and Clinical Significance in Disease. *Front Cell Dev Biol*. 2021 Jul 1; 9:675465.