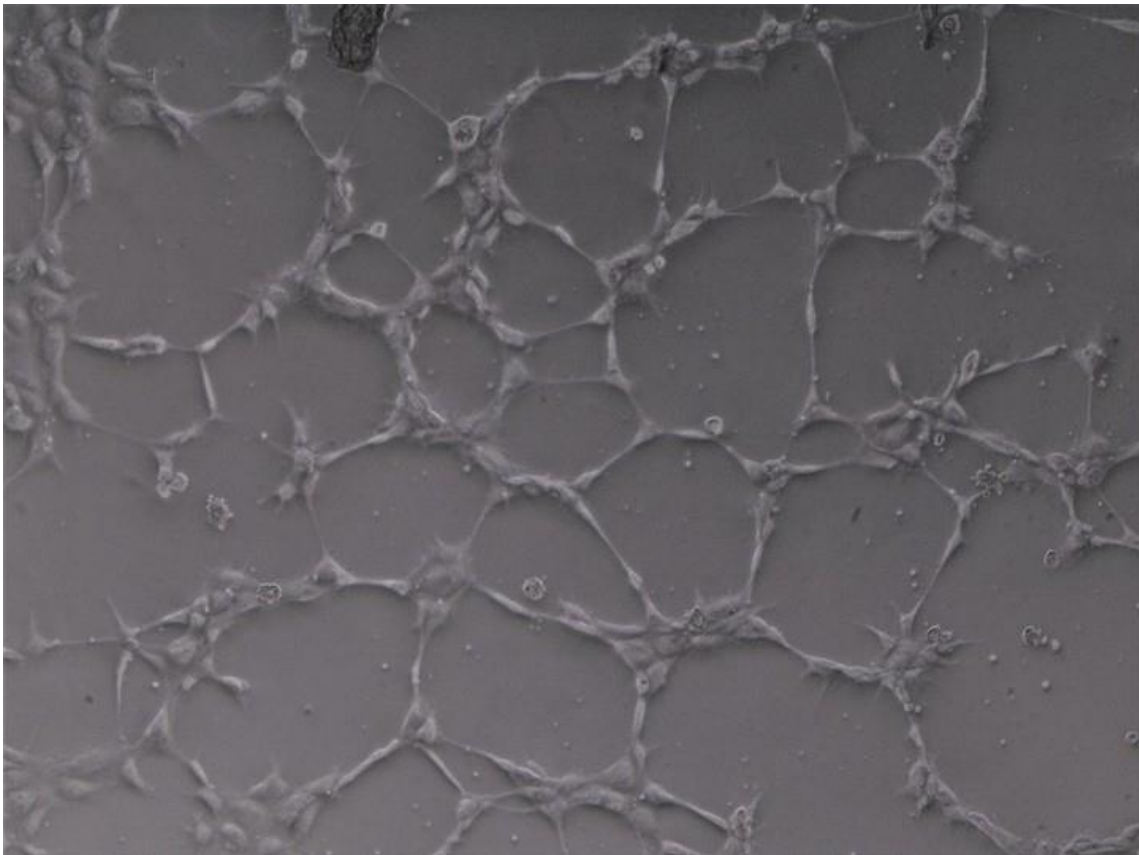


TRABAJO DE FIN DE GRADO



**ESTUDIO DE LA CAVERNOMATOSIS
FAMILIAR: DIAGNÓSTICO Y ESTUDIOS
DE LA EXPRESIÓN CELULAR
DIFERENCIAL EN CÉLULAS
ENDOTELIALES**



**JAIME GRANADO LEÓN
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID**

ÍNDICE

ABREVIATURAS	1
RESUMEN	2
INTRODUCCIÓN	3
¿Qué es una enfermedad rara?	3
Definición y demografía	3
Sintomatología	4
Genes.....	4
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	8
MATERIALES Y MÉTODOS	9
Obtención y siembra de células endoteliales BOECs (Blood Outgrowth Entothelial Cells).....	9
Preparación de medio de cultivo endotelial EGM	11
Extracción del ARN	11
RT-PCR y qPCR	12
Tubulogénesis.....	14
Wound healing	14
RESULTADOS	14
Diagnóstico genético del caso índice de Cavernomatosis familiar	14
Cultivo celular de células CCM1.....	15
Análisis de la expresión diferencial de genes endoteliales entre células control y células de un paciente con Cavernomatosis familiar Tipo 1 por qPCR	15
Funcionalidad de las células endoteliales: Ensayos de Tubulogénesis y Wound healing	16
Tubulogénesis.....	16
Wound healing.....	18
DISCUSIÓN	20
CONCLUSIONES	24
BIBLIOGRAFÍA	25

ABREVIATURAS

BOECs: Células Endoteliales de Sangre Periférica (Blood Outgrowth Endothelial Cells)

CCM: Malformaciones Cavernosas Cerebrales (Cerebral Cavernous Malformation)

CSC: Complejo Señalizador de CCM (CCM Signaling Complex)

COX-2: Ciclooxygenasa-2 (Cyclooxygenase type 2)

EGM: Medio de Crecimiento Endotelial (Endothelial Growth Medium)

FBS: Suero Fetal Bovino (Fetal Bovine Serum)

HBSS: Solución Salina de Hank (Hank's Balanced Salt Solution)

HHT: Telangiectasa Hemorrágica Hereditaria (Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia)

MLC: Cadena Ligera de la Miosina (Myosin Light Chain)

NO: Óxido Nítrico (Nitric oxide)

NOS-3/eNOS: Óxido Nítrico Sintasa (Nitric Oxide Synthase 3/endotelial Nitric Oxide Synthase)

PAI-1: Inhibidor del Activador de Plasminógeno tipo 1 (Plasminogen activator inhibitor-1)

PBL: Leucocitos de Sangre Periférica (Peripheral Blood Leukocytes)

PECAM: Molécula de Adhesión Plaquetaria de Células Endoteliales Celular (Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule)

VEGFR2/ KDR: Receptor del Factor de Crecimiento Endotelial Vascular-2/ Dominio Kinasa del Receptor

VHL: Síndrome de Von Hippel Lindau (Von Hippel Lindau síndrome)

RESUMEN

La cavernomatosis familiar es una enfermedad rara hereditaria, autosómica, dominante, caracterizada por la presencia de malformaciones vasculares consistentes en agrupaciones de vasos sanguíneos con una estructura anormal en forma de racimos. Existen distintos tipos de esta enfermedad dependiendo del gen esté alterado (*CCM1/Krit1*, *CCM2*, *CCM3*) y de su origen (espontáneo o familiar). En este trabajo se ha estudiado el comportamiento celular desde el punto de vista funcional y de expresión génica de un caso de cavernomatosis familiar tipo 1. La mutación del caso índice familiar consistía en una mutación puntual en la posición +1 consenso de “splicing” entre el exón 15 y 16, provocando fallo en el procesado del ARN y en la proteína final. A partir de sangre periférica del paciente se realizaron cultivos primarios de células endoteliales. En estas células se ha analizado la expresión génica diferencial con respecto a células endoteliales de un donante sano mediante PCR cuantitativa. Además, se han realizado ensayos para estudiar la función angiogénica y de migración celular. El análisis de la expresión génica por PCR cuantitativa reveló una disminución en la expresión de genes implicados en la formación de uniones intercelulares, homeostasis vascular, angiogénesis y hemostasis. El análisis funcional mostró que las células endoteliales *CCM1* presentaban alteraciones en la angiogénesis y en migración celular. En conjunto los resultados obtenidos explicarían las alteraciones vasculares que se producen in vivo en las malformaciones cavernosas.

PALABRAS CLAVE: enfermedad rara, endotelio, CCM (cavernomatosis familiar), *CCM1/Krit1*, *CCM2*, *CCM3/PDCD10*, angiogénesis.

1. INTRODUCCIÓN

1. ¿Qué es una enfermedad rara?

En la Comunidad Europea, una enfermedad rara o poco frecuente es aquella cuya prevalencia es inferior a 5 casos por cada 10.000 personas. Hay más de 300 millones de personas en el mundo, y 3 millones en España, estimándose que existen más de 7.000 enfermedades raras (Haendel et al., 2020). Gran parte de los casos aparecen en la edad pediátrica, dada la alta frecuencia de enfermedades de origen genético y de anomalías congénitas. Sin embargo, la prevalencia es mayor en los adultos que en los niños, por la mortalidad de algunas enfermedades infantiles graves y la influencia de ciertas enfermedades que aparecen a edades más tardías incluyendo las autoinmunes.

2. Definición y demografía

Las malformaciones cavernosas cerebrales (CCM, "Cerebral Cavernous Malformations"), hemangiomas cavernosos, cavernomatosis o cavernomas cerebrales son alteraciones vasculares que consisten en agrupaciones de vasos sanguíneos anormales en forma de cavernas con paredes delgadas sin estroma intermedio. Este tipo de malformaciones se originan entre venas y capilares, no afectando a tejido nervioso, a pesar de su localización. Estas estructuras anormales han sido descritas en el sistema nervioso central (encéfalo, retina y médula espinal) y en otras localizaciones como órbita ocular, piel e hígado (Calandriello et al., 2017).



Figura 1. Imagen angiográfica de una Malformación arteriovenosa cerebral (tomado de <https://neuros.net/>).

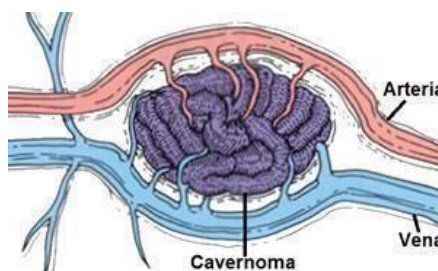


Figura 2. Esquema de una malformación arteriovenosa cerebral (tomado de <https://neuros.net/>).

Los cavernomas aparecen en un 0,4-0,8% de la población general. Su detección se produce en análisis de imagen, gracias a estudios clínicos, resonancias magnéticas o autopsias. A pesar de que se pueden producir a cualquier edad, se suele detectar entre los 20 y 50 años y afecta en la misma proporción a mujeres y hombres.

Existen dos formas de cavernomatosis: familiar y esporádica. Los cavernomas esporádicos no son hereditarios, y aparecen de forma aislada, no constituyendo una enfermedad rara, puesto que afectan a 1 de cada 200-300 personas. En nuestra investigación nos centraremos en la forma familiar (CCMF), que representa alrededor de un 20% de los casos totales y tiene una base genética pues existe herencia autosómica dominante con penetrancia variable, con una prevalencia estimada de 1 entre 5.000-10.000 casos (Sartages et al., 2022).

3. Sintomatología

Algunos de los pacientes no presentan síntomas y los cavernomas se detectan gracias a resonancias magnéticas en el estudio de las causas de ataques epilépticos u otros problemas neurológicos (Moore et al., 2014; Labauge et al., 2000). Los casos más graves de la cavernomatosis se dan por sangrados de las lesiones cavernomatosas, que interfieren en las funciones del Sistema Nervioso Central (SNC). Los síntomas más comunes son ataques epilépticos y hemorragias intracerebrales, que en algunos casos derivan en infartos cerebrales, y déficits neurológicos (Horne et al., 2016).

Las lesiones tienen un aspecto lobulado y a nivel histológico son canales hipertrofiados de células endoteliales. A pesar de esto, estas lesiones no invaden otros tejidos, ni comprometen tejido nervioso.

Los mecanismos moleculares causantes de las malformaciones no están dilucidados aún. Las proteínas codificadas por los genes alterados (*CCM1-3*) están implicadas en numerosos procesos de: angiogénesis, uniones intercelulares endoteliales (las cuales parecen ser el origen de las malformaciones propias de la enfermedad) y distintas rutas de señalización celular, las cuales se mencionarán más adelante (Sartages et al., 2022).

4. Genes

Se han descrito 3 genes implicados, en la cavernomatosis familiar, cuyas proteínas forman un complejo llamado CSC (CCM Signaling Complex): *CCM1/Krit1* (7q21-22), *CCM2* (7p13), y *CCM3/PDCD10* (3q26.1). En este estudio, nos centraremos en la cavernomatosis familiar tipo 1 (CCM1) que conforma entre el 53-65% de los casos totales. Las mutaciones de *CCM2* y de *PDCD10* representan el 20% y 10-16%, respectivamente. Debido a que en un 5-15% de los casos de CCMF no se

encuentran mutaciones en estos genes, se especula con la existencia de otro gen/es implicados. Sin embargo, se ha visto que estos casos, sin diagnóstico genético, pueden deberse a variantes patogénicas no detectadas en regiones no codificantes, debido a las técnicas utilizadas habitualmente para su diagnóstico, que buscan las mutaciones en exones y bordes intrónicos.

Casi todas las mutaciones descritas hasta la fecha introducen un codón de terminación prematura en la proteína codificada, gracias a diversos mecanismos como: mutaciones sin sentido, mutaciones en el consenso de empalme (“splicing”) entre exones, cambio de marco de lectura o reordenamientos. Existen también algunos casos de mutaciones de cambio de sentido de aminoácidos (“missense”) y de grandes deleciones de partes de los genes implicados (Scimone et al., 2017).

CCMI/Krit1

En este trabajo nos hemos centrado en un caso de cavernomatosis familiar tipo 1. El gen responsable del mismo, *CCMI/Krit*, está localizado en el cromosoma 7q121.2 y contiene 16 exones codificantes para la proteína KRIT1. Esta proteína está asociada a microtúbulos y posee dominios NUDIX y dominios de repetición de anquirina en el N-terminal, un dominio FERM en el C-terminal y varios motivos NPxY/F.

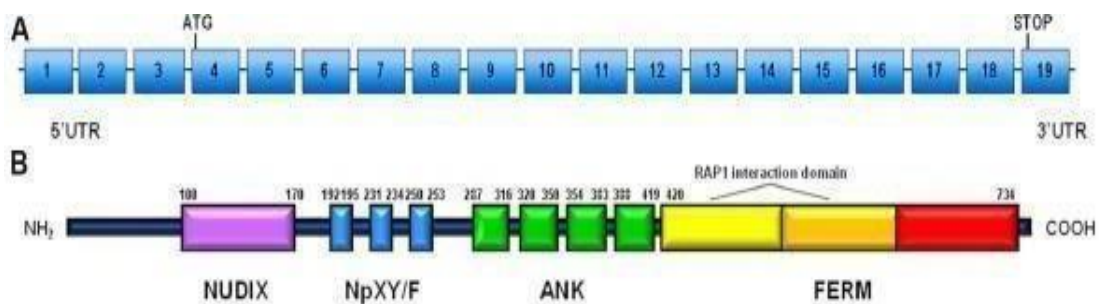


Figura 3. Representación esquemática del gen KRIT1 y de la proteína KRIT1: (A) estructura del gen KRIT1, incluidos 19 exones codificantes (cuadrados azules) e intrones (líneas horizontales) (secuencia de referencia: NM_004912.3); y (B) estructura de la proteína KRIT1, incluidos el dominio NUDIX, los NPXY/Fmotifs, los dominios de repetición de anquirina (ANK) y el dominio FERM (dominio ezrin radixin moesin de la banda 4.1), compuesto por tres subdominios. Para cada dominio se indica la posición del aminoácido al principio y al final (Ricci et al., 2021).

Rutas afectadas

Se ha visto que la proteína CCM1, además de interactuar con CCM2 y CCM3 para formar el complejo CSC, interactúa con proteínas implicadas en la regulación de la estructura endotelial como Rap1 y HEG1 (Glading et al., 2007). También se asocia con proteínas como VE-Cadherina y β -catenina, interfiriendo en las uniones intercelulares (Glading y Ginsberg, 2010).

Vía RhoA-ROCK

El complejo CSC participa de forma activa en la vía RhoA-ROCK. Esta ruta está implicada en los anclajes entre células y con la matriz extracelular. Se sabe que las malformaciones cavernosas se caracterizan por poseer unas uniones entre células alteradas e inestables (Bautista, 2022b).

Cuando esta ruta está activa, ROCK fosforila a la MLC (“myosin light chain”) y desencadena una cascada de eventos, entre ellos la formación de fibras de estrés compuestas por filamentos de actina que afecta a las uniones intercelulares. Este proceso ocurre en la migración celular, angiogénesis (tubulogénesis) y proliferación celular (van Nieuw Amerongen, et al., 2003). Diversos estudios avalan la idea de que el complejo CSC está implicado directamente en este proceso. En concreto, CCM1 se asocia a proteínas que conforman uniones entre células como β -catenina, lo cual evita en última instancia el aumento de la actividad de ROCK. CCM2 inhibe esta ruta pues favorece la degradación de RhoA, y CCM3 recluta proteínas implicadas en la migración y adhesión celular, como STK25 o Cdc42 (Figura 4).

Cuando se han usado fármacos inhibitorios de ROCK, en modelos celulares que poseen alguna de las proteínas CCM alteradas, se ha visto que las fibras de estrés disminuían y se recuperaba el fenotipo salvaje (Bautista, 2022b).

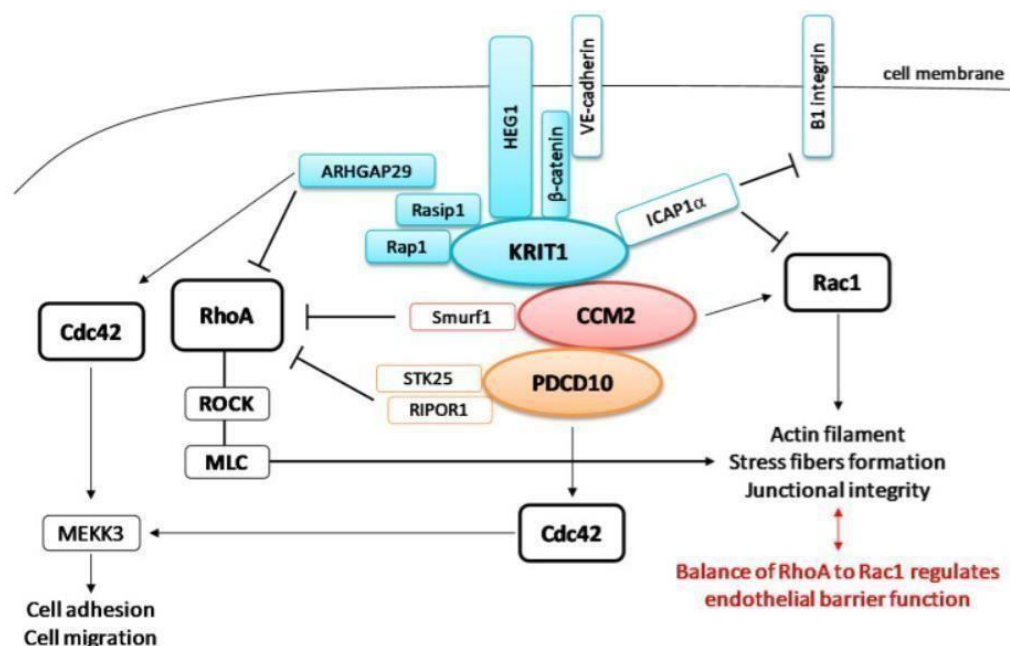


Figura 4. Complejo de señalización CCM (CSC) implicado en la señalización Rho GTPasa. KRIT1 se ancla a la membrana celular a través de β -catenina y HEG1, y luego se asocia con Rap1 y Rasip1, que recluta a ARHGAP29, formando la señalización de unión implicada en la regulación de las vías RhoA y Cdc42. Todos los componentes de la señalización de unión se indican en azul. CCM2 se asocia con Smurf1 para inhibir la señalización de RhoA. PDCD10 puede controlar RhoA a través de interacciones con RIPOR1 o STK25. Las tres proteínas CCM regulan negativamente RhoA-ROCK (Rho-associated coiled coil-forming kinase) bloqueando la fosforilación de la cadena ligera de miosina (MLC) y previniendo la formación excesiva de fibras de estrés y la disfunción de la barrera endotelial, que contribuyen a los vasos dismórficos que tipifican las lesiones CCM. ARHGAP29 y PDCD10 en el complejo STRIPAK están implicados en la regulación de Cdc42 a través de mecanismos no bien comprendidos, así como tampoco está claro cómo Cdc42 regula finamente las vías de MEKK3 (Riolo et al., 2021).

Uniones intercelulares

Siguiendo en la misma línea de adhesión celular y migración, se ha de mencionar que una de las primeras alteraciones que se detectó en los cavernomas fue un incremento en la permeabilidad de las células endoteliales. En este fenómeno participan distintos tipos de uniones, donde destacan las uniones adherentes. La estructura de estas uniones la conforma en gran medida la VE-Cadherina, una proteína transmembrana específica de células endoteliales. VE-Cadherina se une, intracelularmente, a diferentes proteínas, entre ellas VEGFR2. VE-Cadherina se encuentra habitualmente unida a CCM1, a través de la β -catenina, la cual está implicada en la ruta Wnt. Por tanto, VE-cadherina y la ruta Wnt están relacionados con el complejo CSC. Cuando hay una disminución de VE-Cadherina, la β -catenina puede actuar como factor de transcripción y translocarse al núcleo, regulando la expresión de genes relacionados con la migración y proliferación celular (Dejana, 2010).

Interacción con receptor VEGFR2

Como hemos comentado antes, el VEGFR2 está afectado por la actividad del complejo CSC. La estructura en la que se basan estos receptores es en un dominio extracelular al que se le une el ligando; un dominio transmembrana; y un dominio intracelular (donde se encuentra el dominio tirosín quinasa y donde se producen la mayoría de las interacciones con otras proteínas). Solamente en presencia del ligando, estos receptores dimerizan y se produce la autofosforilación de los dominios tirosín quinasa y adquieren la capacidad de fosforilar a otras proteínas (Sartages et al., 2022). En 2010, He et al., lograron estudiar la relación entre el receptor VEGFR2 y las proteínas CCM, comprobando que en respuesta a VEGF, CCM3 se encontraba unido al receptor R2. Se analizaron ratones en donde se había suprimido CCM3 y en este caso, se constató una disminución de VEGFR2. Por tanto, se concluyó que la proteína CCM3 estabilizaba al receptor y permitía un buen desarrollo de la vasculogénesis/angiogénesis.

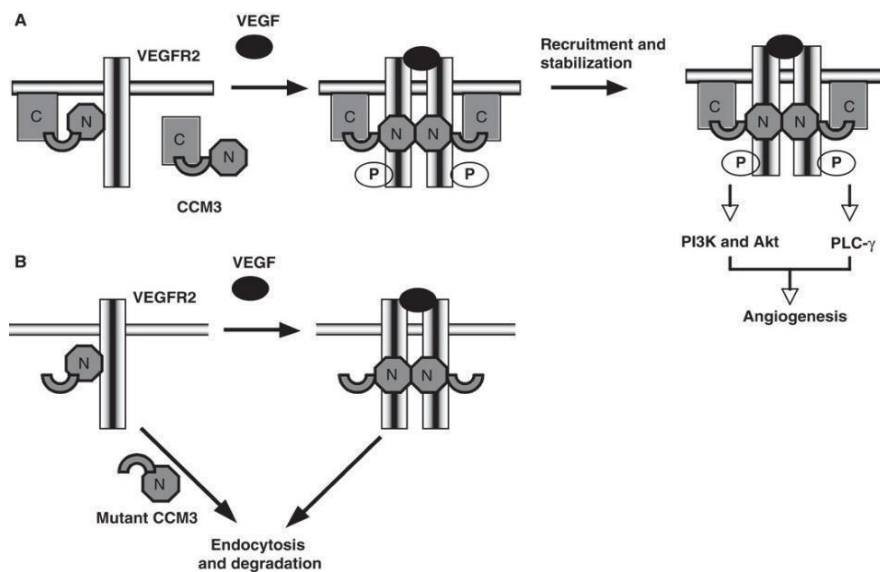


Figura 5. Esquema de la interacción entre CCM3 y VEGFR2 (He et al., 2010).

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

El presente trabajo constituye un primer estudio de caracterización molecular y funcional de las células endoteliales procedentes de un paciente con cavernomatosis familiar.

La hipótesis de partida es que la cavernomatosis familiar afecta a la expresión de genes endoteliales y a la funcionalidad de la célula endotelial, cuyos cambios son

responsables de las manifestaciones patológicas. Para desarrollar esta hipótesis nos hemos planteado el siguiente objetivo general que consiste en el diagnóstico genético y caracterización celular de la cavernomatosis familiar partiendo de una familia clínicamente diagnosticada de esta patología.

Para desarrollar el objetivo general planteamos los siguientes objetivos específicos:

1. Extracción del ADN a partir de la fracción de leucocitos de sangre periférica para diagnóstico genético.
2. Cultivo primario células endoteliales obtenidas a partir de los precursores endoteliales de sangre periférica de pacientes.
3. Estudio de la expresión de genes endoteliales en las células del paciente frente a células control.
4. Estudios funcionales de angiogénesis y de migración de las células endoteliales derivadas del paciente frente al control.

Las tareas incluyen el aislamiento de células de la fracción mononuclear de la sangre, la obtención de cultivos primarios endoteliales, cultivos de células endoteliales y ensayos funcionales de las mismas, de tubulogénesis y de migración (“wound healing”).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Obtención y siembra de células endoteliales BOECs (Blood Outgrowth Endothelial Cells)

Para esta investigación, se obtuvieron las células endoteliales a partir de sangre periférica. Recibimos muestras sanguíneas de 50 ml de sangre en tubos con anticoagulante (citrato). Posteriormente, se diluyó la muestra de sangre a la mitad con HBSS (“Hank’s Balanced Salt Solution”, Gibco). Los 25 ml de la sangre diluida se depositaron lentamente sobre otros 25 ml de solución Ficoll-Pque PLUS (Cytiva) que previamente se echó en tubos Falcon de 50 ml para conseguir el gradiente de separación. Al final se obtuvieron 4 tubos Falcon con Ficoll y sangre diluída por cada 50 ml de muestra de sangre.

Se centrifugó 30 minutos a 326 g sin aceleración ni freno y se descartó aspirando con bomba de vacío, el plasma diluido de la fase superior hasta que quedaron 5 ml por encima de los halos blanquecinos donde se localiza la fracción leucocitaria de la

sangre periférica (PBL, "Peripheral Blood Leukocytes"). Se recogieron unos 15 ml de los halos y se pasó a otros Falcon de 50 ml, juntando en cada Falcon nuevo, el volumen correspondiente a PBLs de dos gradientes. Se obtuvieron 2 tubos en total.

Una vez se tuvo recogidos los halos, se centrifugó 10 minutos a 326 g con freno. Las células se quedaron en el fondo del tubo formando un pellet, se aspiró y desechó el sobrenadante. Posteriormente, resuspendimos los pellets en 5 ml de medio EGM y se unificó en un solo tubo, que contendrá 10 ml de volumen final. Se centrifugó 10 minutos a 326 g con freno.

Una vez hubo finalizado la centrifugación, se plaquearon las células del pellet resuspendidas en 1 ml de medio de cultivo EGM con micropipeta, sobre los pocillos que se han tapizado previamente con colágeno.

Las células endoteliales necesitan crecer sobre un soporte que imite a la matriz del endotelio fisiológico por lo que los pocillos donde vayan a crecer precisan un tapizado ("coating") previo con colágeno tipo I (50 microgramos/ml). El día anterior se preparó una placa con 6 pocillos (P-6), añadiendo 3 ml de la solución de colágeno en cada pocillo de la placa y se dejó en el incubador a 37°C. Previamente, se aspiró el exceso de la solución de colágeno de cada pocillo P-6 y se lavó cada pocillo 2 veces con 5 ml de HBSS. Se añadió además 3 ml de medio EGM, por pocillo en el que se plaquea el pellet.

A partir de este momento, se procedió a cambiar el medio todos los días durante la primera semana, y cada dos días la segunda semana. Se empezó a observar el crecimiento de clones (células endoteliales) entre los días 12-15 aproximadamente.

Una vez se consiguió confluencia celular en cada pocillo P-6, se levantaron las células con tripsina para amplificar por pases sucesivos. En el caso de los experimentos realizados, se partió de células de pase 2, que se crecieron a confluencia en 3 pocillos de P-6. Para ello, se aspiró el medio de cultivo de los pocillos y se lavó 2 veces con HBSS. A continuación, se añadió 500 µl de Tripsina al 0.05% (Gibco) para un lavado rápido del pocillo. Se eliminó la tripsina y se volvió a añadir, 500 µl de Tripsina, pasando las placas al incubador a 37°C durante 2-3 minutos. Pasado este tiempo se observó al microscopio si las células se han levantado correctamente. Una vez las células se encontraban en suspensión, se paró la acción de la Tripsina añadiendo 2 ml de HBSS. Se recogió cada pocillo reservando la mitad de la muestra obtenido para la extracción de de ARN y la otra mitad para extracción de proteína. Las células se recogieron en un pellet por centrifugación durante 5 minutos a 153 g,

aspirando el sobrenadante. El pellet destinado al análisis de ARN se resuspendió en 700 μ l de buffer RAI1 añadiendo 7 μ l de β -mercaptoetanol, según el protocolo. Finalmente, se congeló el pellet en buffer de lisis de ARN, y el pellet celular que se usará para extracción de proteína, a -20°C hasta su análisis correspondiente.

3.2. Preparación de medio de cultivo endotelial EGM

Para la preparación del medio que se usó posteriormente, se utilizó 450 ml de endothelial basic medium (EBM, Lonza). A esos 450 ml de medio, se añadió:

- 10 ml de suplementos para enriquecimiento
- 100 ml de FBS (Fetal Bovine Serum) (Gibco), concentración final 20%.
- Antibiótico-antimicótico Gibco™, previene la contaminación por hongos y bacterias. Esta solución contiene 10.000 unidades/ml de penicilina, 10.000 $\mu\text{g/ml}$ de estreptomicina y 25 $\mu\text{g/ml}$ de anfotericina
- Suplementación con Glutámico 1%)
- Mycozap (Lonza), evita contaminación con micoplasma, 1ml/500ml de medio de cultivo.

3.3. Extracción del ARN

Para la purificación de ARN se siguieron las instrucciones del protocolo recomendado por el fabricante (Macherey-Nagel™ Nucleospin Mini Kit).

El pellet de células se resuspendió en 350 μ l del buffer de lisis RA1 al que añadiremos 3,50 μ l β -mercaptoetanol, se filtró en columna (NucleoSpin® Filter) y centrifugó durante 1min/11.000g. Posteriormente, se desechó el filtro y a la solución resultante se añadió 350 μ l de etanol 70% y se homogeneizó la mezcla. Después, se pipeteó la mezcla en una columna (NucleoSpin® RNA Column) y se centrifugó la muestra durante 30 segundos/11.000g. Tras el centrifugado, se añadió 350 μ l de membrane desalting buffer (MDB) y se volvió a centrifugar la mezcla durante 1min/11.000g. A la solución resultante, se añadió 95 μ l de “rDNase reaction mixture” (10 μ l de rDNsa + 90 μ l de Reaction Buffer) e se incubó la solución durante 15 minutos a temperatura ambiente. Tras la incubación, se realizó un primer lavado añadiendo 200 μ l de Buffer RAW2 y se centrifugó durante 30s/11.000g.

Posteriormente, se realizó un segundo lavado añadiendo 600 μ l de Buffer RA3 y se centrifugó de nuevo durante 30s/11.000g. Finalmente, se realizó un tercer lavado añadiendo 250 μ l de Buffer RA3 y se centrifugó durante 2 min/11.000g. Se eluyó el ARN de la columna añadiendo 35 μ l de Rnasa free H₂O₂ y se centrifugó durante 1 min/11.000g.

La cuantificación del rendimiento de ARN se llevó a cabo por espectrometría en un Nanodrop.

3.4. RT-PCR y qPCR

Para analizar si hay expresión diferencial de genes endoteliales, se realiza una RT-PCR (Applied Biosystems), donde la transcriptasa inversa pasa el ARN a ADN complementario, para seguidamente utilizar éste como molde, en una PCR cuantitativa o en tiempo real (qPCR), a partir de 500 ng de ARN extraído previamente.

Para la qPCR se midió previamente el rendimiento en cADN con el Nanodrop y se usó para cada reacción 2 μ l de stocks de cADN ajustados a 1.000 ng/ μ l.

La qPCR se llevó a cabo utilizando la mezcla Fast Start Essential Green Máster de Roche y preparando para cada gen a analizar la siguiente mezcla de reacción con 2 μ l de molde. Los primers utilizados se habían probado previamente en estudios de otras enfermedades con implicación vascular como HHT y VHL y se adquirieron a la casa comercial Sigma Aldrich.

- 0,5 de primer forward
- 0,5 μ l de primer reverse
- 10 μ l de SYBR Green
- 7 de H₂O

El termociclador usado para la qPCR fue un IQ5, Biorad para analizar la expresión génica.

Para la realización de una qPCR, es necesario introducir la expresión de un gen que nos cuantifique la cantidad de cADN/ARN para relativizar la expresión de cada gen con respecto a un gen llamado “housekeeping” que no se ve afectado por mutaciones en otros genes o condiciones de tratamiento. Se usaron dos tipos de controles el 18S de ARN ribosómico y la actina. Para la reacción con el 18S fue necesario diluir el cADN 2:150 dada su abundancia. En el caso de la actina la dilución

fue de 1:2. Se realizaron triplicados de genes escogidos. Se eligieron en principio genes de expresión endotelial implicados en angiogénesis, adhesión celular, y vasodilatación, además del gen *Krit*, mutado en el caso del paciente.

La expresión de cada gen se realizó por el método del $\Delta\Delta C_t$ normalizando con el gen “housekeeping”, *18S* ó *Actina* o ambos.

GEN	IMPLICACIÓN	PRIMER FORWARD (5' → 3')	PRIMER REVERSE (5' → 3')
<i>Endoglin</i>	Proceso angiogénico	AGCCACATCGCTCAGACAC	GCCAATACGACCAAATCC
<i>Krit1</i>	Gen causante de la cavernomatosis familiar tipo 1	CTGTAAGAACATGCGCTGAAG	TCCATCGTACCTGTTACCAAAC
<i>Angiopoyetina 2</i>	Angiogénesis	TGCAAATGTTTACAAATGCTAA	AAGTTGGAAGGACCACATGC
<i>Ciclina B2</i>	Control de mitosis	TGAAAAGTTGGCTCCAAAG	CTTCCTTCATGGAGACATCCTC
<i>PECAM</i>	Procesos de adhesión, migración transendotelial y formación de nuevos vasos	AGAAAACCACTGCAGAGTACCAG	GGCCTCTTTCTTGTCAGTGT
<i>COX-2</i>	Producción de prostaglandinas	TCACGCATCAGTTTTTCAAGA	TCACCGTAAATATGATTTAAGTCCAC
<i>VEGFR2/KDR</i>	Desarrollo vascular y regulación de permeabilidad vascular	GAGTGAGGAAGGAGGACGAAGG	CCGTAGGATGATGACAAGAAGTAGC
<i>NOS-3</i>	Regulación de la función vascular	GACCCTCACCGCTACAACAT	CCGGGTATCCAGGTCCAT
<i>Ve-Cadherina</i>	Uniones adherentes intercelulares	GGAGGAGCTCACTGTGGATT	CTGATGCAGCAAGGACAGC
<i>PAI-1</i>	Inhibidor del sistema fibrinolítico	TCCAGCAGCTGAATTCCTG	GCTGGAGACATCTGCATCCT

3.5. Tubulogénesis

Para el ensayo de tubulogénesis, se sembraron ≈ 50.000 células/pocillo de una P- 24, resuspendidas en 500 μl de medio EGM. Los pocillos previamente habían sido tapizados con Matrigel (Gibco). Se realizaron fotos a distintos tiempos entre 1h 30 min y 6 h, para contabilizar el número de celdas completamente cerradas.

3.6. Wound healing

Otra función que se ha descrito como afectada en la cavernomatosis familiar es la migración celular y contactos intercelulares. Para estudiar la actividad migratoria de las células endoteliales se realizó el ensayo de “wound-healing” (cierre de herida). Para ello, sembramos 50.000 células/pocillo, de una placa P-24, previamente tapizada con colágeno. Estas células se incubaron hasta confluencia. Una vez se percibió que había una monocapa confluyente, se realizó una “herida” (discontinuidad) con una punta amarilla de micropipeta en la zona central del pocillo y se tomaron fotos a distintos tiempos (0h-6h) para observar el avance del frente que delimitaba la discontinuidad inicial.

4. RESULTADOS

4.1. Diagnóstico Genético del caso índice de Cavernomatosis familiar

Utilizando células endoteliales derivadas del caso índice familiar, se realizó un diagnóstico genético por exoma clínico de un paciente con clínica y antecedentes familiares de cavernomatosis y la caracterización molecular de células endoteliales procedentes del caso índice. En este caso, el diagnóstico genético concluyó que existe una mutación puntual entre los exones 15 y 16, c. 1563 + 1G>T p.521 sp, más concretamente en la transición exón-intrón en el final del exón 15, tras haber mutado una base (G>T) y haber alterado el proceso de splicing. De este modo, el intrón entre los exones 15 y 16 (≈ 6.000 pb) se incluye en el ARN maduro, alterando así el funcionamiento de la proteína CCM1 (Figura 5).

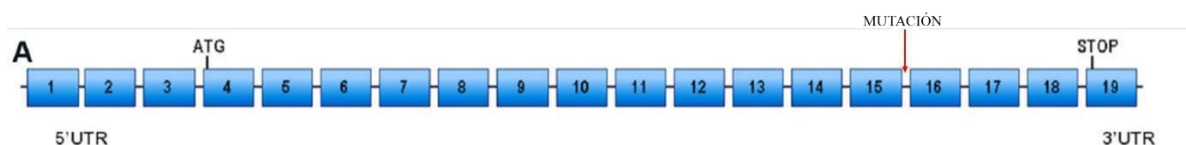


Figura 5. Situación del sitio de mutación.

4.2. Cultivo celular de células CCM1

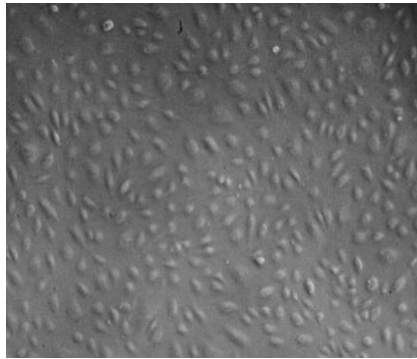


Figura 6. Cultivo de células endoteliales control previo al levantamiento de las células para extracción de ARN y proteínas.

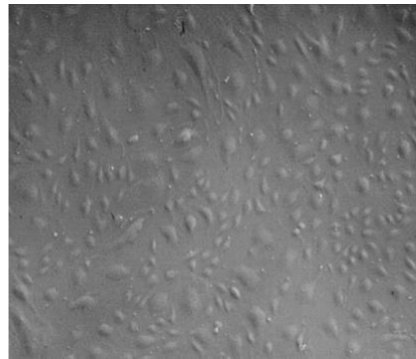


Figura 7. Cultivo de células CCM1 previo al levantamiento de las células para extracción de ARN y proteínas.

En las figuras 6 y 7 se observan células endoteliales procedentes de un cultivo control y del caso índice. Se puede ver que la morfología celular es similar. Sin embargo, en el cultivo celular CCM1, se aprecian algunas células de morfología alargada y diferente tamaño.

4.3. Análisis de la expresión diferencial de genes endoteliales entre células control y células de un paciente con cavernomatosis familiar tipo 1 por qPCR

Para analizar si hay expresión diferencial de genes endoteliales, entre células control y células procedentes de nuestro paciente CCM1, se realizó un análisis de cantidad de ARN, mediante PCR cuantitativa o en tiempo real (qPCR).

Los genes escogidos son genes implicados en la funcionalidad del endotelio como:

- Angiogénesis o formación de nuevos tubos a partir de otros preexistentes: *Angiopoietina 2*, *Endoglina*, *KDR (VEGF-R2)*
- Adhesión célula a célula, y de célula a sustrato: *PECAM-1*, *VE-cadherina 2*
- Matriz extracelular: *PAI-1* (inhibidor del activador del plasminógeno).
- Homeostasis y fisiología del endotelio: *eNOS* y *COX-2*
- Ciclo celular: *ciclina B2*
- Gen mutado en heterocigosis en el caso del paciente: *KRIT*

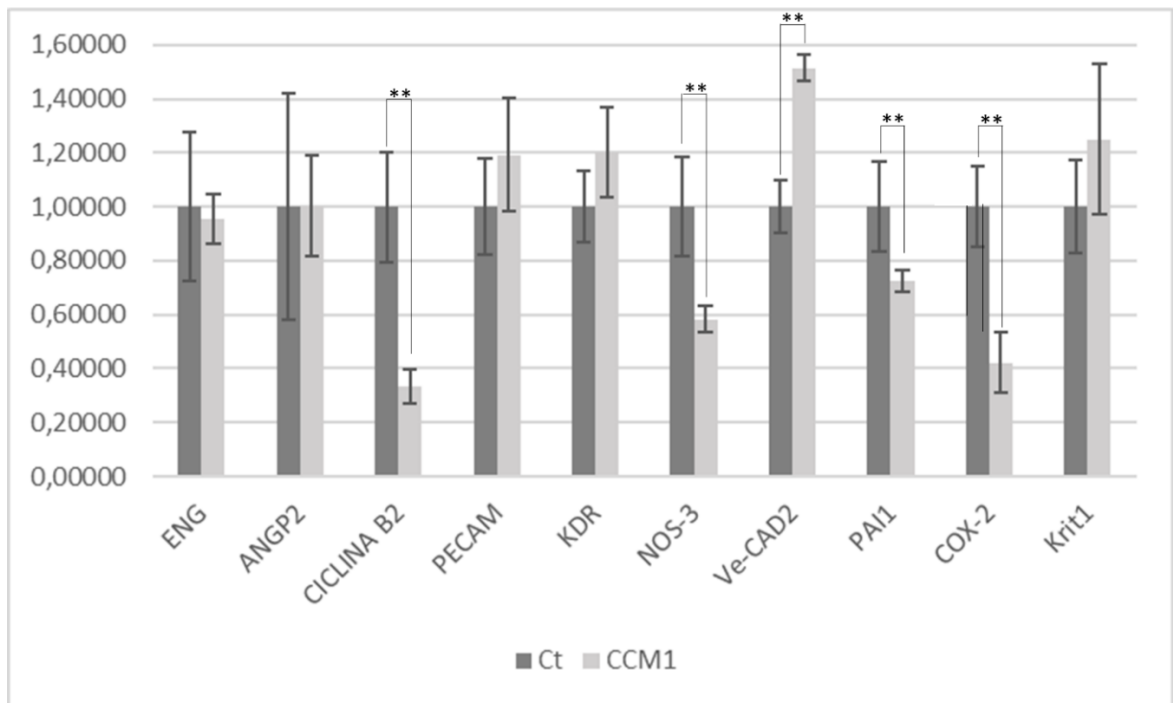


Figura 8. Gráfica de la qPCR con los resultados de expresión de los genes de interés. **p<0,01

En la gráfica de la qPCR, se puede ver que hay genes que presentan una expresión distinta respecto a las células control. En las células CCM1 la expresión de VE-cadherina aumenta significativamente respecto al control, mientras que la *Ciclina B2*, *NOS-3*, *PAI1* y *COX-2* disminuyen significativamente respecto al control.

4.4. Funcionalidad de las células endoteliales: Ensayos de Tubulogénesis y Wound healing

Una vez observada una expresión diferente entre genes cuya expresión es esencial para funciones propias del endotelio, se ha querido estudiar la funcionalidad de las células endoteliales CCM1 procedentes del paciente, frente a células endoteliales controles de un voluntario sano. Se ha realizado dos tests: tubulogénesis (que sería equivalente a la angiogénesis in vitro) y “wound-healing” (que sería equivalente a estudiar la capacidad migratoria en reparación de heridas vasculares).

Tubulogénesis

El ensayo de tubulogénesis equivale a una angiogénesis in vitro. Las células endoteliales sembradas en una matriz extracelular que recuerda a la matriz de la que están rodeadas en la vasculatura, se redistribuyen siguiendo un patrón de interconexiones a modo de celdas cerradas que recuerdan en cierta

manera a los capilares sanguíneos. Para esta prueba se comparó la eficiencia en la formación de estas estructuras entre las células normales y las deficientes en CCM1.

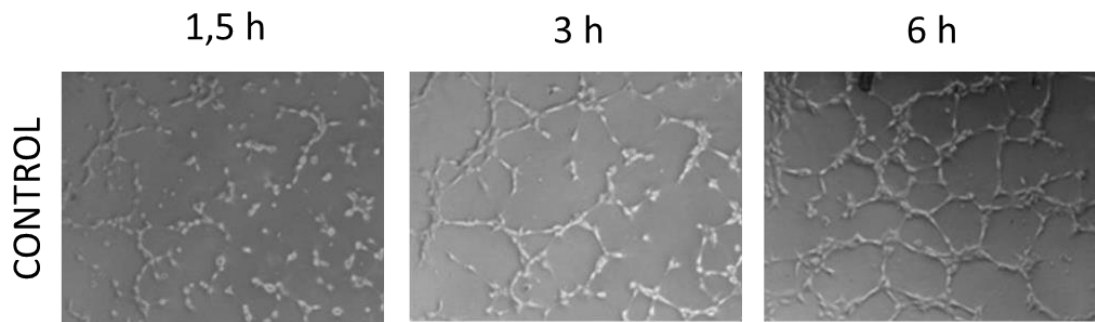


Figura 9. Fotos de células control en el experimento de tubulogénesis tomadas a la 1 h y 30 min, 3 h y 6 h desde la siembra de las células endoteliales

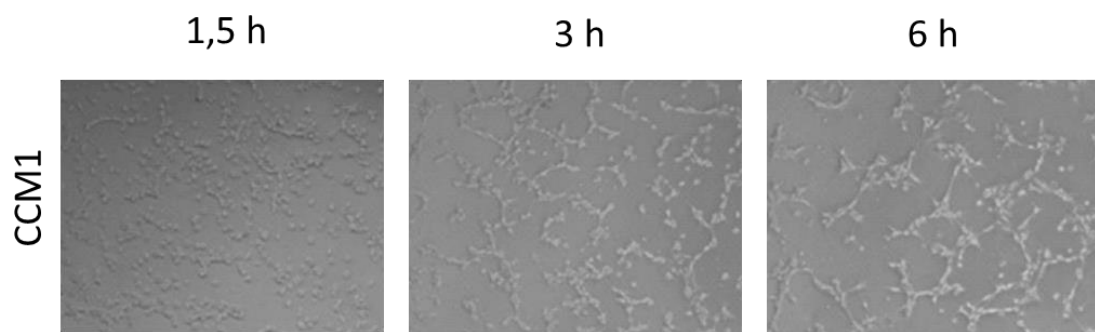


Figura 10. Fotos de células CCM1 en el experimento de tubulogénesis tomadas a la 1 h y 30 min, 3 h y 6 h desde la siembra celular.

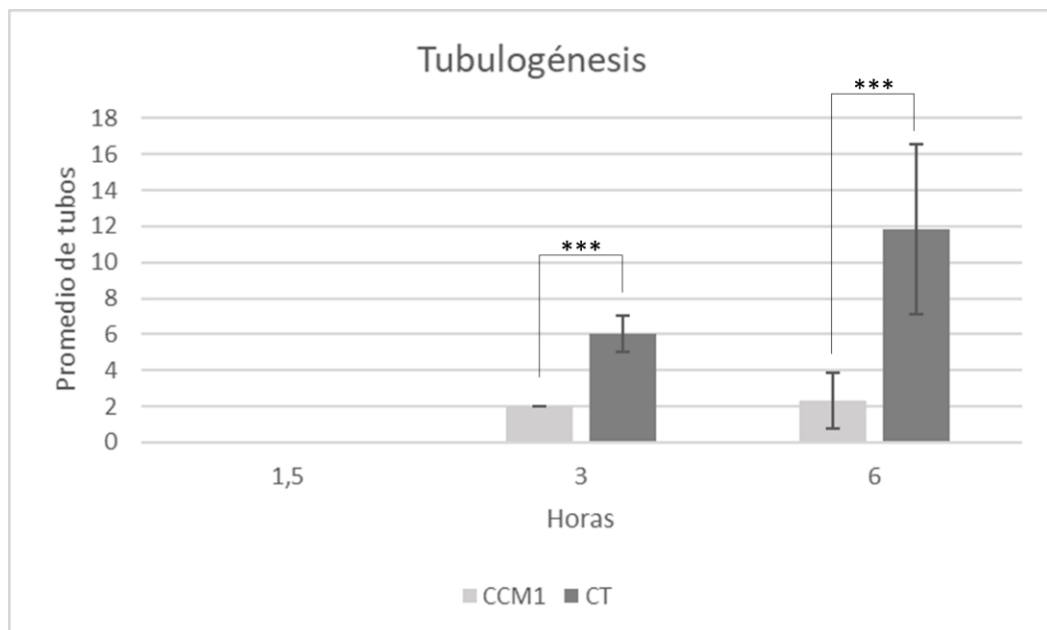


Figura 11. Promedio de tubos cerrados a distintos tiempos. *** $p < 0,001$

En las células control (Figura 9) se puede observar que tras 1 h y 30 min desde la siembra en matrigel, las células comienzan a disponerse de forma espaciada y forman pequeñas líneas finas de células con estructura geométrica. Más tarde, a las 3 h, se puede observar que se han formado algunos tubos completamente cerrados y el resto de las células se encuentran en fase de formación de tubos. Finalmente, a las 6 h, se aprecia como se ha terminado de formar una red de numerosos tubos completamente cerrados, con paredes finas de una sola fila de células (Figura 9).

En las células CCM1 (Figura 10) al analizar las células a la 1 h y 30 min se aprecia que las células no presentan una formación tan diferenciada como en los controles, estando agrupadas en la parte superior de la foto, si bien en la parte de abajo algunas células comienzan a disponerse de manera más espaciada. A las 3 h, se puede ver como las células están más espaciadas entre sí y con una disposición similar a las células control a la 1 h y 30 min, formando líneas de células con una disposición geométrica, pero con escasas celdillas de tubos completamente cerradas. Finalmente, a las 6 h, presentan una disposición similar a la foto tomada a las 3 h, sin cerrar por completo y con las paredes de esos vasos formadas por más de una célula (Figura 9).

Wound healing

El ensayo de cierre de “herida” (wound healing assay) tiene como objetivo el estudio de la migración celular. En nuestro trabajo, por diversas observaciones en morfología y expresión génica podemos pensar que hay procesos como migración y contactos celulares afectados.

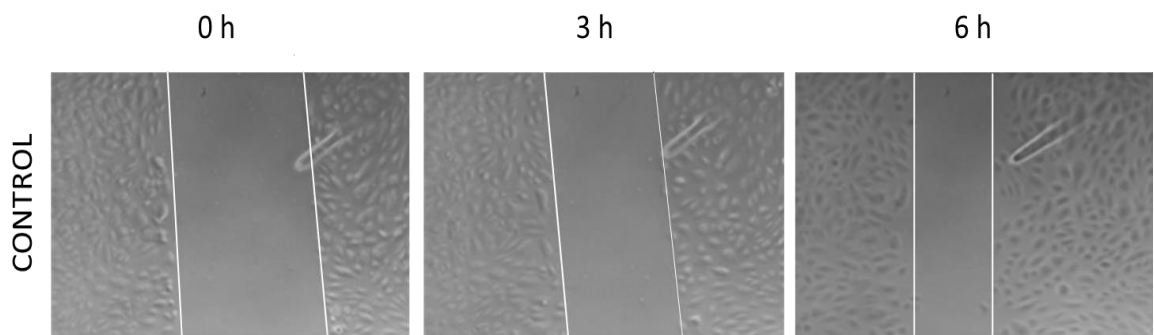


Figura 12. Fotos de células control en el experimento de wound healing a las 0 h, 3 h y 6 h desde la realización de la herida

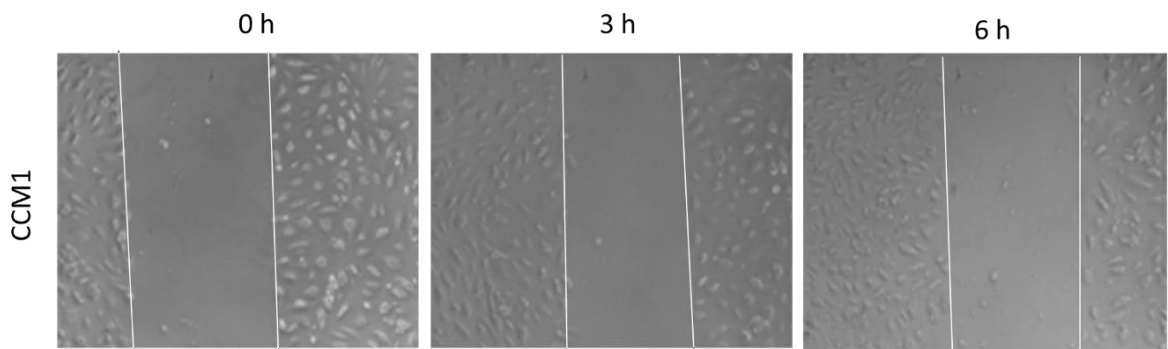


Figura 13. Fotos de células CCM1 en el experimento de wound healing a las 0h, 3h, 6h (respectivamente)

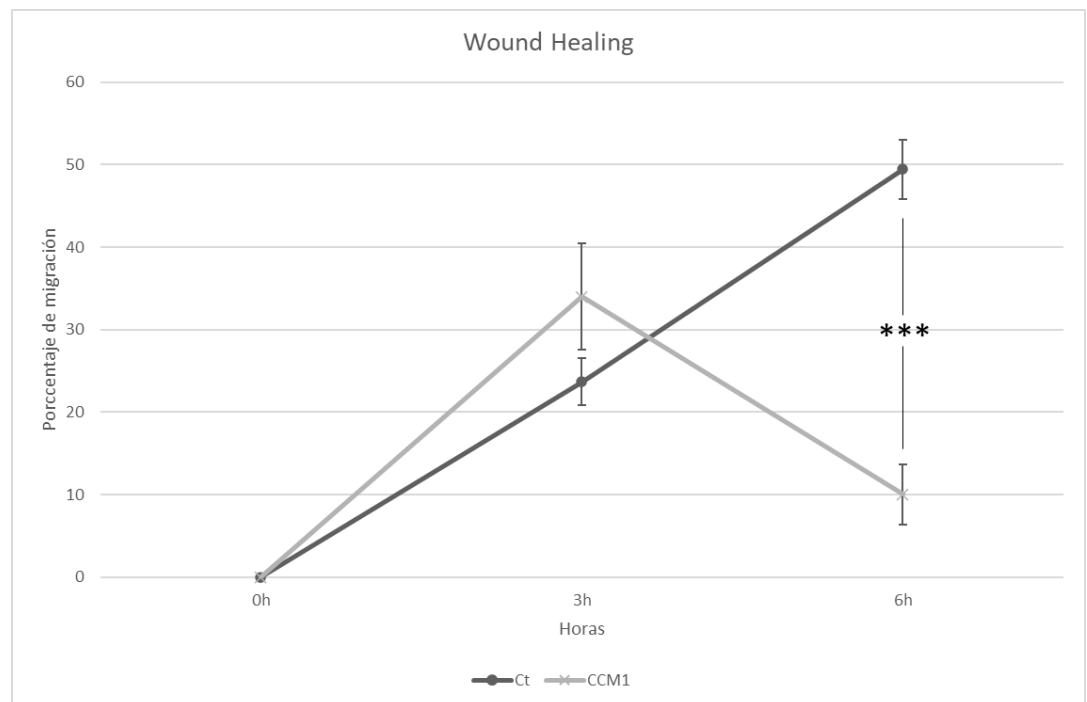


Figura 14. Gráfico del porcentaje de migración a lo largo del tiempo. *** $p < 0,001$

Las células endoteliales tienden a migrar para cubrir las discontinuidades del endotelio que se producen con las heridas. Por tanto, el ensayo de “wound-healing” o cierre de herida es una prueba in vitro que trata de analizar la velocidad con la que las células endoteliales son capaces de migrar para cubrir la discontinuidad generada en una monocapa endotelial in vitro y por tanto reparar “la herida”.

En las células control (Figura 12) a las 3 h han avanzado los frentes de la herida un 21,8% respecto a la medida inicial. Posteriormente, a las 6 h el frente avanzó un 50% respecto a las 0 h.

En las células CCM1 (Figura 13) al analizar las fotos se puede observar como a las 3 h los frentes han avanzado un 17,6% respecto a las 0 h. Más tarde, a las 6 h los frentes no han avanzado, sino que se han retraído con respecto a las 0 h, habiendo avanzado un 11,8% con respecto a la toma inicial. La figura 14 muestra la evolución en el cierre de la discontinuidad a lo largo de 6 horas.

5. **DISCUSIÓN**

La proteína CCM1 está implicada en diferentes procesos e interacciones con proteínas que participan en distintas rutas de señalización. Por ello, la falta de función de CCM1 ó Krit1 da lugar a la alteración de estas vías de señalización y a la homeostasis celular.

La morfología y función de las células endoteliales es crucial ya que supone la primera barrera entre la sangre y los distintos tejidos que componen un organismo. A pesar de los estudios biológicos y clínicos, hay muchas preguntas sobre la biología dinámica del endotelio, ya que participa en multitud de procesos fisiológicos y en la homeostasis del organismo.

En nuestro trabajo, al cultivar células endoteliales procedentes de un donante sano y de un paciente con CCM1 (BOECs), se puede observar que existen diferencias morfológicas, moleculares y funcionales entre las células control y las células CCM1. En primer lugar, podemos ver como las células endoteliales control presentan una morfología ovalada, regular en toda su extensión y de tamaño similar entre ellas. Además, podemos observar cómo, en estado de confluencia, apenas existen espacios intercelulares puesto que se mantienen firmemente unidas entre ellas por uniones estrechas y adherentes, las cuales pueden variar para modular así la permeabilidad del endotelio y la homeostasis.

Si nos fijamos en las células CCM1, se puede detectar claramente como algunas células adoptan una morfología más irregular y elongada, siendo alargadas en uno de los polos celulares y ovaladas en el opuesto. Estas células no consiguen llegar a la confluencia completa ya que, a pesar de existir gran número de células, quedan numerosos espacios intercelulares. Esta observación sugiere que las uniones entrecélulas están alteradas, y que en esta alteración está implicada la proteína CCM1. Tras observar el análisis de expresión de ARN por PCR cuantitativa, apreciamos un aumento significativo en la expresión de *VE-Cadherina 2*. Esto puede deberse a un déficit funcional de la proteína CCM1 en la Vía RhoA-ROCK (Figura 4). Si CCM1

está disminuida, las interacciones con proteínas implicadas en las uniones celulares como la β -catenina se ven alteradas. En este caso, un aumento significativo de la expresión de *VE-Cadherina 2* sugeriría que la alteración en la interacción entre CCM1 y β -catenina ocasionaría que ésta última en parte pueda migrar al núcleo y realizar otras funciones como factor de transcripción. En última instancia, el aumento de la transcripción de *VE-Cadherina 2*, sería para compensar la falta de CCM1 que a través de su interacción con β -catenina participa en las uniones intercelulares (Dejana, 2010).

Por otra parte, la alteración de las uniones intercelulares puede afectar a la permeabilidad de la vasculatura, y a su homeostasis. Las células endoteliales actúan como una barrera selectiva que controla el movimiento de fluidos, iones y otras macromoléculas entre la sangre y los tejidos adyacentes mediante la regulación de los complejos de unión entre las células endoteliales. Además, el endotelio regula el flujo sanguíneo y la perfusión tisular modificando el diámetro de los vasos sanguíneos, así como del tono vascular. El glucocálix endotelial también participa en la regulación de la permeabilidad vascular y puede influir en la capacidad de varias moléculas para entrar en el endotelio en función de su tamaño y carga. Además de actuar como barrera selectiva, el endotelio regula la extravasación de leucocitos en respuesta a daño tisular o infecciones, mediante la expresión de moléculas de adhesión y citocinas (Carlos, s. f.). Las células endoteliales controlan el tono vascular al producir NO, prostaciclina y factores hiperpolarizantes derivados del endotelio, todos los cuales son vasodilatadores. Como se ha podido comprobar en la qPCR, la expresión de *NOS-3* está significativamente disminuida en las células CCM1, lo que se traduciría en una producción reducida de NO y, en definitiva, una alteración del tono vascular y del correcto funcionamiento del endotelio (Figura 15).

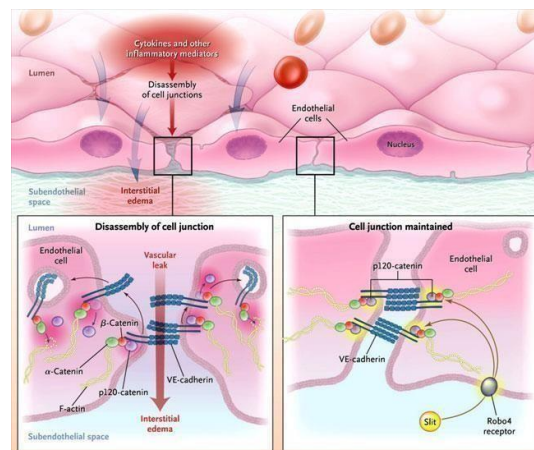


Figura 15. Representación de las alteraciones en las uniones intercelulares (SAVALnet- *Los secretos de la sepsis*, s. f.)

En cuanto a los ensayos de angiogénesis, se puede apreciar como en los cultivos con CCM1, las células no consiguen formar tubos cerrados a lo largo del tiempo. Debido que para conformar un tubo cerrado se necesita una estabilización de las uniones intercelulares, este defecto puede deberse a la alteración de dichas uniones entre las células que componen el tubo debido a la mutación de CCM1, lo que impide la interacción con la β -catenina y, por tanto, un incremento en la VE-Cadherina el cual se puede observar en los resultados de la PCR cuantitativa (Figura 8). Además, los ensayos de “wound healing” mostraron alteraciones en los cultivos de células CCM1 respecto a las células control. Estas células migran gracias a la división celular y no a la motilidad celular como en otros tipos celulares. Debido a esta característica, podemos intuir que existen alteraciones en el ciclo celular. Al analizar la expresión génica por PCR cuantitativa, observamos una disminución significativa en la expresión de *Ciclina B2* lo que podría explicar la lentitud de las células para cerrar la herida producida. Debido a las alteraciones comentadas en los ensayos de tubulogénesis y “wound healing”, podemos relacionarlas con el cuadro clínico que presentan los pacientes con esta afección, como las hemorragias.

Por otro lado, en cuanto al crecimiento del cultivo celular, se observó que las células CCM1 tardaban más tiempo en llegar al mismo estado de confluencia que el cultivo de las células control. Al analizar la expresión de los genes de interés por qPCR, se puede observar como la *Ciclina B2* tiene una expresión significativamente reducida con respecto al control. La *Ciclina B2* participa en la regulación del ciclo celular, más concretamente en la fase G2-Mitosis. Podemos por tanto suponer que, una disminución en la expresión de *Ciclina B2* puede retrasar la división celular y, por tanto, que el cultivo de células CCM1 tiene una proliferación menor que las células endoteliales normales, tarde más tiempo en llegar al mismo estado de confluencia que el cultivo de las células control.

Al analizar los resultados de expresión génica en la qPCR, se observa como otro de los genes analizados, *PAII*, presenta una menor expresión con respecto a las células control. El gen *PAII* es el principal inhibidor del activador tisular del plasminógeno (t-PA) y la uroquinasa (uPA), los activadores del plasminógeno y, por lo tanto, de la fibrinólisis. Cuando se produce un trombo, el activador tisular del plasminógeno o la uroquinasa, actúa para degradar la matriz de fibrina que conforma el trombo. En cambio, *PAII* inhibe estos componentes por lo que dicha degradación se produciría más lentamente (Kotb et al., 2021). En este caso, al tener una

disminución en la expresión del gen *PAII*, el proceso fibrinolítico está alterado produciendo la lisis prematura de los coágulos hemostáticos, con la consiguiente tendencia moderada al sangrado (Reservados, s. f.).

Otros de los genes que tienen una expresión reducida es el de la ciclooxigenasa 2 (*COX-2*). La ciclooxigenasa (*COX*) es la enzima clave en la síntesis de prostaglandinas a loxidar el ácido araquidónico. Las prostaglandinas tienen funciones relacionadas con la homeostasis de varios órganos, así como con el dolor, la inflamación y la tumorigénesis. La disminución de estas prostaglandinas tiende a disminuir la perfusión renal total y a redistribuir el flujo sanguíneo hacia la corteza. En situaciones extremas, esto culminaría en vasoconstricción renal aguda e isquemia medular que podría desembocar en fallo renal agudo (Meijide & Carnota, 2000b).

Por último y de cara al futuro, se podría estudiar las interacciones y morfología celular más a fondo a través del estudio de las uniones intercelulares y de anclaje al sustrato, así como la distribución de actina y tubulina, usando microscopía de fluorescencia con técnica confocal, ya que se ha publicado una deficiencia en la estructura del citoesqueleto en cavernomatosis (Sartages et al., 2022)

En el caso que hemos estudiado, la mutación no se encuentra en la región codificante sino en un nucleótido de la secuencia consenso de splicing. Para comprobar el efecto de la mutación, se podría realizar una PCR con oligonucleótidos diseñados específicamente para las regiones pertenecientes al intrón por ambos lados y amplificar entre el final del exón 15 y el principio del intrón, por un lado, y entre el final del intrón y el comienzo del exón 16 por otro lado. En definitiva, usando el ADN complementario al ARN como molde, y, amplificando el principio y el final del intrón, sólo se obtendría amplificación en el caso de la muestra con la mutación. El intrón situado entre ambos exones es muy grande (6.000 bp) y su amplificación completa, usando el final del exón 15 y el principio del 16, que sólo se podría realizar en el caso de la muestra del paciente, requeriría una PCR larga. Con estos ensayos se podría constatar la inclusión de dicho intrón existente entre ambos exones en la especie de transcrito anómalo que se produciría en la mitad de los transcritos de las células CCM1 de nuestro caso. Además, para estudiar la expresión del gen *CCMI/Krit* donde no hay diferencias en la qPCR, se debe realizar ensayos de western blot, donde se esperaría la mitad de proteína CCM1, ya que el transcrito con la inclusión del intrón va a dar una proteína truncada afuncional. Este experimento que no hemos podido realizar, confirmaría la deficiencia de expresión a nivel proteico de CCM1. Aun suponiendo que la proteína truncada se llegase a expresar,

esta proteína no sería funcional ya que le faltaría los últimos subdominios del dominio FERM por el que interacciona con componentes del complejo CCM y con otros componentes de la señalización de la vía Rho/Rac, en concreto Rap1, como se ilustra en la Figura 4.

Con todo ello, concluimos que las diferencias observadas en las células endoteliales del paciente podrían explicar, en parte, características de la cavernomatosis como la formación de malformaciones vasculares cavernosas, con desaparición de capilares y engrosamiento de venas post-capilares con sangrados frecuentes.

Por supuesto se necesitan completar los experimentos de visualización del citoesqueleto endotelial, así como de expresión de proteína de los genes encontrados con expresión diferencial en ARN, y en especial de la proteína CCM/Krit1, cuyo gen está mutado en el paciente, y donde se debe aislar el ARN fruto del “splicing” anómalo.

6. CONCLUSIONES

1. Las células endoteliales procedentes de un paciente de cavernomatosis familiar tipo 1, CCM1, presentan una mutación c.1563+1G>T en el consenso de splicing p.521sp
2. Se ha realizado un cultivo de células endoteliales del paciente, heterocigotas para esa mutación en *CCM1*, caracterizando su expresión y funcionalidad en comparación con células endoteliales control
3. El análisis de la expresión de ARN muestra que las células CCM1 tienen una expresión diferente a las células de control. Encontramos disminución de expresión de *eNOS*, *COX-2*, *PAI-1* y *Ciclina B2* y aumento de *VE-Cadherina 2* como posible compensación. No hay cambios significativos en gen mutado en *CCM1/Krit1*.
4. Los estudios funcionales de angiogénesis y de migración de las células endoteliales muestran defectos en las células del paciente.

Por un lado, el ensayo de tubulogénesis de las células CCM1, presenta un retraso temporal y una disminución de redes cerradas con respecto a las células control.

Además, la migración de las células CCM1, está retrasada significativamente con respecto al proceso de las células control.

Bibliografía

1. Haendel, M., Vasilevsky, N., Unni, D., Bologna, C., Harris, N., Rehm, H., Hamosh, A., Baynam, G., Groza, T., McMurry, J., Dawkins, H., Rath, A., Thaxon, C., Bocci, G., Joachimiak, M. P., Köhler, S., Robinson, P. N., Mungall, C., & Oprea, T. I. (2020). How many rare diseases are there? *Nature reviews. Drug discovery*, 19(2), 77–78. <https://doi.org/10.1038/d41573-019-00180-y>
2. Calandriello, L., Grimaldi, G., Petrone, G., Rigante, M., Petroni, S., Riso, M., & Savino, G. (2017). Cavernous venous malformation (cavernous hemangioma) of the orbit: Current concepts and a review of the literature. *Survey of Ophthalmology*, 62(4), 393-403. <https://doi.org/10.1016/j.survophthal.2017.01.004>
3. *Malformaciones Arteriovenosas – Clínica Neuros / Neurocirujano Valencia |*. (s. f.). https://neuros.net/es/generalidades_malformaciones_arterio-venosas/
4. Sartages, M., García-Colomer, M., Iglesias, C., Howell, B. W., Macía, M. J., Peña, P., Pombo, C. M., & Zalvide, J. (2022). GCKIII (Germinal Center Kinase III) Kinases STK24 and STK25 (Serine/Threonine Kinase 24 and 25) Inhibit Cavernoma Development. *Stroke*, 53(3), 976-986. <https://doi.org/10.1161/strokeaha.121.036940>
5. Posada, M. (s. f.). Enfermedades raras: Concepto, epidemiología y situación actual en España. https://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1137-66272008000400002
6. Moore, S. A., Brown, R. S., Christianson, T. J., & Flemming, K. D. (2014). Long-term natural history of incidentally discovered cavernous malformations in a single-center cohort. *Journal of Neurosurgery*, 120(5), 1188-1192. <https://doi.org/10.3171/2014.1.jns131619>
7. Labauge, P., Brunereau, L., Levy, C., Laberge, S., & Jp, H. (2000). The natural history of familial cerebral cavernomas: a retrospective MRI study of 40 patients. *Neuroradiology*, 42(5), 327-332. <https://doi.org/10.1007/s002340050893>

8. Horne, M., Flemming, K. D., Su, I., Stapf, C., Jeon, J. Y., Li, D., Maxwell, S. S., White, P. J., Christianson, T. J., Agid, R., Cho, W. I., Oh, C. W., Wu, Z., Zhang, J., Kim, J. H., Ter Brugge, K. G., Willinsky, R. A., Brown, R. S., Murray, G. D., & Salman, R. A. (2016). Clinical course of untreated cerebral cavernous malformations: a meta-analysis of individual patient data. *Lancet Neurology*, *15*(2), 166-173. [https://doi.org/10.1016/s1474-4422\(15\)00303-8](https://doi.org/10.1016/s1474-4422(15)00303-8)
9. Scimone, C., Bramanti, P., Alafaci, C., Granata, F., Piva, F., Rinaldi, C., Donato, L., Greco, F., Sidoti, A., & D'Angelo, R. (2017). Update on Novel CCM Gene Mutations in Patients with Cerebral Cavernous Malformations. *Journal of molecular neuroscience: MN*, *61*(2), 189–198. <https://doi.org/10.1007/s12031-016-0863-z>
10. Ricci, C., Riolo, G., & Battistini, S. (2021). Molecular genetic analysis of cerebral cavernous malformations: an update. *Vessel Plus*. <https://doi.org/10.20517/2574-1209.2021.28>
11. Glading, A., & Ginsberg, M. H. (2010). Rap1 and its effector KRIT1/CCM1 regulate β -catenin signaling. *Disease Models & Mechanisms*, *3*(1-2), 73-83. <https://doi.org/10.1242/dmm.003293>
12. Bautista, Z. T. J. (2022b). *Fisiopatología de las malformaciones cavernomas cerebrales: papel del EGFR y de las GCKIII quinasas*. <http://hdl.handle.net/10347/28761>
13. Riolo, G., Ricci, C., & Battistini, S. (2021). Molecular Genetic Features of Cerebral Cavernous Malformations (CCM) Patients: An Overall View from Genes to Endothelial Cells. *Cells*, *10*(3), 704. <https://doi.org/10.3390/cells10030704>
14. Van Nieuw Amerongen, G. P., Koolwijk, P., Versteilen, A. M. G., & Van Hinsbergh, V. W. (2003). Involvement of RhoA/Rho Kinase Signaling in VEGF-Induced Endothelial Cell Migration and Angiogenesis In Vitro. *Arteriosclerosis, Thrombosis,*

and Vascular Biology, 23(2), 211-217.

<https://doi.org/10.1161/01.atv.0000054198.68894.88>

15. Dejana, E. (2010). The Role of Wnt Signaling in Physiological and Pathological Angiogenesis. *Circulation Research*, 107(8), 943-952.
<https://doi.org/10.1161/circresaha.110.223750>
16. He, Y., Zhang, H., Yu, L., Gunel, M., Boggon, T. J., Chen, H., & Min, W. (2010). Stabilization of VEGFR2 Signaling by Cerebral Cavernous Malformation 3 Is Critical for Vascular Development. *Science Signaling*, 3(116).
<https://doi.org/10.1126/scisignal.2000722>
17. Carlos, C. C. (s. f.). *El endotelio: estructura, función y disfunción endotelial*.
https://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1409-00152017000200090#:~:text=El%20endotelio%20forma%20la%20superficie,1%20a%207%20m%206.
18. Ismail, A. A., Shaker, B. T., & Bajou, K. (2021). The Plasminogen-Activator Plasmin System in Physiological and Pathophysiological Angiogenesis. *International journal of molecular sciences*, 23(1), 337. <https://doi.org/10.3390/ijms23010337>
19. Reservados, I. U.- T. L. D. (s. f.). *Orphanet: Deficiencia congénita del inhibidor del activador del plasminógeno tipo 1*. https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/OC_Exp.php?Lng=ES&Expert=465
20. Meijide, J. A. G., & Carnota, J. J. G. (2000b). Fisiopatología de la ciclooxigenasa-1 y ciclooxigenasa-2. *Revista española de reumatología: Órgano Oficial de la Sociedad Española de Reumatología*, 27(1), 33-35.
<https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=3559875>
21. SAVALnet - *Los secretos de la sepsis*. (s. f.). SAVALnet.
<https://www.savalnet.bo/cienciaymedicina/progresosmedicos/19439.html>