**Reunión 11/05/2021 colaboración Genisteína**

***División del trabajo***

La Dra. Strømsnes llevará a cabo las validaciones in vitro.

Los Drs. Gambini y Strømsnes se centrarán en la interpretación biológica y fisiológica de los resultados.

Yo (Casas) me centraré en el empleo de las herramientas bioinformáticas que puedan ayudarnos a sacar más resultados.

***Por hacer***

1. Leerme en casa los trabajos que me pase Gambini, los cuales estan en la carpeta que él me ha pasado
2. Detectar microARN de las PBMCs almacenados en las microvesículas que sean significativos. Estos fueron secuenciados en microarrays GeneChip miRNA 4.0
3. Estudiar los ARNm significativos de las células troncales (protegidas con microvesículas tratadas con genisteína vs control). Estos fueron secuenciados en microarrays Clariom D Human (analizaré sólo los control y los tratados con genisteína).
4. Cruzar los datos de los microARN y los ARNm (pasar todos esos genes por Reactome, por ejemplo, y ver si algun ARNm diferencialmente expresado es un target de los miRNA). Podríamos hacer análisis de enriquecimiento génico en ellos.

Para el protocolo bioinformático, empezaré desde cero con datos brutos .CEL y de ahí haré todo el workflow bioinformático y compararé mis resultados con los de las chicas anteriores. Usaré R validaré en TAC

***Detalles experimento Genisteína***

Las células troncales que fueron expuestas a las microvesículas son **células troncales mesenquimáticas** (MSCs o *Mesenchymal Stem Cells*), son multipotentes y se obtuvieron de la pulpa de dientes humanos, ya que están muy protegidas y poco o nada contaminadas, dada la naturaleza del tejido del que provienen.

Para el experimento, expusieron las PBMCs a un cóctel compuesto de **genisteína 0,5 microMolar, resveratrol y DMSO** (un disolvente para que la genisteína y el resveratrol estén disponibles para las células, pues de por sí estos compuestos son poco solubles) y se cultivaron durante 48h. Las células **control** se sometieron sólo a **DMSO** (el disolvente).

Tras dicho tratamiento, se aislaron las microvesículas liberadas por las PBMCs y se expusieron las susodichas células troncales a las microvesículas y a una agresión con agua oxigenada. Tras el estrés oxidativo, midieron las células troncales viables con azul de tripano y camara de Neubauer. Las células troncales tratadas con genisteína sobrevivían más (p-valor < 0.05).

Los genes de Yamanaka controlan pluripotencia y ciclo celular, en el estudo de Gambini midieron algunos de ellos: oct-4, c myc y SOX2. En las células tratadas con genisteína se observó una disminución del nº de células en fase G2/M (¿posible indicio de que protege frente a tumores?).

La concentración de genisteína y resveratrol empleadas en el estudio son concentraciones encontradas en dietas (o sea, no son concentraciones exageradas). N**os interesa ver si las PBMCs se activan por respuesta a dicha dieta y cómo protegen** (cuál es el mecanismo de acción que subyace a la actividad protectora de sus microvesículas, pues los linfocitos pueden entrar y salir de tejidos...a lo mejor liberan microvesículas para regular las células del tejido y se van, quién sabe).

El estudio de Gambini se puede abordar de muchas maneras, pero **nos centramos en la capacidad que tienen las células inmunes (PBMCs)para liberar microvesículas protectoras, qué hay dentro de esas microvesículas, cómo protegen esas microvesículas a las celulas madre del experimento**, etc...

El resveratrol es lo blanco que hay en la superficie de la uva del vino tinto (es bueno, lava la uva pero no le quites eso blanco), aunque se encuentra en menor concentración en otros alimentos. Se cree que dicha sustancia protege frente al envejecimiento, pero ¿cómo?, no se sabe. En el trabajo de Gambini el efecto del resveratrol no sale significativo, pero podría ser porque el resveratrol protege a otros tipos de estrés (recordemos que las células fueron estresadas con H2O2 y nada más...) o necesite actuar conjuntamente con otra sustancia. La baja n muestral tampoco ayudó.

**Los ARNm los secuenciaron con microarrays Clariom D Human; los microRNA con GeneChip miRNA 4.0, ambos de Affymetrix.**

***Trivia***

* Se cree que en la superficie de la membrana de las microvesículas hay proteínas que reconocen el tejido diana y median el ingreso de las mismas al tejido, pero no se sabe a ciencia cierta.
* Los xenolíticos son sustancias que matan células en senescencia (las células senescentes son células que están jodidas y no pueden realizar sus funciones, deberían entrar en apoptosis pero en su lugar entran en G0)
* The Hallmarks of Aging (López-Otín *et al.*, 2013) es un artículo que trata el tema de las posibles causas del envejecimiento celular. No forma parte del experimento de Gambini, pero explica el tema de las células senescentes, por lo que se podría leer y referenciar si eventualmente decidimos enlazar el experimento de la genisteína con la senescencia celular. Las celulas senescentes se pueden hacer invulnerables, es decir, escapar a su muerte por células del sistema inmune (*i.e.* evitar que células inmunes las induzcan a la apoptosis). Sea como sea, no te centres en eso ahora.