

ESTUDIO DEL EFECTO DE LA RADIACIÓN IONIZANTE SOBRE CÉLULAS PROGENITORAS ENDOTELIALES DE TIPO ECFC

“Study of the effect of ionizing radiation on ECFC-type endothelial progenitor cells”

Trabajo de Fin de Grado

Grado de Biotecnología

Autora:

Silvia Gómez Ardanaz

Director:

Ángel Luis García Otín

Lugar de realización:

Unidad de Investigación Traslacional

Hospital Universitario Miguel Servet

Instituto de Investigación Sanitaria Aragón

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular

Universidad de Zaragoza

ÍNDICE

0. RESUMEN/ABSTRACT:	3
1. INTRODUCCIÓN:	4
2. PLANTEAMIENTO DEL TRABAJO:	8
3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS:	8
4. MATERIALES Y MÉTODOS:	9
4.1 Células ECFCs:	9
4.2 Técnicas de cultivo celular:	9
4.3 Irradiación de las células:	10
4.4 Ensayo de crecimiento con resazurina y cristal violeta:	10
4.4.1 Procesamiento de datos en Excel:	11
4.4.2 Tratamiento de datos en Jamovi:.....	11
4.5 Ensayo de viabilidad/citotoxicidad con resazurina y cristal violeta:	11
4.5.1 Procesamiento de datos en Excel:	11
4.6 Análisis del ciclo celular por citometría:	11
4.6.1 Procesamiento de datos en ModFit LT:	12
4.7 Análisis de la apoptosis celular por citometría:	12
4.7.1 Procesamiento de datos en Kaluza:	12
4.8 Análisis de la senescencia por citometría:	12
4.8.1 Procesamiento de datos en Kaluza:	13
4.9 Análisis de activación endotelial por citometría:	13
4.9.1 Procesamiento de datos en Kaluza:	13
4.10 Análisis de la expresión génica:	14
4.10.1 Procesamiento de datos en Excel:	15
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN:	15
5.1 Ensayos de crecimiento con resazurina y cristal violeta:	15
5.2 Ensayos de viabilidad/citotoxicidad con resazurina y cristal violeta:	17
5.3 Análisis del ciclo celular por citometría:	17
5.4 Análisis de la apoptosis celular por citometría:	19
5.5 Análisis de la senescencia celular por citometría:	20
5.6 Análisis de la activación endotelial por citometría:	21
5.7 Análisis de la expresión génica:	23
6. CONCLUSIONES/CONCLUSIONS:	25
7. BIBLIOGRAFÍA	26
8. ANEXOS	28
8.1 Anexo i:	28

8.2 Anexo ii:	30
8.3 Anexo iii:	34
8.4 Anexo iv:	35
8.5 Anexo v:	35

0. RESUMEN/ABSTRACT:

La radioterapia es una terapia oncológica convencional basada en el empleo de altas dosis de radiación ionizante. Como toda terapia, no está exenta de efectos secundarios. Los tejidos sanos se ven afectados por su aplicación y, entre ellos, el endotelio vascular es especialmente sensible. La radiación en este tejido puede dar lugar a disfunción endotelial y a la aparición de enfermedades cardiovasculares. Por todo esto, resulta importante disponer de modelos de estudio del endotelio para poder desarrollar estrategias que lo protejan de la radiación. Este trabajo explora la posibilidad de utilizar células endoteliales progenitoras de tipo ECFC como modelo personalizable del endotelio. Para ello, se sometieron ECFCs a dosis de 2, 4 y 8Gy y se compararon con un control no tratado a diferentes tiempos de ensayo. Se estudió el efecto que la radiación tenía sobre el crecimiento celular y su posible citotoxicidad. Usando citometría de flujo también se analizó posibles mecanismos implicados en el daño por la radiación (ciclo celular, senescencia y apoptosis) y en la activación del endotelio (detección de CD54 y CD62E). Por último, se analizó por qPCR la expresión de genes relacionados con funciones endoteliales (NOS3 y VEGFA) y con el desarrollo de la senescencia (CDKN1A y CDKN2A). Se observó una disminución del crecimiento celular a las 72 horas, una alteración del ritmo normal del ciclo celular, un incremento de la senescencia, un aumento de la activación endotelial y cambios en los patrones característicos de expresión génica. Por todo ello, se considera que las ECFCs podrían ser útiles para profundizar en la investigación de los efectos que la radiación ionizante tiene sobre el endotelio con el fin de construir un modelo basado en estas células.

Radiotherapy is a conventional oncologic treatment based on high doses of ionizing radiation. As any other therapy, it is not without side effects. Healthy tissues are affected by it and, among them, the vascular endothelium is specially sensitive. Radiation can cause endothelial dysfunction and the appearance of cardiovascular diseases. Therefore, it is important to have a model of study of the endothelium in order to develop strategies to protect it against radiation. This work investigates the possible use of ECFC-type endothelial progenitor cells as a customizable endothelial model. For this purpose, ECFCs were irradiated with 2, 4 and 8Gy of radiation and were compared with a non-treated control at different times. It was studied the radiation effects on cellular growth and its possible cytotoxicity. Furthermore, Flow cytometry was used to analyse possible mechanisms implicated on radiation damage (cellular cycle, senescence and apoptosis) and on endothelial activation (detection of CD54 and CD62E). Finally, qPCR was used to analyse gene expression of some genes related with endothelial functions (NOS3 and VEGFA) and senescence development (CDKN1A and CDKN2A). It was observed a reduction of cellular growth at 72 hours, a disruption of cellular cycle rhythm, an increase of senescence, a rise of endothelial activation and changes on the gene expression patterns. For all these reasons, ECFCs can be considered usable to further investigate the ionizing radiation effects on the endothelium in order to build an ECFC-based model.

1. INTRODUCCIÓN:

En los últimos años han aparecido nuevas terapias para el tratamiento del cáncer, como la terapia dirigida, la inmunoterapia o las terapias hormonales. Sin embargo, hoy en día los tratamientos convencionales siguen siendo de gran importancia para los pacientes.

La radioterapia es una terapia convencional que actúa a nivel local y se basa en el empleo de dosis altas de radiación ionizante, utilizando partículas u ondas de alta energía para eliminar las células cancerosas (1). Aproximadamente, el 50% de las personas diagnosticadas con cáncer acabarán recibiendo esta terapia durante el transcurso de su enfermedad (2). Como ejemplo, en el Hospital Miguel Servet de Zaragoza disponen de 3 equipos de radioterapia Versa HD de Elekta, y cada día tienen entre 24 y 39 pacientes/equipo (*dato del 27/02/24*), que es una cifra importante.

Pese a ser un tratamiento local e intentar que afecte a la menor cantidad de tejido sano posible, la radioterapia no está exenta de efectos adversos. Uno de los sistemas que más perjudicados se ve es el cardiovascular, pues los vasos sanguíneos recorren todo el cuerpo y las células endoteliales son muy sensibles a la radiación, sobre todo las que recubren los capilares (3).

El endotelio es la capa de células que recubre internamente los vasos sanguíneos y linfáticos. Como parte del sistema cardiovascular, interviene en el suministro de oxígeno y de nutrientes a todos los órganos y tejidos, así como en la eliminación del dióxido de carbono y de las sustancias de desecho, ya que forma una barrera semipermeable que conecta la sangre circulante con los tejidos. También tiene un papel fundamental en la inflamación, la homeostasis tisular, la coagulación y la angiogénesis. Además, regula el tamaño y la función de los órganos y los tejidos, presentando gran heterogeneidad en expresión génica y capacidad funcional para adaptarse a los requerimientos del tejido en que se encuentre (4).

La radiación puede causar daño agudo en el endotelio, en las primeras 4-6 semanas, o impactos a largo plazo, si se producen meses o años después de la terapia (3,5-8). Los efectos adversos a largo plazo se han confirmado gracias a datos epidemiológicos, en los que se ha visto que las dosis altas de radiación (>2Gy) acaban produciendo enfermedades cardiovasculares (7,9). Por esto mismo, es importante comprender cómo la radiación afecta al endotelio vascular para intentar minimizar este daño.

Las células que forman el endotelio se encuentran en estado quiescente (*Figura 1*), es decir, su proliferación y su migración es mínima o nula y no expresan o tienen un nivel basal bajo de quimioquinas, citoquinas y moléculas de adhesión (4). Estas células forman una barrera semipermeable gracias a sus uniones estrechas y adherentes entre células contiguas, que evitan pérdidas o fugas a través de la capa endotelial (8). Adicionalmente, liberan vasodilatadores, como óxido nítrico (NO) y prostaciclina; y vasoconstrictores, como endotelina y factor activador de las plaquetas (7). A diferencia de otras células, disponen de pocas mitocondrias y la energía que estas producen es solo una mínima parte de la que las células necesitan; por eso se piensa que la principal función de las mitocondrias en las células endoteliales es de tipo señalizador (7,9). Dada la diversidad existente entre el endotelio de los diferentes órganos y tejidos, su sensibilidad a la radiación puede ser igualmente heterogénea (3).

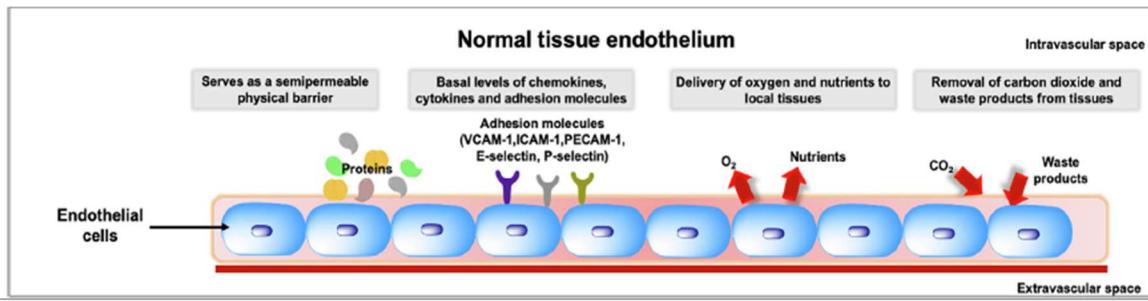


Figura 1: Endotelio normal. Las células endoteliales actúan como una barrera semipermeable que regula el paso de oxígeno y de nutrientes y la eliminación de dióxido de carbono y de sustancias de desecho. También regula el paso de proteínas y células a su través. Tiene niveles basales bajos de quimioquinas, citoquinas y moléculas de adhesión (8). Modificado de (8).

La radiación ionizante es capaz de producir la hidrólisis de moléculas de agua en el interior celular dando lugar a radicales hidroxilo (HO^-) e hidroperóxido (HOO^-), así como aniones superóxido (O_2^-) (6). Estas especies reactivas de oxígeno (ROS) son altamente reactivas y causan daño en el DNA, las proteínas y los lípidos de las células. Este estrés oxidativo en las células endoteliales desencadena una respuesta celular de manera casi inmediata (7). El endotelio pasa de un estado quiescente a otro activado (*Figura 2*), caracterizado por un aumento en la expresión de quimioquinas (p. ej.: CCL2 (10)), citoquinas (p. ej.: IL-6 (10)) y moléculas de adhesión (p. ej.: CD62E o selectina E o selectina endotelial y CD54 o molécula de adhesión intercelular 1 o ICAM-1 (11,12)), así como a producir más especies reactivas de oxígeno que agravan la situación (7,8).

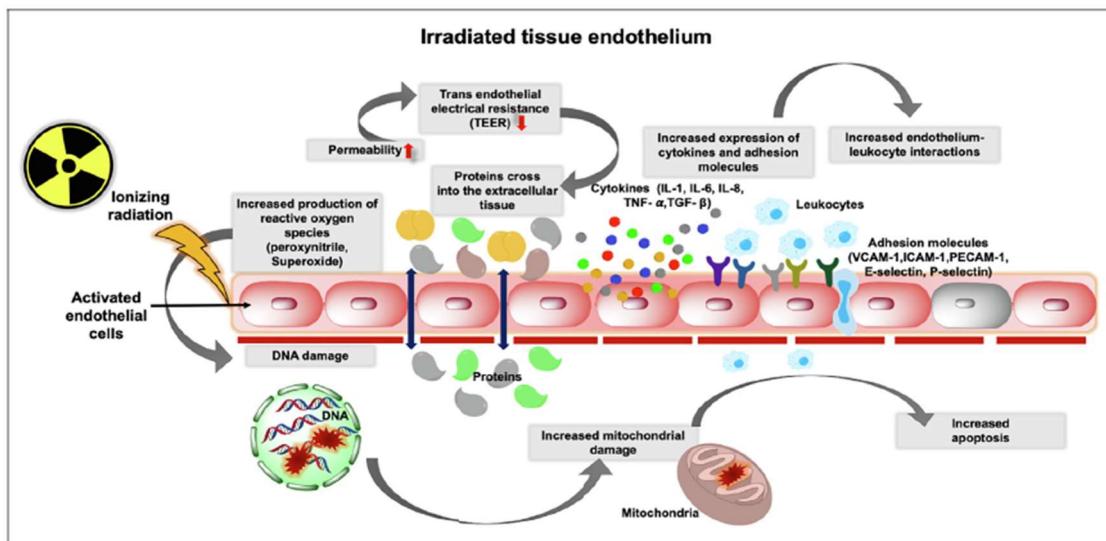
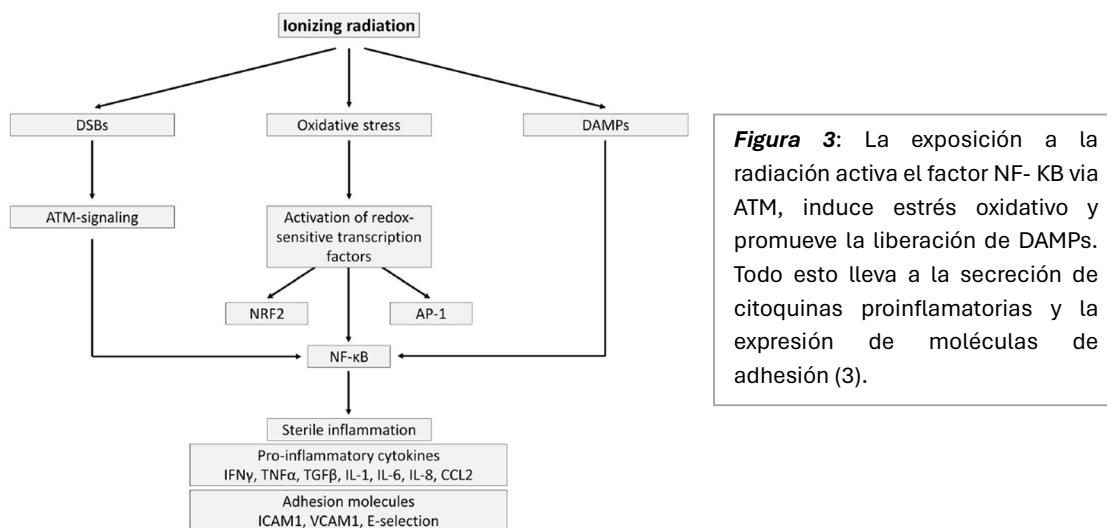


Figura 2: Endotelio irradiado. La radiación produce ROS que dañan el DNA y las mitocondrias, induciendo la apoptosis celular. Altera la permeabilidad de la barrera endotelial, permitiendo el paso de proteínas. Aumenta la expresión de citoquinas proinflamatorias, quimioquinas y moléculas de adhesión que facilitan la migración trasendotelial de los linfocitos (8). Modificado de (8).

Hay tres posibles mecanismos de esta activación (*Figura 3*):

- Cuando se produce la rotura de la doble hebra del DNA por las especies reactivas de oxígeno, la proteína ataxia telangiectasia mutada (ATM) se activa, lo que promueve la salida al citosol del modulador esencial IKK- γ /NF-KB (NEMO), que es un regulador de la quinasa inhibidora de KB (IKB). Esta quinasa tiene secuestrado al factor nuclear (NF)-KB en el citosol. Pero cuando NEMO sale al citoplasma, IKB es fosforilado y degradado y NF-KB se libera y es capaz de promover la expresión de muchos genes implicados en la inflamación (7).

- Las especies reactivas de oxígeno pueden activar directamente factores transcripcionales sensibles a la oxidación, como el factor nuclear eritroide similar al factor 2 (NRF-2), la proteína activadora 1 (AP-1) o NF-KB, induciendo la expresión de diferentes genes (7).
- Cuando las células están estresadas o apoptóticas pueden liberar patrones moleculares asociados al daño (DAMPs), que son moléculas intracelulares señalizadoras de la necrosis o del estrés celular, constituyentes de la matriz que indican una remodelación extensiva o factores que marcan la destrucción de la barrera endotelial. Cuando estas moléculas DAMPs se unen a las células endoteliales, se activan las rutas de señalización mediadas por NF-KB, la proteína quinasa activada por mitógeno (MAPK) y el factor regulador del interferón 3 (IRF3), lo que induce la expresión de moléculas de adhesión y citoquinas (7,8).



Si la exposición a la radiación es prolongada o se repite, el endotelio pierde la capacidad para desarrollar sus funciones normales y se produce lo que se denomina disfunción endotelial (7).

El daño que la radiación produce en las mitocondrias también causa la disfunción del endotelio. Las mitocondrias tienen tres funciones principales en este tipo celular: regulación del calcio (Ca^{2+}), control de la muerte celular y control del estrés oxidativo. Hasta hace unos años se hipotetizaba que la radiación podía alterar estas funciones causando una alteración en las mitocondrias (7,8). Recientemente, se ha confirmado que la radiación promueve la entrada de Ca^{2+} dentro de la matriz mitocondrial vía el uniportador mitocondrial de calcio. Esto produce un aumento de la actividad del ciclo de Krebs, por lo que llegan más sustratos a la cadena de transporte electrónico para la producción de ATP. Sin embargo, las ROS oxidan el centro ferro-sulfurado del complejo I de la cadena de respiración. Esto impide que realice el transporte de electrones de forma eficiente y que pueda acabar generando aniones superóxido y peróxido de hidrógeno con los electrones que le llegan de sus sustratos. Además, como la radiación daña el DNA mitocondrial, la cadena de transporte de electrones aún se ve más afectada. En resumen, el estrés oxidativo inicial causado por la radiación podría de este modo auto amplificarse dando lugar a un estrés oxidativo prolongado en el tiempo y a la disfunción mitocondrial (9).

Como consecuencias de la disfunción endotelial se producen la inflamación del endotelio, el deterioro del tono muscular, problemas hemostáticos, la destrucción de la barrera endotelial y senescencia prematura o muerte por apoptosis (7).

Las moléculas de adhesión y citoquinas cuya expresión se induce en el endotelio activado (7,8) favorecen el reclutamiento de leucocitos que terminan por atravesar la barrera endotelial (3,7). También se ha visto que los neutrófilos activados en estas condiciones pueden liberar trampas extracelulares de neutrófilos (NETs) que podrían aumentar aún más el daño e inflamación del endotelio (8). Por otro lado, los macrófagos reclutados por las citoquinas pueden producir ROS, que se ha visto que estimulan al TGF-β acelerando la fibrosis del endotelio (3).

El deterioro de la regulación del tono vascular se produce porque hay un desequilibrio entre vasodilatadores y vasoconstrictores endoteliales. Inicialmente, se produce la vasodilatación del endotelio, que es seguida por una vasoconstricción crónica. En un primer momento, el daño sobre el DNA produce la activación de ATM y de heat shock protein 90 (HSP90) que aumenta la expresión y actividad de la enzima óxido nítrico sintasa (NOS). Esta enzima se encarga de producir NO, un vasodilatador. Además, los niveles de prostaglandina, otro vasodilatador, también aumentan a corto plazo por daño oxidativo y al DNA. Una vez pasadas las primeras 24 horas, el efecto es el contrario. El daño oxidativo desacopla la actividad NOS debido a que su cofactor, tetrahidrobiopterina, es sensible a la oxidación, reduciendo la producción de NO y generando aniones superóxido en su lugar (7,9). Por otro lado, el NO se desactiva por los aniones superóxido convirtiéndose en peroxinitritos, que pueden nitrosilar las tirosinas de las proteínas, impidiendo sus funciones (3). Las prostaglandinas también se reducen después de ese incremento inicial y los vasoconstrictores, como endotelina-1 y angiotensina II incrementan (7,9).

Las prostaglandinas y el NO son también los principales factores anticoagulantes secretados por las células endoteliales que, como se ha comentado, se reducen a las 24 horas. La radiación también aumenta la síntesis del factor de von Willebrand, activa al factor activador de plaquetas y reduce la síntesis de trombomodulina. Esto provoca un estado procoagulante y protrombótico en el endotelio, promoviendo la agregación de plaquetas y la formación de coágulos (3,7).

La barrera que forma el endotelio se ve comprometida por la radiación. A dosis bajas, la integridad de las uniones entre células endoteliales se reduce debido a la reorganización del citoesqueleto y la redistribución de uniones adherentes (7) y estrechas (8). Este aumento en la permeabilidad de la barrera endotelial deja pasar proteínas y células al espacio subendotelial. Este es el caso del fibrinógeno, que favorece la fibrosis en el tejido que irriga el vaso (8).

Por último, la radiación puede causar senescencia y apoptosis en las células endoteliales, lo que podría depender de su estado de diferenciación y maduración (3). La senescencia es el proceso en el que una célula pierde su capacidad de dividirse de manera irreversible. Puede suceder porque sus telómeros se acorten demasiado (senescencia replicativa), o durante una situación de estrés (senescencia prematura) (7). En este caso, la radiación genera un fenotipo senescente caracterizado por la secreción de citoquinas, proteínas y otras sustancias que agravan aún más el estado disfuncional e inflamatorio de las células adyacentes (3). Los mecanismos descritos previamente de respuesta al daño a nivel de DNA via la proteína ATM (3), la disfunción de las mitocondrias y la activación endotelial están implicados en la transformación de las células endoteliales a un fenotipo senescente (7). Por otro lado, la apoptosis puede ocurrir de dos maneras: la vía intrínseca en la que la proteína ATM activa también a p53 que a su vez activa la cascada de las caspasas; o la activación del factor de necrosis tumoral (TNF) que induce la hidrolisis de esfingomielina en ceramida por la esfingomielinasa, lo que activa una serie de eventos que acaban en la muerte por apoptosis (3,7).

2. PLANTEAMIENTO DEL TRABAJO:

Como espero haya quedado claro tras lo expuesto, la protección del endotelio es muy importante para evitar que se produzcan daños por la radiación ionizante (8), lo que destaca el valor de obtener un modelo de investigación para su estudio. Este trabajo de fin de grado propone el uso de las células formadoras de colonias endoteliales (ECFCs) como modelo para el estudio del efecto de la radiación sobre el endotelio, ya que es posible aislarlas de manera mínimamente invasiva y personalizada debido a que existen protocolos que hacen posible su obtención a partir de precursores circulantes en sangre (ya sea sangre periférica de adulto o sangre de cordón umbilical) (13). Hoy en día, la investigación médica intenta ir hacia una medicina que se adapte a las características del paciente y de su proceso patológico. Esto es debido a que la eficacia y los efectos secundarios de los fármacos y las terapias dependen de las características de cada individuo. Disponer de modelos personalizados del endotelio del paciente posibilitaría estudiar su susceptibilidad a la radiación y proporcionar información útil para ajustar el tratamiento, así como probar fármacos protectores del endotelio de manera personalizada.

Las ECFCs son un tipo de células progenitoras cuya capacidad de diferenciación está restringida al tipo endotelial. Poseen una alta capacidad proliferativa, con la característica de ser de tipo clonal. In vivo, son capaces de participar estructuralmente en la reparación del endotelio dañado y en procesos angiogénicos. Se localizan circulando en sangre a muy baja concentración o en su nicho original en la zona subendotelial de grandes vasos (*Figura 4*) (13). Una vez aisladas y puestas en cultivo, retienen características de célula progenitora, pero se trata de cultivos primarios y estas propiedades, así como su capacidad proliferativa, se van perdiendo a lo largo de los pasos dando lugar a un fenotipo maduro.

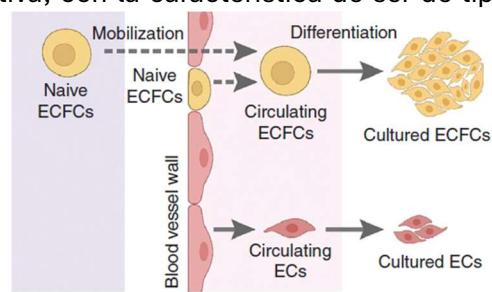


Figura 4: In vivo, las ECFCs se encuentran en su nicho original en la pared de grandes vasos (ECFCs naïve) o circulando en sangre (ECFCs circulantes) (13).

3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS:

La hipótesis de trabajo es que las ECFCs pueden constituir un modelo para el estudio del efecto de la radiación sobre el endotelio, lo que proporcionaría una herramienta para el desarrollo de aplicaciones de medicina personalizada en tratamientos oncológicos basados en radioterapia.

Para comprobar esta hipótesis se propone como objetivo general estudiar el efecto que tiene la aplicación de diferentes dosis de radiación ionizante (0, 2, 4 y 8Gy) sobre distintas características de ECFCs *in vitro* analizadas a diferentes tiempos (0-72 horas, según el ensayo).

Los objetivos específicos que se plantean son:

- Determinar el efecto sobre el crecimiento celular y su efecto citotóxico.
- Comparar el efecto sobre el desarrollo del ciclo celular.
- Observar el efecto sobre la inducción de apoptosis.
- Analizar el efecto sobre la inducción de senescencia.
- Investigar el efecto sobre el nivel de activación endotelial.
- Estudiar el efecto sobre la expresión de genes clave implicados en la actividad del endotelio en los procesos de senescencia.

4. MATERIALES Y MÉTODOS:

4.1 Células ECFCs:

Como ya se ha dicho, las ECFCs pueden aislarse a partir de precursores circulantes en sangre. El procedimiento de aislamiento consiste en separar la fracción de células mononucleares en gradiente de densidad con Histopaque 1077 (Sigma) y cultivarla sobre una superficie recubierta de colágeno de tipo I (Corning) y en medio para células endoteliales (EGM-2 MV de Lonza). Tras un periodo de 14 a 28 días aparecen colonias de células de morfología endotelial que son altamente proliferativas y dan lugar a las líneas primarias de ECFCs, que pueden almacenarse congeladas (14). Para los experimentos se usaron stocks congelados de células aisladas de sangre de cordón umbilical por el grupo de investigación en el que se ha hecho este trabajo.

4.2 Técnicas de cultivo celular:

Para cultivar las ECFCs se usa el medio EGM-2 MV. Este medio cuenta con 500 ml de medio basal (CC-3156) y una serie de suplementos que se añaden en el laboratorio: FBS, hidrocortisona, hFGF-B, VEGF, R3-IGF-1, ácido ascórbico, hEGF y GA-1000 (gentamicina/anfotericina) (15). Salvo que se diga lo contrario, en los experimentos realizados se usa el medio con todos los componentes indicados y el FBS a 5%.

Las ECFCs son células adherentes, por lo que se usa un recubrimiento de colágeno de tipo I para que crezcan distribuidas homogéneamente y se adhieran mejor. Para el recubrimiento de las superficies de cultivo se utiliza una disolución de colágeno a 50 µg/ml en ácido acético (Sigma) a 20 µM que se esteriliza por filtración. Las placas o frascos de cultivo se incuban con volúmenes apropiados de esta solución durante toda la noche a 37°C y posteriormente se lavan 3 veces con PBS sin calcio ni magnesio (PBS sin Ca²⁺/Mg²⁺) (Lonza) para eliminar el medio ácido antes de usar con células.

Como ya se ha mencionado, para estos experimentos se usaron stocks congelados de ECFCs. La descongelación de viales de células congeladas se realizó por inmersión en baño de agua a 37°C durante un tiempo mínimo y resuspensión de las células directamente en un frasco de 75 cm²(T75) con medio de cultivo precalentado en incubador.

Para realizar un pase celular se lavan los frascos en expansión (normalmente T75) tres veces con PBS sin Ca²⁺/Mg²⁺ y se añade acutasa (Corning) para levantar las células. Una vez despegadas, se inhibe la proteasa añadiendo medio EGM-2 MV y se recoge la mezcla en un tubo falcón. Este tubo falcón se centrifuga 5 minutos a 250 xg y 22°C. Se quita el sobrenadante y se resuspende el pellet en 0,5-2 ml de EGM-2 MV según su tamaño. Para cuantificar la concentración y viabilidad celular se toma una alícuota a la que se añade azul de tripán (1:1 v/v), un marcador vital, y se cuenta con una cámara de Neubauer. El siguiente paso sería calcular la cantidad a sembrar en las placas, para los experimentos; los frascos, para seguir expandiendo; o, si hay muchas células, se guarda parte para congelar.

El protocolo de congelación comienza con una centrifugación de 5 minutos a 250 xg y a 22°C. Trabajando ya en hielo, se quita el sobrenadante y se resuspende el pellet en el medio de congelación (95% FBS y 5% DMSO). Se congelan 1 millón de células en 1 ml de medio, que se echa en un criotubo apropiado para congelar a -80°C y después almacenar en nitrógeno líquido.

4.3 Irradiación de las células:

Para los ensayos de irradiación se siembran las células en placas de 24 o 6 pocillos (P24 y P6, respectivamente) recubiertas con colágeno mínimo 24 horas antes del ensayo.

El equipo que se utiliza para irradiar las células es un acelerador Versa HD de Elekta (*Figura 5*) disponible en el Servicio de Radiofísica Hospitalaria del Hospital Universitario Miguel Servet. Este equipo es una plataforma diseñada para la radioterapia avanzada que permite un ajuste a la forma tridimensional de los tumores, minimizando la exposición de los tejidos sanos adyacentes.



Figura 5: Acelerador Versa HD de Elekta. En negro a la derecha de la imagen se puede ver la camilla donde se tumba a los pacientes y, sobre ella, una placa de células preparada para el ensayo de irradiación (Zoom en la Figura 6).

Las muestras preparadas se colocan entre unas placas de plástico de un material de densidad similar al agua (*Figura 6*). Estas placas se usan para atenuar la incertidumbre de la radiación ionizante, ya que a partir de 3 cm de espesor esta es más homogénea y así llega de manera uniforme a todos los pocillos. Las placas se irradian dos veces, una por arriba y otra por abajo, con los mismos Grays (Gy) de radiación. Las dosis elegidas para los ensayos son 2, 4 y 8Gy, ya que esta es la cantidad estándar aplicada en el Hospital Miguel Servet para los tratamientos de oncología. Solo en determinados casos, entre 8-10 veces al año, se usa una radiación superior (10Gy).

Figura 6: P24 colocada en la mesa de los pacientes de la máquina de radioterapia. La placa se encuentra entre las planchas de plástico para disminuir la incertidumbre de la radiación.



4.4 Ensayo de crecimiento con resazurina y cristal violeta:

En este ensayo se estudia el efecto que diferentes dosis de radiación tienen sobre el crecimiento celular durante 72 horas. Se usan 4 P24, cada una irradiada a una dosis diferente (2, 4 y 8Gy y una placa control sin irradiar), y se emplean dos métodos de análisis: resazurina y cristal violeta. Las placas de 24 pocillos tienen 6 columnas y 4 filas, de manera que cada fila corresponderá con un tiempo del ensayo (0, 24, 48 y 72 horas) y cada tiempo tendrá 6 réplicas técnicas.

El método de resazurina se basa en la conversión del compuesto resazurina (Sigma) en resorufina por las enzimas reductoras de las mitocondrias de células viables. La resorufina es un compuesto fluorescente, mientras que la resazurina no; lo que permite medir este cambio por fluorescencia. Este método permite estimar indirectamente la cantidad de células viables.

Para el procedimiento de resazurina, se prepara una solución 10X diluyendo con PBS sin Ca²⁺/Mg²⁺ desde un stock 1000X de resazurina (44 mM). Se añade a los pocillos 55,6 µl (44 µM) sobre 500 µl de medio y se incuba 2-3 horas en estufa (importante que sea siempre el mismo tiempo a lo largo de los días que dura el ensayo). A continuación, se pasan por duplicado a placas de 96 pocillos (P96) que se medirán en el espectrofotómetro para placas Synergy HD de Biotek

con una longitud de onda de excitación de 540 nm y una de emisión de 590 nm. Cada día se hace este protocolo a una fila de cada placa/condición y una vez retirado todo el medio con resazurina se pasa a la fijación por glutaraldehído (Sigma) para el protocolo del cristal violeta.

El cristal violeta es un compuesto que tiñe de manera inespecífica proteínas y ácidos nucleicos. En esta técnica se tiñen todas las células y estructuras celulares adheridas a la superficie de cultivo independientemente de la viabilidad que muestren, aunque mayoritariamente serán células viables. Por tanto, la intensidad del marcaje se considera proporcional a la cantidad de células presentes, proporcionando una estimación indirecta de la cantidad de células.

Se empieza el protocolo lavando los pocillos con PBS con calcio y magnesio (PBS con Ca²⁺/Mg²⁺) (Lonza) y añadiendo 100 µl de glutaraldehído 1%. Se incuba 10 minutos a 37°C, se elimina y se lavan los pocillos tres veces con PBS con Ca²⁺/Mg²⁺, dejándose el último lavado. Esto se hace a cada tiempo del ensayo y, una vez fijados todos los pocillos, se elimina el PBS y se añaden 150 µl de cristal violeta 0,1% (Sigma). Se deja actuar 30 minutos y después se lavan los pocillos tres veces bajo una corriente suave de agua. Una vez las placas están secas, se añaden 250 µl de ácido acético 10% para disolver el cristal violeta y se pasan por duplicado a P96. Por último, se mide la absorbancia a 570 nm en el espectrofotómetro Synergy HD.

4.4.1 Procesamiento de datos en Excel:

Los datos de fluorescencia y absorbancia se han registrado en el software Gen5 v.1.09 (BioTek) y se han procesado en Excel v.2405 (Microsoft 365). Se han normalizado considerando como el 100% de fluorescencia/absorbancia la media común del valor obtenido en el tiempo cero de todas las réplicas y todas las dosis, ya que se siembran las mismas células en todos los pocillos y se considera que en el tiempo cero del ensayo no da tiempo a ver los efectos de la radiación.

4.4.2 Tratamiento de datos en Jamovi:

Se hace un ANOVA de medidas repetidas en el software estadístico abierto Jamovi v.2.5 (16).

4.5 Ensayo de viabilidad/citotoxicidad con resazurina y cristal violeta:

El procedimiento es el mismo que en el ensayo de crecimiento, pero en este caso las células se siembran en confluencia y el día de la irradiación se cambia el medio a EGM2-MV con 1% FBS.

4.5.1 Procesamiento de datos en Excel:

Mismas consideraciones para el procesamiento de datos que en el ensayo de crecimiento.

4.6 Análisis del ciclo celular por citometría:

En los experimentos de análisis por citometría se siembran 4 P6 que se irradian cada una a una dosis (0, 2, 4 y 8Gy) y solo hay un tiempo de ensayo, 24 horas. Se utiliza un pocillo/placa para cada análisis y el resto para poner controles. Se empieza levantando las células con acutasa, como en el procedimiento de pase celular; y, después de centrifugar, se resuspenden en 200 µl de PBS sin Ca²⁺/Mg²⁺ y con 1% de albúmina de suero bovino (PBS-1%BSA).

El análisis del ciclo celular se basa en medir la cantidad de DNA de las células, que permite distinguirlas en las diferentes fases del ciclo celular: G0-G1, G2-M y S. En primer lugar, se fijan las células con 1 ml de etanol 70% frío mezclando continuamente en el vórtex y se incuban 24 horas a -20°C. A continuación, se centrifugan 5 minutos a 200 xg, se elimina el sobrenadante y se resuspenden en 1 ml de PBS. Se repite este paso resuspendiendo en 1 ml de PBS con 50 g/ml de

ioduro de propidio (IP) y 100 g/ml de RNasa (kit ImmunoStep) y se incuban 30 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad (17).

El citómetro utilizado para este análisis y los siguientes es un modelo analizador Gallios (Beckman Coulter) del Servicio Científico Técnico de Citometría y Separación Celular del Instituto Aragonés de Ciencias de la Salud (IACS) en el CIBA. En este análisis se utilizó el láser de 488 nm para la excitación y se recogieron datos de intensidad de fluorescencia de IP en el canal de detección FL3 (605-635 nm) que corresponden a la cantidad de DNA por célula analizada.

4.6.1 Procesamiento de datos en ModFit LT:

Los datos son procesados con el software de análisis de curvas ModFit LT (Verity Software House), que genera modelos de deconvolución a curvas gaussianas para cada subpoblación celular en un histograma de distribución del contenido de DNA por célula (*Figura 9*).

4.7 Análisis de la apoptosis celular por citometría:

Para el análisis de la apoptosis celular se utiliza el kit de Immunostep Biotech “*FITC Anexin V Apoptosis Detection kit with IP*”. El principio de detección se basa en el desplazamiento (flip-flop) de fosfatidilserina de la capa interna de la membrana celular a la capa externa en las primeras fases del proceso apoptótico. La anexina V se une a este fosfolípido, por lo que pueden detectarse las células en fases tempranas de apoptosis si se conjuga con un fluorocromo (isocianato de fluoresceína o FITC, en este caso). Además, se usa IP que es un marcador vital; es decir, solo penetra en células muertas, aquellas en las que la integridad de la membrana celular está comprometida y se ha vuelto permeable. Se preparan tres controles en este análisis: un control solo con Anexina V-FITC (control anexina), otro con IP (control IP) y otro sin ninguno de los dos (blanco). Los dos primeros se hacen para compensar la señal en caso de que den fluorescencia en el canal del otro fluoróforo y el último para medir la autofluorescencia.

En este análisis se utilizó el láser de 488 nm para la excitación y se recogieron datos de intensidad de fluorescencia de FITC en el canal de detección FL1 (505-545 nm) y de IP en el canal FL3.

4.7.1 Procesamiento de datos en Kaluza:

Se utilizó el software de análisis de experimentos de citometría de flujo Kaluza v2.1 (Beckman Coulter). Se adquirieron al menos 10.000 eventos por muestra, que se delimitaron en las diferentes poblaciones de células marcadas por medio de sucesivas representaciones gráficas.

Se hace una representación bidimensional (dot plot) mostrando tamaño/complejidad (FSC/SSC) de los eventos adquiridos, de los que se selecciona mediante un gate oval los que corresponden morfológicamente a células. Estos eventos seleccionados se visualizan en un dot plot mostrando la fluorescencia de los canales FL1 (para Anexina V-FITC) y FL3 (para IP) y se divide en cuadrantes que permiten cuantificar las poblaciones celulares con los diferentes marcas (Anexo i).

4.8 Análisis de la senescencia por citometría:

Para el análisis de la senescencia se utiliza el kit de Invitrogen “*CellEvent Senescence Green Flow Cytometry Assay Kit*” basado en la detección de la actividad β-galactosidasa. Cuando las células entran en senescencia, hay un aumento de esta actividad, que puede ser medido por citometría gracias al sustrato “*CellEvent™ Senescence Green Probe*”, desde el que se libera una molécula fluorescente por la actividad β-galactosidasa incrementada en células senescentes.

En este análisis se utilizó el láser de 488 nm para la excitación y se recogieron datos de intensidad de fluorescencia en el canal de detección FL1, que corresponderán a la fluorescencia de las células con actividad β -galactosidasa.

4.8.1 Procesamiento de datos en Kaluza:

Se utilizó el software de análisis de experimentos de citometría de flujo Kaluza v2.1 (Beckman Coulter). Se adquirieron al menos 10.000 eventos por muestra, que se delimitaron en las diferentes poblaciones de células marcadas por medio de sucesivas representaciones gráficas.

Se hace un dot plot mostrando tamaño/complejidad (FSC/SSC) de los eventos adquiridos, de los que se selecciona mediante un gate oval los que corresponderían morfológicamente a células. Estos eventos se visualizan en histogramas mostrando la fluorescencia en el canal FL1. Se establece un umbral en la muestra control (5% de células senescentes en 0Gy), que se aplica al resto de muestras para establecer la proporción relativa de células senescentes (*Figura 11*).

4.9 Análisis de activación endotelial por citometría:

Como ya se ha visto en la *Introducción*, cuando el endotelio se activa, expresa moléculas de adhesión celular en su superficie. Por tanto, para ver la activación endotelial se va a detectar la presencia de CD54 y CD62E. Los anticuerpos que se van a utilizar para detectar estas moléculas de adhesión son anticuerpos monoclonales de ratón de AbD Serotec.

Partiendo de las células resuspendidas en PBS-1%BSA, se añaden 10 μ L del anticuerpo anti-CD62E (isotipo IgG2b) conjugado a ficoeritrina (PE) y del anticuerpo anti-CD54 (isotipo IgG1) conjugado a FITC. Se incuban 30 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad, se centrifugan 30 segundos a máxima velocidad de microcentrífuga y se elimina el sobrenadante con el exceso de anticuerpo. Luego se lavan con 500 μ L de PBS sin Ca²⁺/Mg²⁺ y se repite la centrifugación resuspendiendo el pellet en 500 μ L de PBS sin Ca²⁺/Mg²⁺ y 1 μ L de Sytox blue (Invitrogen). El Sytox blue es un colorante vital, que tiñe las células muertas. Se preparan tres controles para el ensayo: uno sin anticuerpos (blanco) para detectar si hay autofluorescencia y otros dos controles consistentes en anticuerpos del mismo isotipo que los anticuerpos específicos y conjugados con los fluorocromos correspondientes. Los controles de isotipo permiten determinar la unión inespecífica de los anticuerpos utilizados en el ensayo.

En este análisis se utilizó el láser de 405 nm para la excitación y la detección de la fluorescencia del Sytox blue en el canal de detección FL9 (430-470 nm); y el láser de 488 nm para recoger la fluorescencia de FITC en el canal FL1 y de PE en el canal FL2 (560-590 nm).

4.9.1 Procesamiento de datos en Kaluza:

Se utilizó el software de análisis de experimentos de citometría de flujo Kaluza v2.1 (Beckman Coulter). Se adquirieron al menos 10.000 eventos por muestra, que se delimitaron en las diferentes poblaciones de células marcadas por medio de sucesivas representaciones gráficas.

Se hace un dot plot mostrando tamaño/complejidad (FSC/SSC) de los eventos adquiridos, de los que se selecciona con un gate oval los que corresponden morfológicamente a células. En primer lugar, se visualizan estos eventos en un histograma mostrando la fluorescencia en el canal FL9, lo que permite centrar los análisis en las células vivas. A continuación, se visualizan las células vivas en histogramas mostrando la intensidad de fluorescencia en los canales FL1 (para FITC) y FL2 (para PE). En este paso se analizan las células marcadas con los controles de isotipo para

establecer umbrales de lo que se consideran células marcadas y no marcadas, así como para calcular la compensación de fluorescencia que habrá que aplicar al doble marcaje. Por último, sobre las células con doble marcaje se aplican los umbrales determinados con los controles y se hace un dot plot que permitirá determinar la proporción celular con cada marcaje (*Anexo ii*).

4.10 Análisis de la expresión génica:

Con el fin de estudiar como la radiación afecta a la expresión génica a las 24 y 48 horas se preparan 4 P6 que se van a irradiar cada una con una de las dosis ya mencionadas.

El primer paso sería lisar las células. Se retira el medio EGM-2 MV de los pocillos, se lava con PBS con Ca²⁺/Mg²⁺ y se añaden 300 µl/pocillo de TRI Reagent (MRC). Se reúne el contenido de 3 pocillos en un tubo eppendorf, que se congela a -80°C hasta su uso. Una vez obtenidas todas las muestras, se descongelan y se centrifugan 10 minutos a 12.000 xg y a 22°C para eliminar el DNA genómico. Se pasa el sobrenadante a un nuevo tubo eppendorf y se añaden 0,1 volúmenes de 1-bromo-3-cloropropano (Sigma)/ml TRI Reagent. Se agita en el vortex, se deja reposar 10 minutos a temperatura ambiente y se centrifuga 15 minutos a 12.000 xg a 4°C. La mezcla se habrá separado en una fase acuosa superior, una fase orgánica inferior y la interfase entre ambas. Se pasa la fase acuosa con el RNA a un tubo eppendorf limpio y se añade un volumen de etanol 70%.

Una vez aislado el RNA, hay que purificarlo. Se utiliza el “*RNA Clean-Up and Concentration Micro-Elute Kit*” de Norgen, basado en la adhesión del RNA de la muestra a una resina. Después de tres lavados con la solución de lavado A, se eluye el RNA con un buffer de elución. El DNA genómico que se haya podido arrastrar en el aislamiento se elimina con un “*DNA-free kit*” de Ambion, que se basa en incubar la muestra con una rDNasa durante 30 minutos a 37°C. La enzima se inactiva con una resina, que se elimina tras un paso de centrifugación a 10.000 xg.

El RNA total obtenido se retrotranscribe para obtener cDNA. Se debe cuantificá con un Nanodrop 1000 (Thermofisher) para calcular el volumen de reacción necesario para que se retrotranscriban los mismos ng/µl de RNA de cada muestra. Se utiliza para la retrotranscripción el “*NZY First-Strand cDNA Synthesis kit*” de NZYtech y un termociclador Mycycler (BioRad). El programa del termociclador cuenta con una incubación de 10 minutos a 25°C, seguida de otra de 10 minutos a 50-55°C y un último paso de inactivación de la reacción de 5 minutos a 85°C. A continuación, se trata la muestra con RNasa H durante 20 minutos a 37°C para eliminar el RNA de la muestra.

Por último, se realiza una qPCR utilizando el “*NZYSupreme qPCR Green Master Mix (2X), ROX plus kit*” de NZYtech y un termociclador StepOne Plus (Applied Biosystems). Se analiza cada muestra por triplicado y con un control de RNA no retrotranscrita por gen y muestra. Se preparan los volúmenes de reacción para que haya 20 ng de cDNA/RNA. En los blancos (uno por gen) se echa agua destilada estéril. Se van a medir 5 genes, cuyos oligos pueden encontrarse en el *Anexo iii*: el gen de la enzima gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH); el gen de la enzima NOS endotelial (NOS3); el gen del factor de crecimiento endotelial vascular A (VEGFA); el gen del inhibidor de quinasa dependiente de ciclina 1A (CDKN1A o p21); y el gen del inhibidor de quinasa dependiente de ciclina 2A (CDKN2A o p16). El programa del termociclador tiene 42 ciclos: un ciclo de 10 minutos a 95°C; los ciclos 2-41 con un paso de desnaturización de 15 segundos a 95°C y un paso de hibridación y extensión de 1 minuto a 60°C; y en el último ciclo se hace la curva de melting, que consiste en la desnaturización térmica del producto final de la PCR desde 60°C a 90°C a un ritmo de 1°C/minuto y permite verificar la especificidad del producto amplificado.

4.10.1 Procesamiento de datos en Excel:

Los datos del valor umbral del número de ciclos (CT) se han registrado en el software StepOne v.2.2.2 (Life Technology) y se han procesado en Excel v.2405 (Microsoft 365). El gen GAPDH se ha utilizado como gen de referencia para normalizar. Los valores de fold change representados en la *Figura 13* se han calculado utilizando el método delta-delta Ct (ddCt):

$$\text{dCT}_{\text{gen_muestraA}} = \text{CT}_{\text{gen_muestraA}} - \text{CT}_{\text{GAPDH}_{\text{muestraA}}}$$

$$\text{ddCT}_{\text{gen_muestraA}} = \text{dCT}_{\text{gen_muestraA}} - \text{dCT}_{\text{gen_muestraControl}}$$

$$\text{Fold change}_{\text{gen_muestraA}} = 2^{-\text{ddCT}_{\text{gen_muestraA}}}$$

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN:

5.1 Ensayos de crecimiento con resazurina y cristal violeta:

El objetivo del ensayo de crecimiento es estudiar si la radiación ionizante modifica el patrón de crecimiento de las ECFCs. El crecimiento celular es un cómputo entre proliferación, arresto celular (senescencia) y muerte; la radiación podría afectar cualquiera de estos procesos. Por tanto, con este ensayo se quiere analizar si las ECFCs tienen un crecimiento diferente si son irradiadas, y si hay diferencias entre las dosis en estudio. Como ya se ha mencionado, el ensayo de crecimiento se hace utilizando dos compuestos: cristal violeta y resazurina.

Lo primero que se observa al mirar la *Figura 7* es que los resultados de ambos métodos no se correlacionan. En resazurina (*Figura 7 B,D y F*) se ve lo que podría ser una curva de crecimiento linear normal: las células control a las 24 horas casi han duplicado su crecimiento. Las condiciones irradiadas también crecen a un ritmo semejante al control a las 24 horas, pero a las 72 horas el crecimiento es más lento que el de la condición control o incluso se detiene (*Figura 7-F*). Lo que no se observan son diferencias entre dosis. Sin embargo, en cristal violeta (*Figura 7 A,C y E*) hay más variaciones entre las réplicas, no puede verse un crecimiento linear ni siquiera en el control y no podría predecirse ningún patrón de afectación por la radiación.

Los métodos de resazurina y de cristal violeta se utilizan para medir el crecimiento celular, pero hay que tener en cuenta que se basan en diferentes características celulares: el cristal violeta tiñe de manera inespecífica DNA y proteínas, por lo que podría relacionarse con la morfología. Hay que considerar que no todas las células tienen mismo tamaño. Además, las células senescentes, cuya proporción puede aumentar por la acción de la radiación ionizante, suelen presentar un tamaño aumentado en comparación con células quiescentes o en división, lo que podría alterar la estimación de la cantidad de células mediante este método. Por otro lado, la resazurina es una medida del metabolismo. Esto podría explicar las diferencias observadas entre ambos métodos de ensayo y por qué no se correlacionan.

Dado que los ensayos constituyen réplicas biológicas independientes, se pudo hacer un análisis estadístico de los datos obtenidos mediante ANOVA de medidas repetidas. Los datos utilizados pueden encontrarse en los Anexo iv y Anexo v. Pese a la tendencia que se aprecia en las medidas realizadas con resazurina, el test utilizado no detecta diferencias estadísticamente significativas.

Kinev et al. hicieron un ensayo de crecimiento de células ECFCs basado en la resistencia medida por electrodos. Tras irradiar las células con 0,2Gy, los resultados obtenidos fueron similares a los

conseguidos con resazurina en este trabajo: mismo crecimiento celular de las muestras irradiadas que en el control en las primeras 48 horas, pero un descenso a las 72 horas (18).

Si se consideran los datos de este artículo y los obtenidos por resazurina, se ve un cambio en el crecimiento a las 72 horas, por lo que podría ser interesante ver el efecto de la radiación ionizante a largo plazo con un ensayo clonogénico.

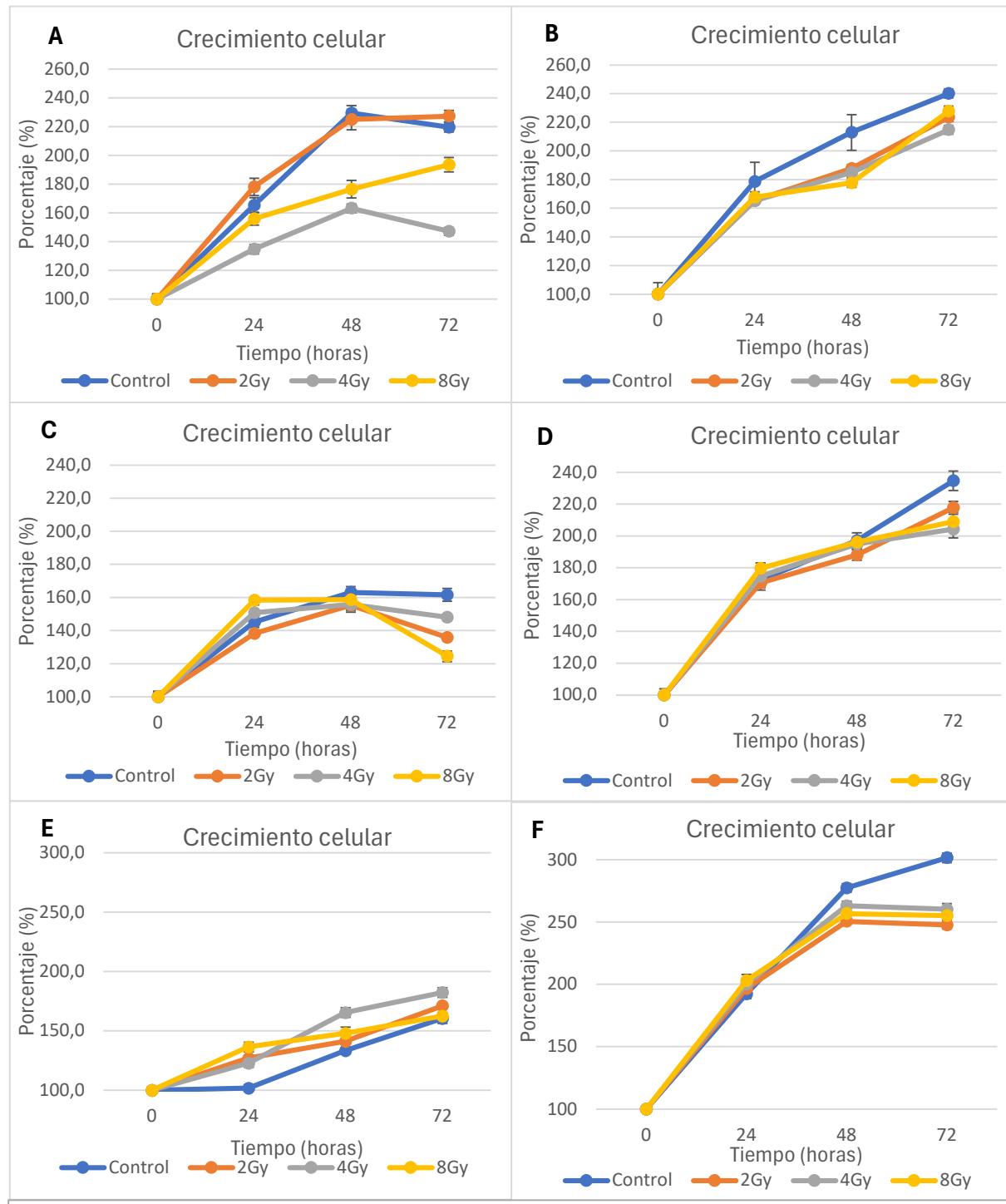


Figura 7: Representaciones gráficas del porcentaje de absorbancia de cristal violeta (A,C,E) y de fluorescencia de resorufina (B,D,F) normalizados a lo largo del tiempo (cuatro medidas; 0 horas, 24 horas, 48 horas y 72 horas). Cada pareja A-B, C-D, E-F corresponden a los resultados de 3 réplicas biológicas sembradas 24 horas pre-irradiación con: A-B) 25.000 cel/pocillo; C-D) 15.000 cel/pocillos; y E-F) 5.000 cel/pocillos. Los datos representados en estas gráficas pueden encontrarse en el Anexo ii (cristal violeta) y Anexo iii (resazurina).

5.2 Ensayos de viabilidad/citotoxicidad con resazurina y cristal violeta:

En los ensayos de crecimiento celular las células se siembran a una densidad no muy alta para permitir que sigan proliferando. Sin embargo, en este ensayo se quiere estudiar solo la citotoxicidad de la radiación ionizante, no cómo esta afecta al crecimiento celular. Por tanto, se permite que las células alcancen confluencia antes de aplicar el tratamiento y se reduce la concentración de FBS en el medio al 1% para reducir su estado proliferativo.

En la *Figura 8-B* se pueden ver los resultados del ensayo con resazurina. No existen diferencias significativas entre las condiciones en ninguno de los tiempos considerados en el estudio.

Sin embargo, si se observa la *Figura 8-A* sí hay diferencias entre las condiciones. El porcentaje de absorbancia de cristal violeta es menor en las muestras irradiadas que en el control en todos los tiempos del ensayo. Por tanto, parece que la radiación ionizante sí produce un descenso en la viabilidad de las ECFCs irradiadas. La dosis que parece afectar más a las células es la de 4Gy.

Nuevamente, los resultados de estos dos métodos no se correlacionan. En este caso, podrían interpretarse como que la radiación disminuye la viabilidad celular, tal y como se observa en la *Figura 8-A*; pero aumenta la actividad enzimática de las células y por ello se puede ver el mismo porcentaje de resazurina reducida en la *Figura 8-B*.

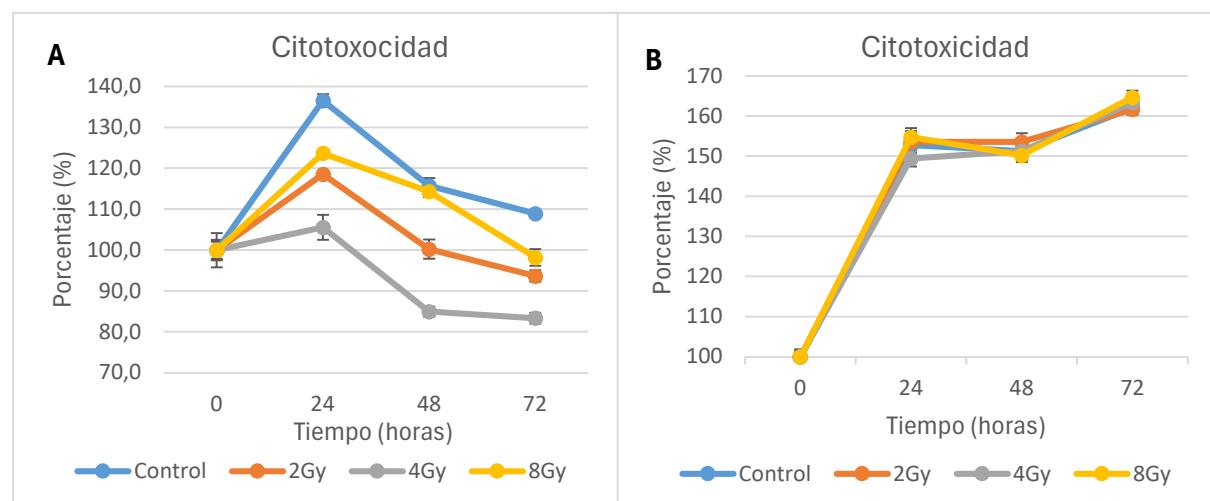


Figura 8: Representaciones gráficas del porcentaje de absorbancia del cristal violeta (A) y de fluorescencia de resorufina (B) normalizados a lo largo del tiempo (cuatro medidas; 0 horas, 24 horas, 48 horas y 72 horas). Las placas se sembraron 72 pre-irradiación con 5.250 cel/pocillo.

5.3 Análisis del ciclo celular por citometría:

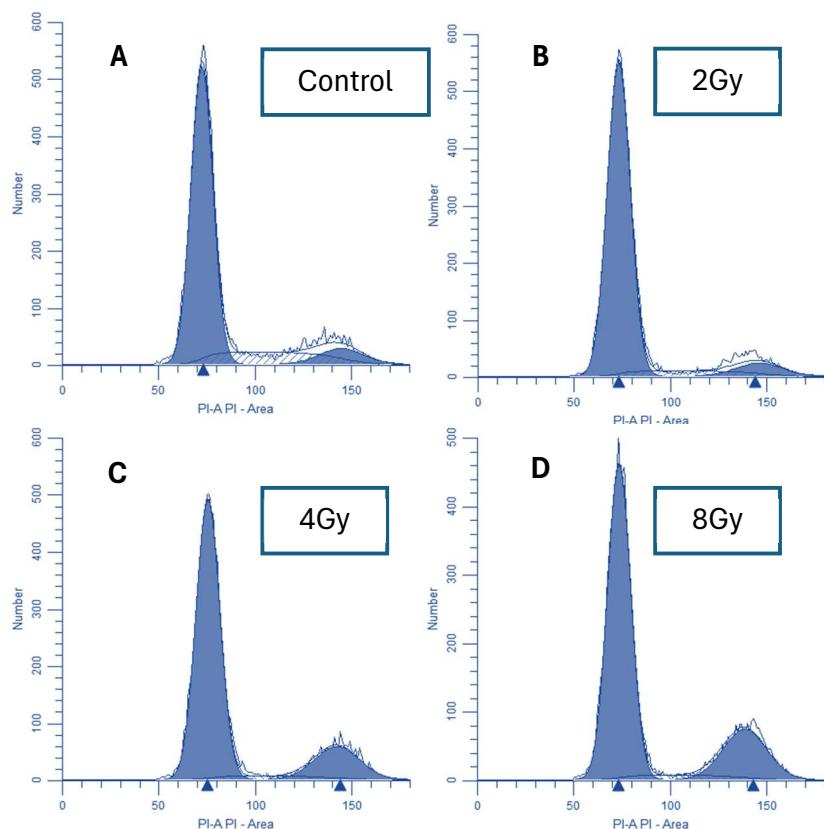
La *Figura 9* muestra los resultados del análisis de contenido de DNA en las células control y tratadas con diferentes dosis de radiación ionizante que permiten observar la proporción de células que se encuentran en cada fase del ciclo celular. En las *Figuras 9 A-D* se diferencian dos picos: El primero corresponde a las células que están en fase G0-G1 y tienen 1N de material genético; el segundo pico a las células en fase G2-M y tienen 2N de material genético; y entre ambos picos aparecen las células con una cantidad de material genético entre 1N y 2N que corresponden a las que están en fase S. Se pueden ver cambios entre las dosis, lo que significa que la radiación altera el ritmo normal del ciclo celular.

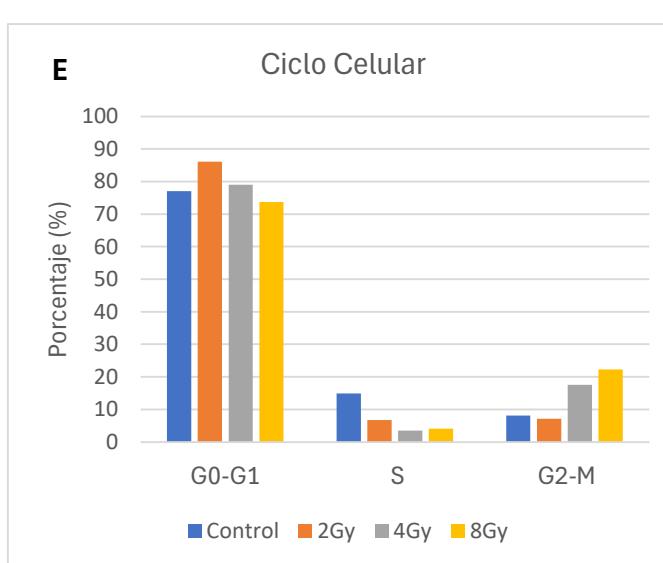
En el control se puede ver el comportamiento normal de las células, en que hay un grupo mayoritario de células sin dividir (G0-G1), un pequeño grupo en fase S con diferente cantidad de material genético según se avanza en esta fase y otro grupo de células con 2N (G2-M) a punto de sufrir mitosis y dividirse. Conforme las células se dividen, pasarían a estar de la fase G2-M a fase G0-G1. En las células irradiadas se pueden distinguir dos comportamientos diferentes:

En la condición de 2Gy hay un aumento de las células en fase G0-G1 (86,14% respecto a 77,06% en el control), mientras que las células en fase S y fase G2-M disminuyen con respecto al control (*Figura 9 E y Tabla 1*). Esto mismo ha sido observado por *Baselet et al.* en células endoteliales humanas de arteria coronaria inmortalizadas con telomerasa a las 24 horas post-irradiación (10).

En las condiciones de 4Gy y 8Gy se observa principalmente un aumento de las células en fase G2-M, de manera proporcional a la dosis de la radiación (*Figura 9 E*). En la dosis de 8Gy hay un 22,26% de células en fase G2/M, mientras que en el control hay 8,08% (*Tabla 1*). También se observa una reducción en el porcentaje de células en fase S con respecto al control. *Roumbouts et al.* confirmaron que, 24 horas post-irradiación, células endoteliales hibridas EA.hy926 y células endoteliales de cordón umbilical (HUVEC) tenían este mismo comportamiento irradiadas con 5Gy, una radiación intermedia entre las consideradas en este trabajo (19).

Estas diferencias observadas pueden ser debido a la rotura de la doble hebra de DNA causada por las especies reactivas de oxígeno que genera la radiación ionizante. Esta rotura del DNA provocaría el arresto celular en fase G0-G1, en el caso de la dosis de 2Gy, y en fase G2-M, en el caso de las dosis de 4Gy y 8Gy, para evitar que estas células dañadas continúen dividiéndose y causen mutaciones en la línea celular.





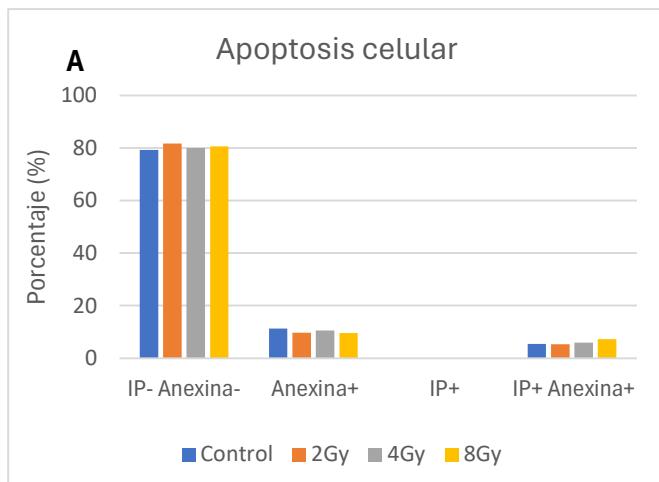
	Control	2Gy	4Gy	8Gy
% G0-G1	77,06	86,14	79,02	73,69
% S	14,86	6,72	3,45	4,05
% G2-M	8,08	7,15	17,53	22,26

Figura 9 y Tabla 1: Resultados del análisis del ciclo celular de células ECFCs procesado en Kaluza. A-D) Histogramas mostrando la intensidad de fluorescencia como Área-PI en las condiciones de radiación estudiadas: Control, 2Gy, 4Gy, 8Gy. En E) están representados los porcentajes de células de A-D que están en fase G0-G1, en fase S o en fase G2-M, estos datos aparecen en la tabla.

Los datos de estos experimentos confirman que las células ECFCs se comportan, respecto a su progresión en el ciclo celular, como células endoteliales cuando son irradiadas.

5.4 Análisis de la apoptosis celular por citometría:

En la *Figura 10* se puede analizar la apoptosis de las células ECFCs irradiadas con cantidad creciente de radiación ionizante. Podemos diferenciar cuatro grupos: células vivas (IP-Anexina-), células en apoptosis temprana (Anexina+), células en apoptosis tardía (IP+Anexina+) y células necróticas (IP+). Tras 24 horas, no se aprecian diferencias en la proporción de células apoptóticas entre las diferentes dosis de radiación aplicadas. *Roumbouts et al.* analizaron la apoptosis celular por citometría a las 24, 48 y 72 horas post-irradiación con 0,1, 0,5 y 5Gy en células EA.hy926 y HUVEC. En ambos tipos celulares encontraron un aumento significativo de células en apoptosis temprana a las 24 horas para 5Gy y en las células HUVEC también de células necróticas en este tiempo y para esta dosis (19). Sin embargo, *Chopra et al.* en un análisis de transcriptómica de células endoteliales humanas de aorta sometidas a 1, 2, 4, 8 y 10Gy solo detectaron la activación de la apoptosis a las 24 horas en dosis de radiación alta (10Gy) (20); por lo que podría ser que una dosis única de radiación de 2-8Gy no sea un tratamiento lo suficientemente agresivo como para ver muerte por apoptosis a las 24 horas. Sería necesaria la repetición del experimento para concluir si la radiación causa o no apoptosis en células ECFCs.



	Control	2Gy	4Gy	8Gy
% IP- Anexina-	79,29	81,68	79,98	80,55
% Anexina+	11,33	9,64	10,51	9,54
% IP+	0,04	0,02	0,05	0,03
% IP+ Anexina+	5,49	5,31	5,93	7,25

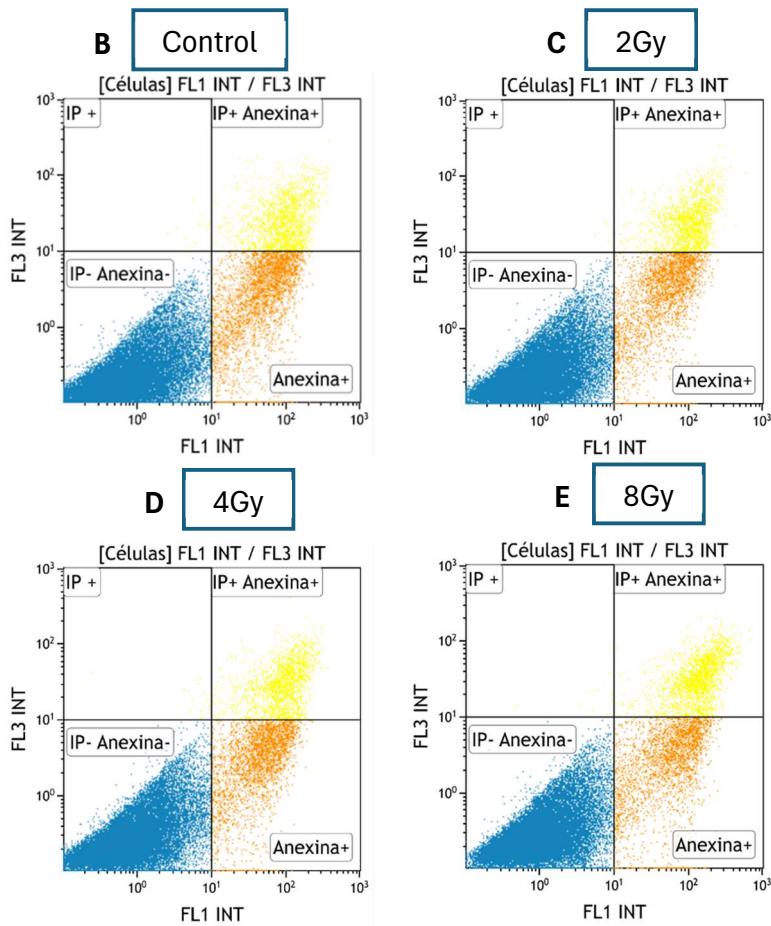
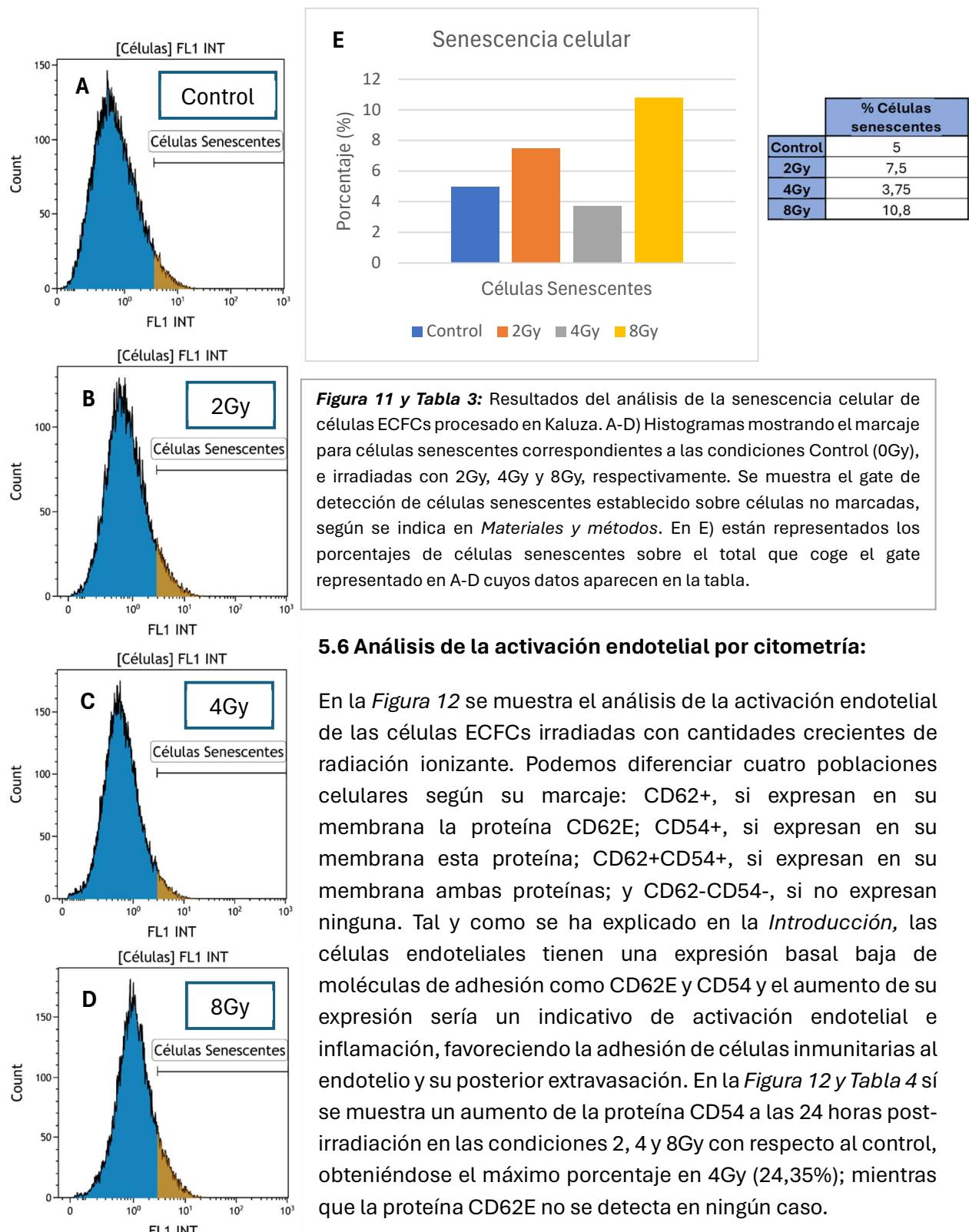


Figura 10 y Tabla 2: Resultados del análisis de la apoptosis celular de células ECFCs procesado en Kaluza. B-E) Dot plots mostrando la intensidad de fluorescencia de los canales FL3 (IP) y FL1 (Anexina V FITC) en las condiciones de irradiación estudiadas: Control, 2Gy, 4Gy y 8Gy. En A) están representados los porcentajes de células de B-E que dan IP-Anexina-, Anexina+, IP+ y IP+Anexina+ cuyos datos aparecen en la tabla.

5.5 Análisis de la senescencia celular por citometría:

En la Figura 11 se puede analizar la senescencia de las células ECFCs irradiadas con cantidad creciente de radiación ionizante. Tanto de manera cualitativa, fijándose en el gate naranja, como cuantitativa (Figura 11 E y Tabla 3) podemos ver que la proporción de células senescentes aumenta conforme aumenta la radiación, menos en la dosis de 4Gy en que el porcentaje de células senescentes es menor a la condición control (3,75%). Esto posiblemente se deba a un artefacto, ya que tendría sentido que esta condición fuese una intermedia entre las condiciones 2Gy (7,5%) y 8Gy (10,8%). Se tendría que repetir el ensayo en el futuro. De manera análoga a lo observado, Baselet *et al.* vieron un aumento de la senescencia de células endoteliales humanas de arteria coronaria inmortalizadas con telomerasa a las 24 horas después de ser irradiadas con 2Gy (10). Wang *et al.* también observaron un aumento en la senescencia de células endoteliales de la microvasculatura dérmica irradiadas con 4 y 8Gy a los 4 días post-irradiación, pero no irradiadas con 2Gy (21). La senescencia es un proceso muy relacionado con el arresto en el ciclo celular. Como ya se ha mencionado, las células senescentes son aquellas que pierden su capacidad de dividirse de manera irreversible. La senescencia causada por la radiación ionizante podría estar causada por daños en el DNA que causan el arresto en fase G0-G1 o G2-M. Por lo que, se podría pensar que, a mayor arresto en el ciclo celular, mayor porcentaje de células senescentes. Comparando los resultados del análisis del ciclo celular con los resultados del análisis de senescencia, se podría decir que la condición de 8Gy es la que mayor arresto celular y mayor senescencia presenta. La senescencia causada por la radiación ionizante se ha visto que

podría tener un papel muy importante en el desarrollo de enfermedades cardiovasculares, por lo que la similitud de los resultados entre células endoteliales y células ECFCs apoyaría el uso de las últimas como modelo del endotelio.

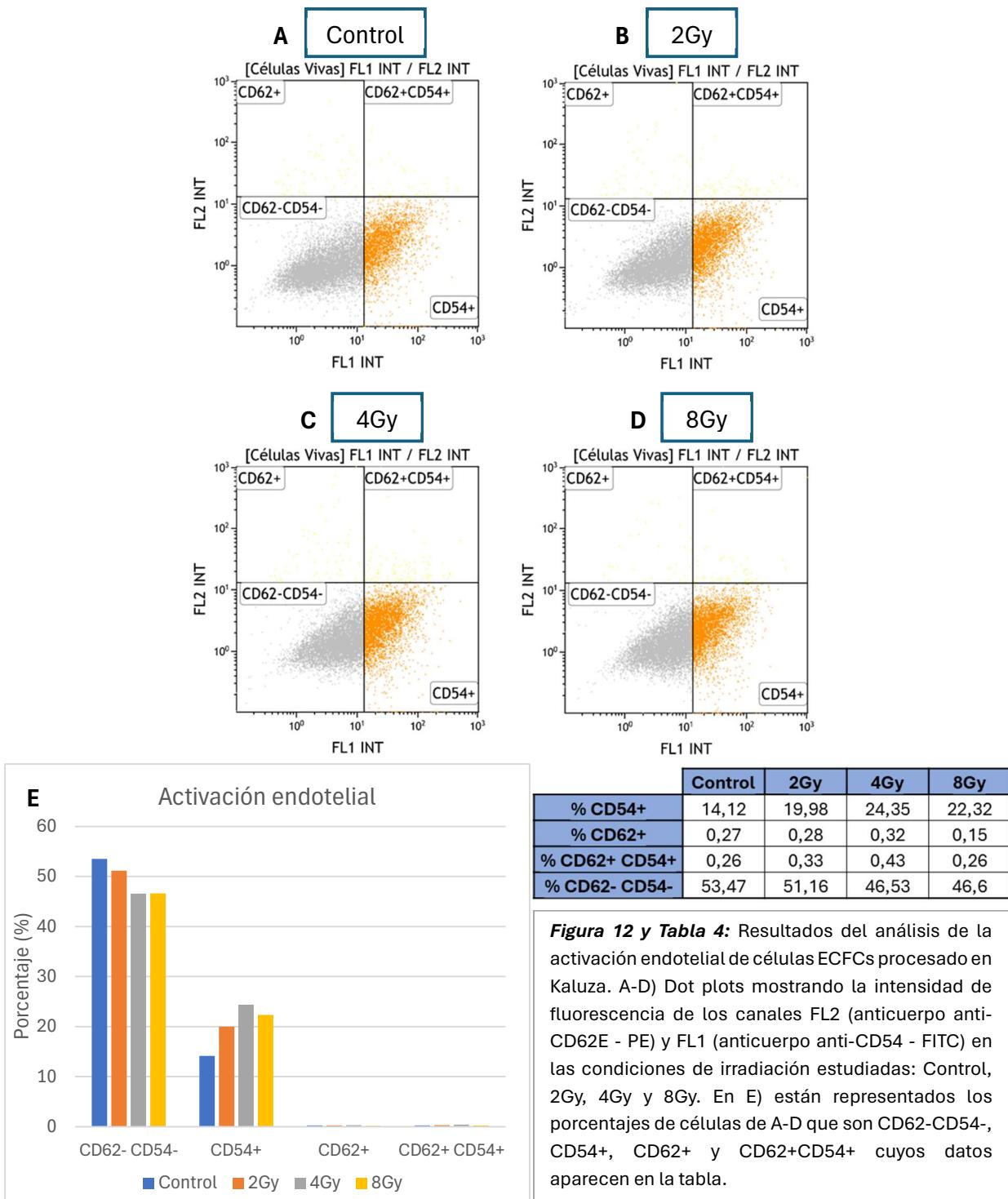


5.6 Análisis de la activación endotelial por citometría:

En la *Figura 12* se muestra el análisis de la activación endotelial de las células ECFCs irradiadas con cantidades crecientes de radiación ionizante. Podemos diferenciar cuatro poblaciones celulares según su marcaje: CD62+, si expresan en su membrana la proteína CD62E; CD54+, si expresan en su membrana esta proteína; CD62+CD54+, si expresan en su membrana ambas proteínas; y CD62-CD54-, si no expresan ninguna. Tal y como se ha explicado en la *Introducción*, las células endoteliales tienen una expresión basal baja de moléculas de adhesión como CD62E y CD54 y el aumento de su expresión sería un indicativo de activación endotelial e inflamación, favoreciendo la adhesión de células inmunitarias al endotelio y su posterior extravasación. En la *Figura 12* y *Tabla 4* sí se muestra un aumento de la proteína CD54 a las 24 horas post-irradiación en las condiciones 2, 4 y 8Gy con respecto al control, obteniéndose el máximo porcentaje en 4Gy (24,35%); mientras que la proteína CD62E no se detecta en ningún caso.

En otros estudios realizados por *Heckmann et al.* y *Walther et al.* en diferentes tipos de células endoteliales (células endoteliales humanas de microvasculatura dérmica y HUVEC,

respectivamente) se ha encontrado que sí hay un aumento de la presencia de CD54 24 horas post-irradiación con respecto a la condición control. Sin embargo, CD62E solo se ha encontrado presente 6 horas post-irradiación y a las 24 horas ya no se detecta (11,12). Estos experimentos se han hecho con diferentes dosis de radiación: 5 y 10Gy en un estudio (11) y 3, 5, 7, 9, 12 y 15Gy en el otro (12). Se podría pensar que el anticuerpo utilizado en el presente estudio podría estar degradado o funcionar mal, ya que no se detecta tampoco la presencia de CD62E en la condición control. Sin embargo, Heckmann *et al.* obtuvieron una baja o casi nula aparición de la proteína a 0Gy. Estos resultados concuerdan con lo observado en el presente estudio, por lo que también podrían considerarse un apoyo para el uso de las células ECFCs como modelo del endotelio.



5.7 Análisis de la expresión génica:

La *Figura 13* muestra los resultados del análisis de la expresión génica de las ECFCs irradiadas a las 24 y 48 horas cuantificados de manera relativa al control.

La enzima óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS), codificada por el gen NOS3, es la encargada de producir NO, un vasodilatador muy importante para el endotelio. El gen NOS3 se ha visto que disminuye en 1/3 de su expresión en las dosis de 4 y 8Gy a las 24 horas, pero no se observa cambio aparente en la dosis de 2Gy con respecto al control (*Figura 13 A*). Por otro lado, a las 48 horas (*Figura 13 B*), el mRNA de NOS3 se reduce en todas las dosis al menos a 1/4 con respecto al control y, en el caso de 8Gy, hay una reducción masiva, aproximadamente a 1/100. En la literatura se describe que esta proteína aumenta su expresión a las 24 horas post irradiación en células endoteliales. Sonveaux *et al.* obtuvieron una duplicación de la expresión de esta proteína en células endoteliales 24 horas después de ser irradiadas con 6Gy (22). Como ya es bien sabido, el nivel de mRNA y de proteína no tiene por qué correlacionarse. Sería de interés ver si en las ECFCs también se produce un aumento de la enzima eNOS pese a la reducción de su mRNA.

El VEGFA es un factor de crecimiento implicado en la vasculogénesis y angiogénesis. Se observa que este gen duplica su expresión con respecto al control en la dosis de 8Gy a las 24 horas (*Figura 13 C*), mientras que en el resto de dosis no se ha obtenido un cambio significativo. Sin embargo, a las 48 horas post-irradiación (*Figura 13 D*), este gen reduce su expresión en todas las dosis al menos a 1/2 de la del control. Nuevamente, se obtiene la mayor reducción en la dosis de 8Gy, cerca de 1/10. Habría que ver la correlación entre mRNA y proteína, pero el hecho de que se duplique la expresión de VEGFA en 8Gy a las 24 horas y no del resto podría explicar por qué los porcentajes de resazurina y cristal violeta de esta dosis a las 24 horas están por encima del resto de dosis en los ensayos de viabilidad y crecimiento realizados en este trabajo (*Figuras 7 y 8*).

El inhibidor de ciclina CDKN1A o p21 es una proteína implicada en la regulación del ciclo celular y el arresto en fase G2 por daño al DNA (23). Este gen se ha encontrado que, a las 24 horas, duplica su expresión en las dosis de 2 y 4Gy y se multiplica por 8 en la dosis 8Gy (*Figura 13 E*). Mientras que, a las 48 horas, la expresión en las dosis de 2 y 4Gy es igual al control y en la dosis de 8Gy disminuye de manera considerable con respecto a su expresión a las 24 horas (*Figura 13 F*).

También se ha medido la expresión del inhibidor de ciclina CDKN2A o p16, implicado en la fosforilación de la proteína retinoblastoma y de impedir la interacción de las ciclinas quinasas 4 y 6 con la ciclina D (24). Por tanto, tiene un papel en la regulación del ciclo celular en las fases G0/G1. A las 24 horas, se ha obtenido que la expresión del gen no cambia en las dosis de 2 y 4Gy, mientras que en la dosis de 8Gy se cuadriplica con respecto al control (*Figura 13 G*). Por otro lado, a las 48 horas se observa un pequeño aumento de la expresión en 4Gy, aproximadamente 1'5, y nuevamente un descenso considerable de la expresión en 8Gy (*Figura 13 H*).

Viendo estos resultados, podríamos proponer que la radiación ionizante provoca el arresto celular a corto plazo y que la dosis que más afecta a las ECFCs es la de 8Gy. Sin embargo, habría que estudiar la correlación con el nivel de proteína. Wang *et al.* estudiaron el efecto que las dosis de irradiación 0, 2, 4 y 8Gy tenían sobre las proteínas p21 y p16 en células endoteliales de la microvasculatura dérmica. A las 96 horas (4 días) solo observaron un cambio significativo en la expresión de la proteína p21 a 8Gy, que aumentaba con respecto al control. Sin embargo, no se obtuvo diferencia en el resto de las dosis ni en la expresión de la proteína p16 (21).

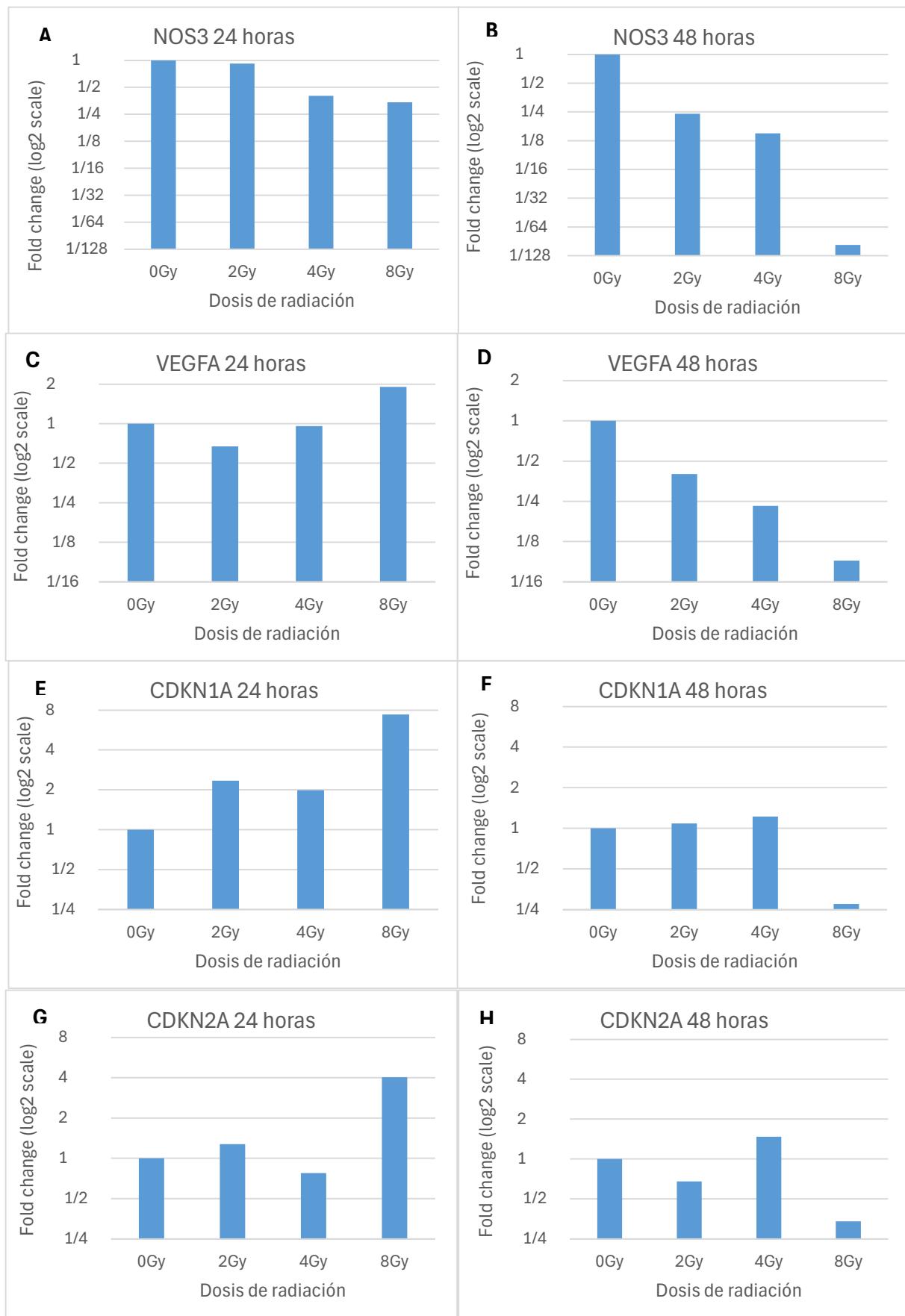


Figura 13: Resultados del análisis de la expresión génica de ECFCs irradiadas (0, 2, 4 y 8Gy) a las 24 horas (A,C,E,G) y 48 horas (B,D,F,H) representados como el Fold change en escala logarítmica en base 2. Los genes analizados son: A-B) NOS3, C-D) VEGFA, E-F) CDKN1A y G-H) CDKN2A. El gen de referencia utilizado es el GAPDH y se cuantifica de manera relativa al control.

6. CONCLUSIONES/CONCLUSIONS:

La radiación ionizante en los rangos de energía empleados en este trabajo, que son los utilizados para el tratamiento de pacientes, promueve los siguientes efectos en las ECFCs in vitro:

- Disminución del crecimiento celular a las 72 horas a las diferentes dosis estudiadas.
- Citotoxicidad a partir de las 24 horas, pese a no observarse un aumento de apoptosis, y también parece producirse un incremento del metabolismo celular.
- Alteración del ritmo normal del ciclo celular, observándose un arresto celular en fase G0-G1 para la dosis de 2Gy y en fase G2-M para las dosis de 4 y 8Gy.
- Incremento de la proporción de células con fenotipo senescente tras las 24 horas, que es proporcional a la dosis irradiada.
- Aumento de la expresión de la proteína CD54 (ICAM-1) a las 24 horas post-irradiación, que es una molécula de adhesión relacionada con la activación endotelial.
- Modificación de los patrones de expresión génica de genes clave en la función de las células endoteliales y la aparición de un fenotipo senescente que dependen de la dosis de radiación aplicada y del tiempo de análisis tras la irradiación.

Los resultados coinciden parcialmente con lo encontrado en la literatura sobre diferentes tipos de células endoteliales. Sin embargo, sería necesario llevar a cabo más replicas biológicas para confirmar las observaciones realizadas. Por todo ello, se puede considerar que las células progenitoras endoteliales tipo ECFC podrían ser útiles para la generación de modelos de estudio de los efectos de la radiación ionizante aplicada en rangos terapéuticos sobre el endotelio sano.

Ionizing radiation in the energy ranges used in this work, which are the same applied in patients, promotes the following effects on ECFCs:

- Reduction in cellular growth 72 hours post-irradiation in the doses under study.
- Citotoxicity starting at 24 hours, although no increase in apoptosis is observed, there appears to be an increase in cellular metabolism.
- Disruption in the cell cycle rhythm: Cellular arrest in G0-G1 phase after 2Gy irradiation and in G2-M after 4 and 8Gy irradiation.
- Increase in the amount of cells with a senescent phenotype after 24 hours in proportion to the irradiation dose.
- Rise in the expression of the protein CD54 (ICAM-1) 24 hours post-irradiation. This protein is a molecular adhesión molecule related to endothelial activation.
- Modification of the gene expression pattern of genes important in the normal function of endothelial cells and appearance of a senescent phenotype that are dependent on irradiation dose and time of analysis after irradiation.

The results partially agree with those found on the literature about different types of endothelial cells. Nevertheless, more biological replicas are needed to confirm the observations. Therefore, the ECFC-type endothelial progenitor cells can be considered usable in the generation of a model to study the effects of ionizing radiation applied in the therapeutic ranges on the healthy endothelium.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Cómo se usa la radioterapia para tratar el cáncer | Asociación americana contra el cáncer [Internet]. [citado 4 de marzo de 2024]. Disponible en: <https://www.cancer.org/es/cancer/como-sobrellevar-el-cancer/tipos-de-tratamiento/radioterapia/conceptos-basicos.html>
2. Weintraub NL, Jones WK, Manka D. Understanding Radiation-Induced Vascular Disease. *J Am Coll Cardiol.* 23 de marzo de 2010;55(12):1237-9. doi: 10.1016/j.jacc.2009.11.053
3. Venkatesulu BP, Mahadevan LS, Aliru ML, Yang X, Bodd MH, Singh PK, et al. Radiation-Induced Endothelial Vascular Injury: A Review of Possible Mechanisms. *JACC Basic Transl Sci.* 1 de agosto de 2018;3(4):563-72. doi: 10.1016/j.jacbts.2018.01.014
4. Ricard N, Bailly S, Guignabert C, Simons M. The quiescent endothelium: signalling pathways regulating organ-specific endothelial normalcy. *Nat Rev Cardiol.* 12 de agosto de 2021;18(8):565-80. doi: 10.1038/s41569-021-00517-4
5. Halle M, Gabrielsen A, Paulsson-Berne G, Gahm C, Agardh HE, Farnebo F, et al. Sustained Inflammation Due to Nuclear Factor-Kappa B Activation in Irradiated Human Arteries. *J Am Coll Cardiol.* 23 de marzo de 2010;55(12):1227-36. doi: 10.1016/j.jacc.2009.10.047
6. Zhao W, Robbins MEC. Inflammation and Chronic Oxidative Stress in Radiation-Induced Late Normal Tissue Injury: Therapeutic Implications. *Curr Med Chem.* 2009;16(2):130-43. doi: 10.2174/092986709787002790
7. Baselet B, Sonveaux P, Baatout S, Aerts A. Pathological effects of ionizing radiation: endothelial activation and dysfunction. *Cell Mol Life Sci.* 28 de febrero de 2019;76(4):699-728. doi: 10.1007/s00018-018-2956-z
8. Wijerathne H, Langston JC, Yang Q, Sun S, Miyamoto C, Kilpatrick LE, et al. Mechanisms of radiation-induced endothelium damage: Emerging models and technologies. *Radiother Oncol.* 1 de mayo de 2021;158:21-32. doi: 10.1016/j.radonc.2021.02.007
9. Ait-Aissa K, Koval OM, Lindsey NR, Grumbach IM. Mitochondrial Ca²⁺Uptake Drives Endothelial Injury By Radiation Therapy. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1 de septiembre de 2022;42(9):1121-36. doi: 10.1161/ATVBAHA.122.317869
10. Baselet B, Belmans N, Coninx E, Lowe D, Janssen A, Michaux A, et al. Functional gene analysis reveals cell cycle changes and inflammation in endothelial cells irradiated with a single X-ray dose. *Front Pharmacol.* 25 de abril de 2017; 8:213. doi: 10.3389/fphar.2017.00213
11. Heckmann M, Douwes K, Peter R, Degitz K. Vascular Activation of Adhesion Molecule mRNA and Cell Surface Expression by Ionizing Radiation. *Exp Cell Res.* 10 de enero de 1998;238(1):148-54. doi: 10.1006/excr.1997.3826
12. Walther M, Kaffenberger W, Van Beuningen D. Influence of clinically used antioxidants on radiation-induced expression of intercellular cell adhesion molecule-1 on HUVEC. *Int j Radiat Biol.* octubre de 1999;75(10):1317-25. doi: 10.1080/095530099139485
13. Melero-Martin JM. Human Endothelial Colony-Forming Cells. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 1 de diciembre de 2022;12(12):a041154. doi: 10.1101/csphperspect.a041154
14. Ingram DA, Mead LE, Tanaka H, Meade V, Fenoglio A, Mortell K, et al. Identification of a novel hierarchy of endothelial progenitor cells using human peripheral and umbilical cord blood. *Blood.* 1 de noviembre de 2004;104(9):2752-60. doi: 10.1182/blood-2004-04-1396
15. EGM-2MV Microvascular Endothelial Cell Growth Medium-2 | Lonza [Internet]. [citado 8 de abril de 2024]. Disponible en: https://bioscience.lonza.com/lonza_bs/ES/en/Primary-and-

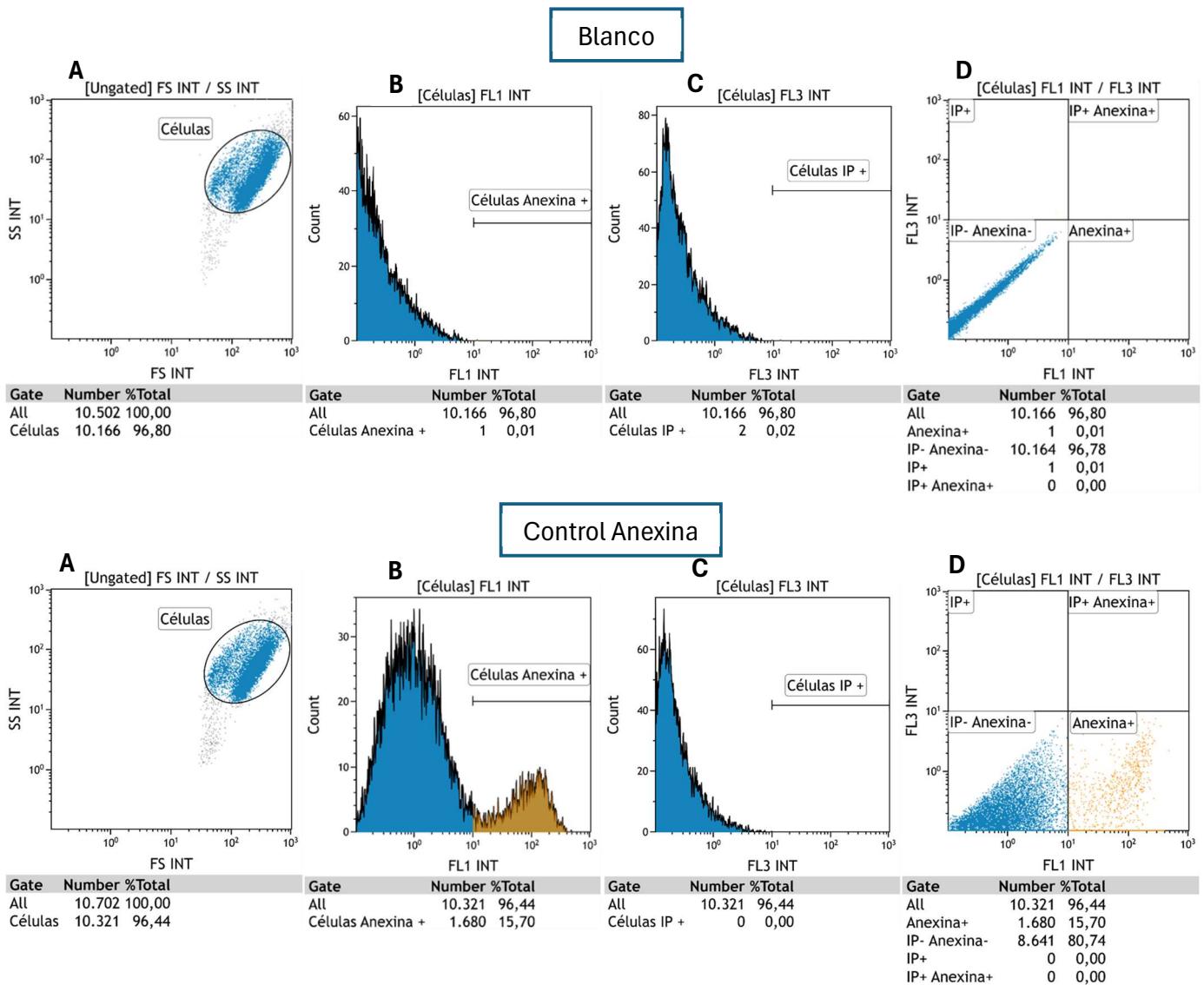
Stem-Cells/p/000000000000185321/EGM--2-MV-Microvascular-Endothelial-Cell-Growth-Medium-2-BulletKit

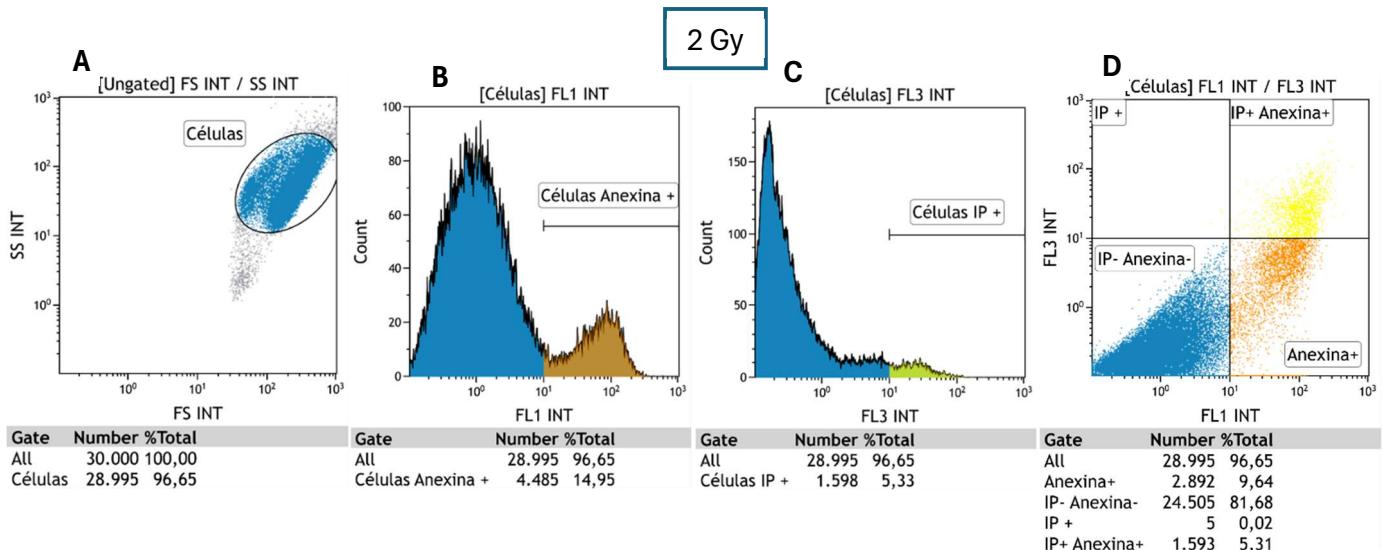
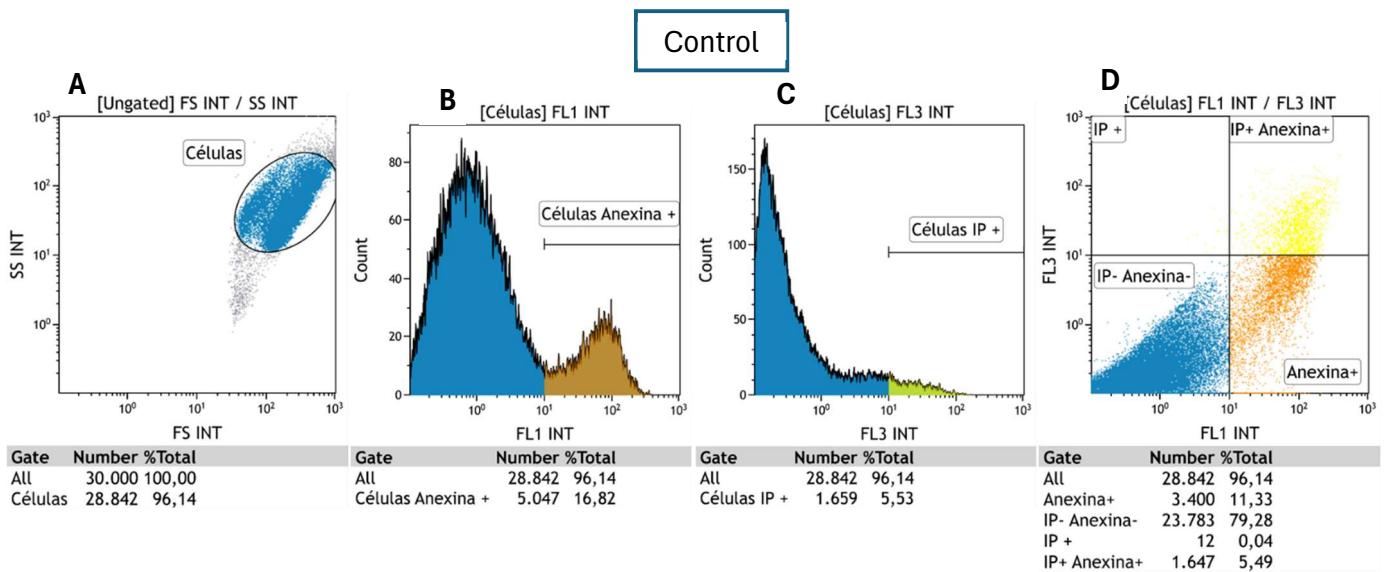
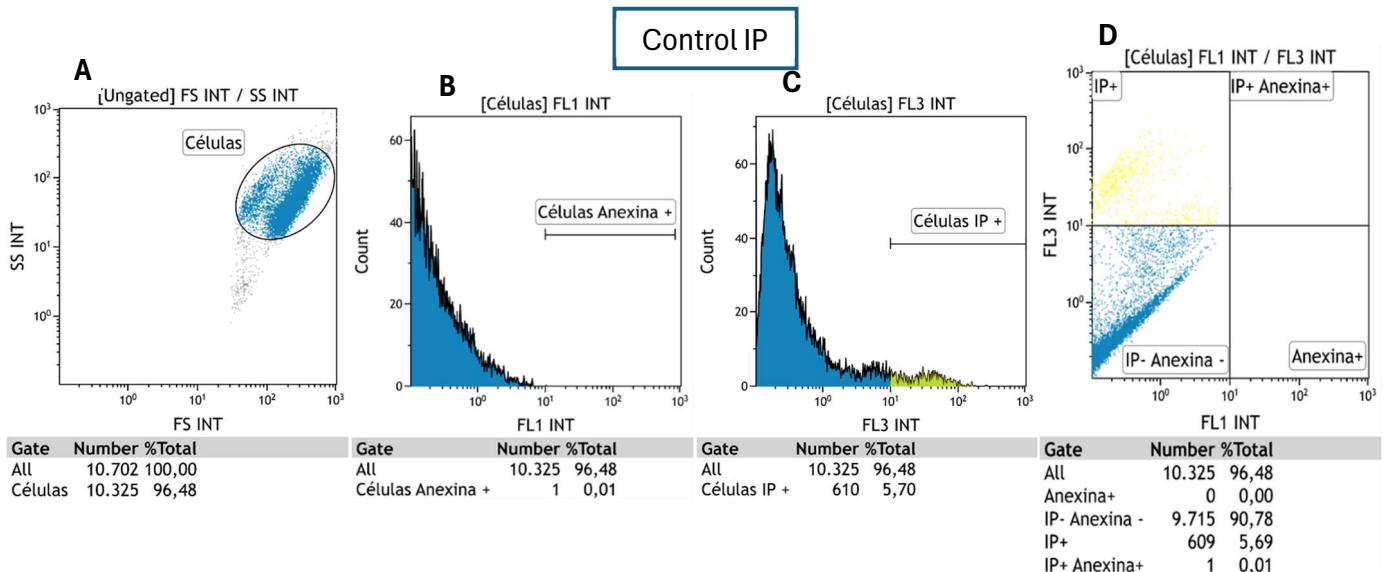
16. jamovi - open statistical software for the desktop and cloud [Internet]. [citado 3 de junio de 2024]. Disponible en: <https://www.jamovi.org/>
17. Darzynkiewicz Z, Huang X, Zhao H. Analysis of Cellular DNA Content by Flow Cytometry. *Curr Protoc Cytom.* 1 de octubre de 2017;82(1):7.5.1-24. doi: 10.1002/cpcy.28
18. Kinev A V., Levering V, Young K, Ali-Osman F, Truskey GA, Dewhirst MW, et al. Endothelial colony forming cells (ECFCs) as a model for studying effects of low-dose ionizing radiation: Growth inhibition by a single dose. *Cancer Invest.* junio de 2013;31(5):359-64. doi: 10.3109/07357907.2013.789903
19. Rombouts C, Aerts A, Beck M, De Vos WH, Van Oostveldt P, Benotmane MA, et al. Differential response to acute low dose radiation in primary and immortalized endothelial cells. *Int J Radiat Biol.* octubre de 2013;89(10):841-50. doi: 10.3109/09553002.2013.806831
20. Chopra S, Shankavaram U, Bylicky M, Dalo J, Scott K, Aryankalayil MJ, et al. Profiling mRNA, miRNA and lncRNA expression changes in endothelial cells in response to increasing doses of ionizing radiation. *Sci Rep.* 1 de diciembre de 2022;12(1):19941. doi: 10.1038/s41598-022-24051-6
21. Wang L, Rivas R, Wilson A, Park YM, Walls S, Yu T, et al. Dose-Dependent Effects of Radiation on Mitochondrial Morphology and Clonogenic Cell Survival in Human Microvascular Endothelial Cells. *Cells.* 23 de diciembre de 2023;13(1):39. doi: 10.3390/cells13010039.
22. Sonveaux P, Dessy C, Brouet A, Jordan BF, Grégoire V, Gallez B, et al. Modulation of the tumor vasculature functionality by ionizing radiation accounts for tumor radiosensitization and promotes gene delivery. *FASEB J.* 18 de octubre 2002;16(14):1979-81. doi: 10.1096/fj.02-0487fje.
23. CDKN1A - Cyclin-dependent kinase inhibitor 1 - Homo sapiens (Human) | UniProtKB | UniProt [Internet]. [citado 7 de junio de 2024]. Disponible en: <https://www.uniprot.org/uniprotkb/P38936/entry>
24. CDKN2A - Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A - Homo sapiens (Human) | UniProtKB | UniProt [Internet]. [citado 7 de junio de 2024]. Disponible en: <https://www.uniprot.org/uniprotkb/P42771/entry>

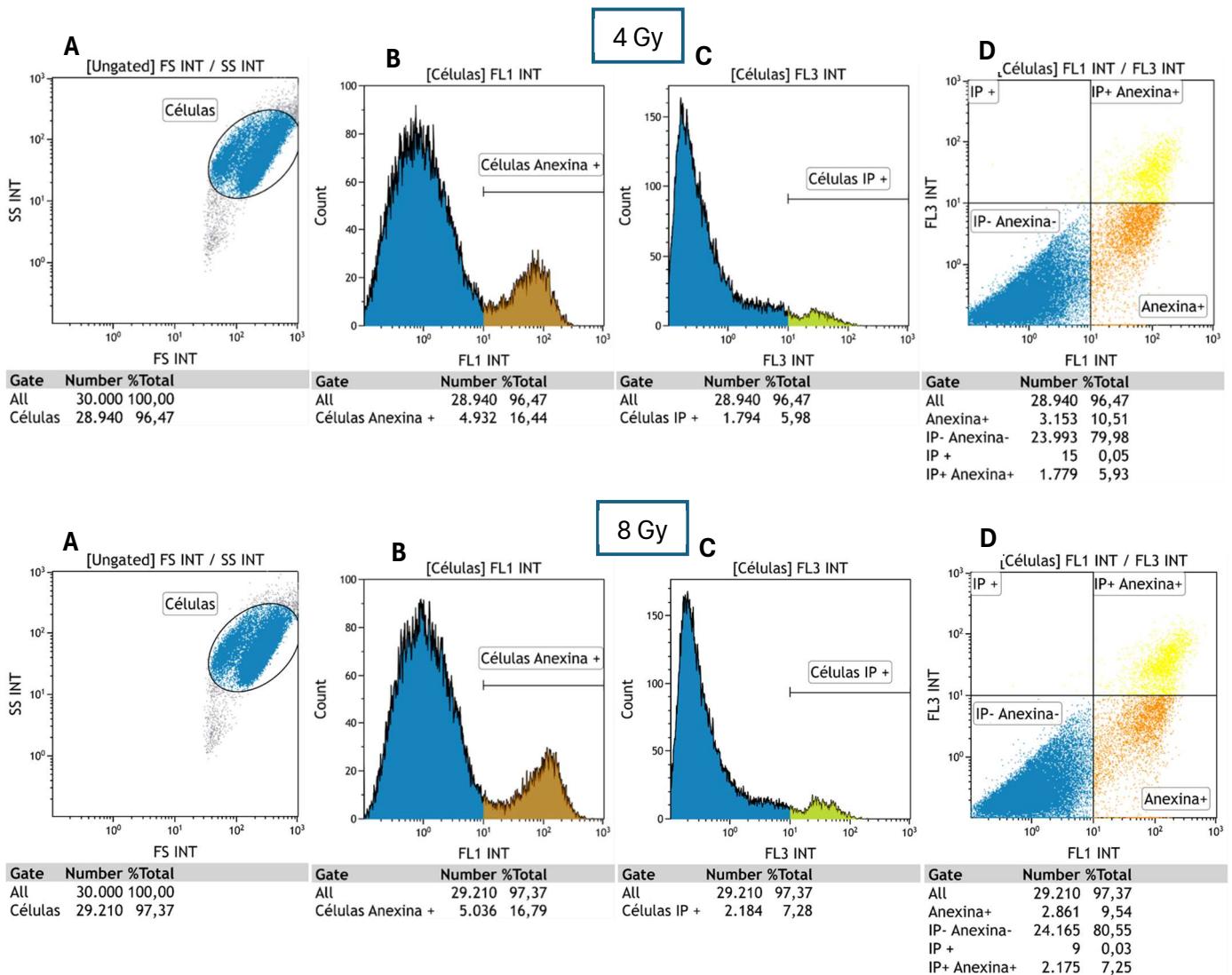
8. ANEXOS

8.1 Anexo i:

Resultados del análisis de la apoptosis celular en ECFCs procesado en Kaluza. En el cuadro azul se indica a qué muestra pertenecen las figuras: blanco, control anexina, control IP, control, 2Gy, 4Gy y 8Gy. Tal y como se ha explicado en *Materiales y métodos*, el procesamiento de los datos de apoptosis celular empieza haciendo una representación bidimensional (A) mostrando tamaño/complejidad (FSC/SSC) de los eventos adquiridos, de los que se selecciona mediante un gate oval los que corresponderían morfológicamente a células. A continuación, se visualizan los eventos seleccionados en histogramas mostrando la intensidad de fluorescencia en los canales FL1 (B, para Anexina V-FITC) y FL3 (C, para IP). En este paso se analizan las células marcadas con estos controles y se establecen umbrales de lo que se consideran células marcadas y no marcadas, así como se calcula la compensación de fluorescencia que habrá que aplicar al doble marcaje. Por último, se visualizan el resto de las muestras en una representación bidimensional (dot plot) mostrando la fluorescencia de los canales FL1 y FL3 y se aplican los umbrales para marcas determinados en los controles (D).

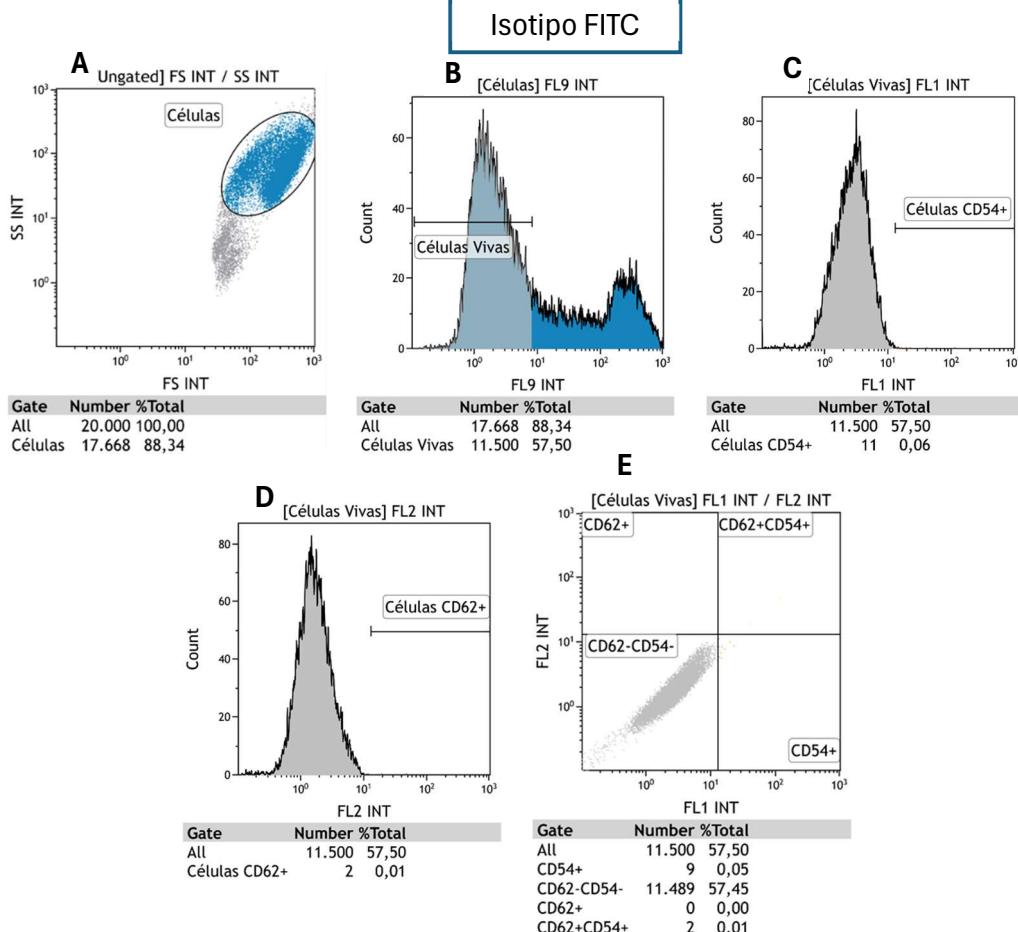
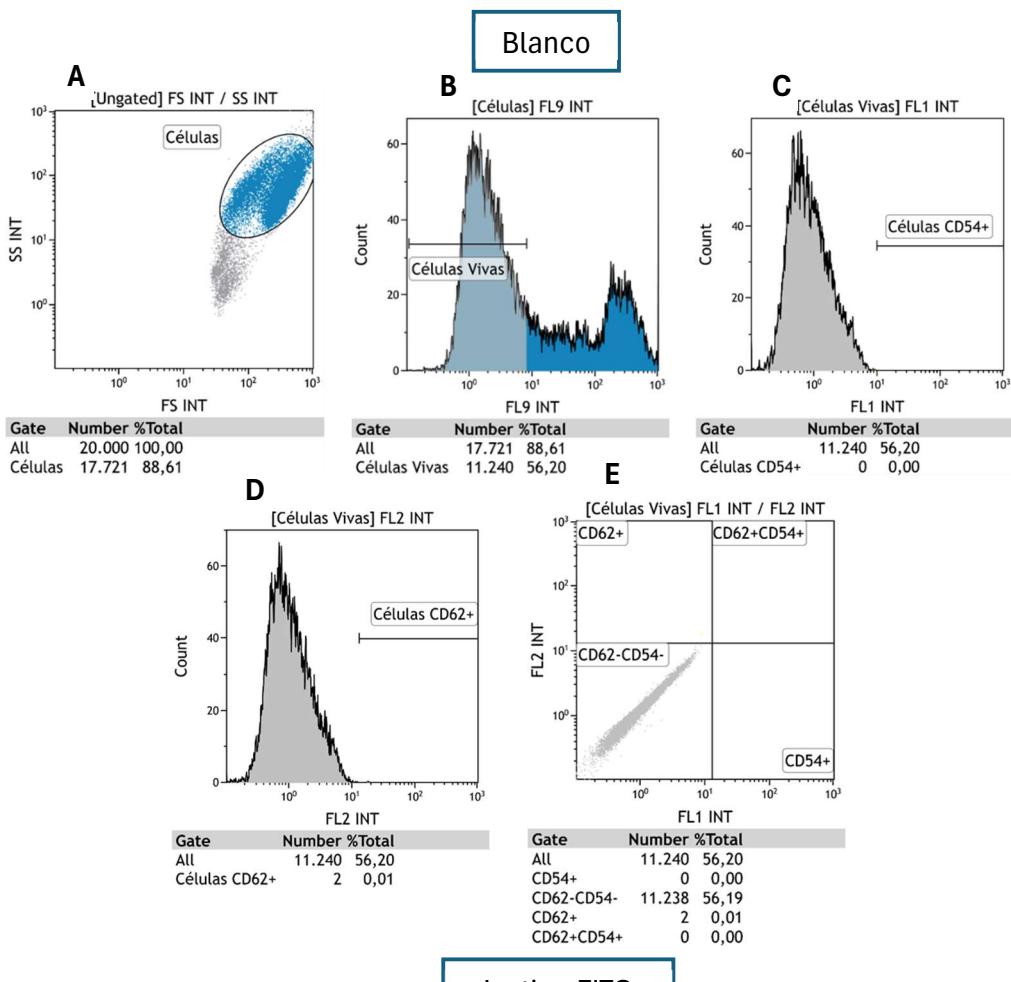




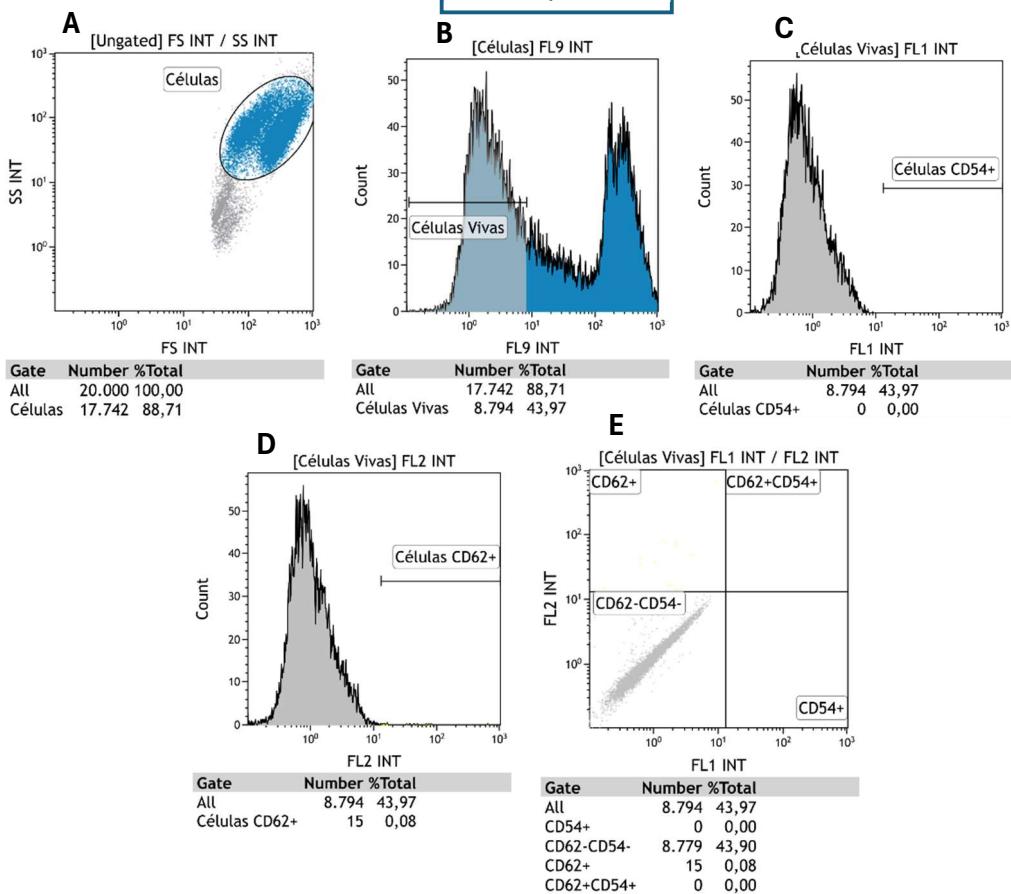


8.2 Anexo ii:

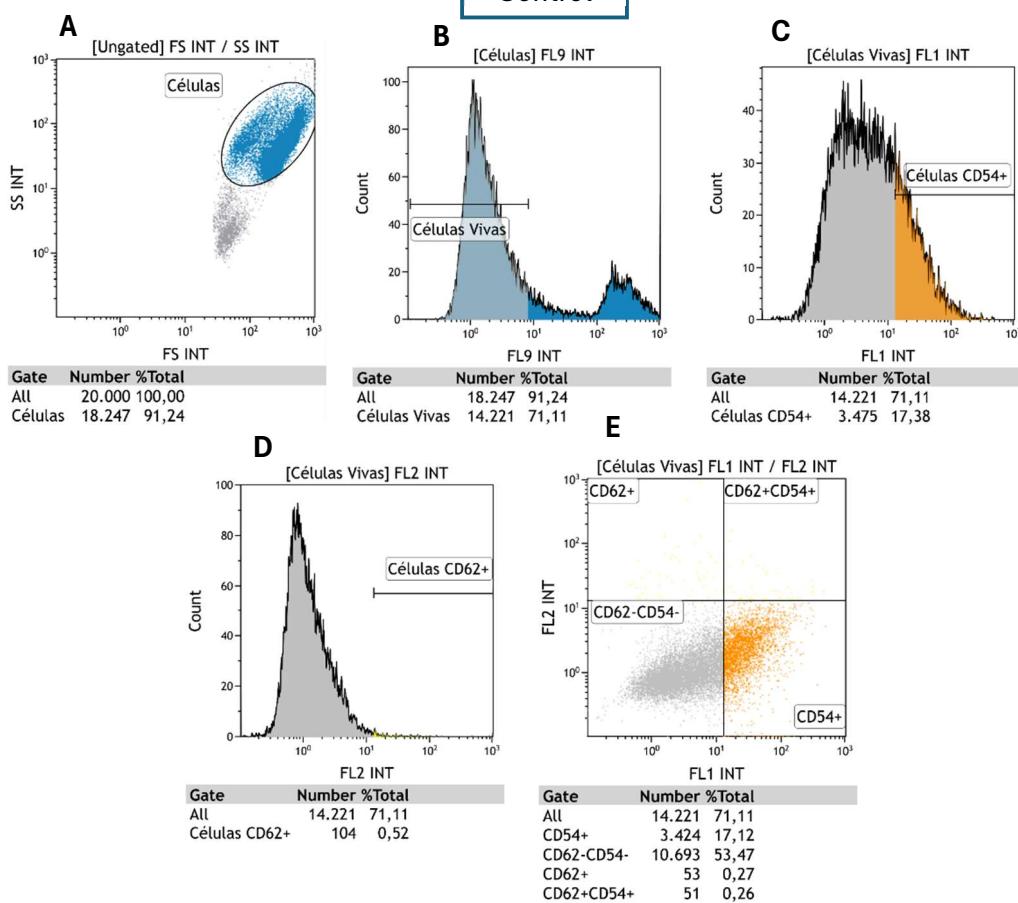
Resultados del análisis de la activación endotelial en ECFCs procesado en Kaluza. En el cuadro azul se indica a qué muestra pertenecen las figuras: blanco, control isotipo FITC, control isotipo PE, control, 2Gy, 4Gy y 8Gy. Tal y como se ha explicado en *Materiales y métodos*, el procesamiento de los datos de activación endotelial empieza haciendo una representación bidimensional (A) mostrando tamaño/complejidad (FSC/SSC) de los eventos adquiridos, de los que se selecciona mediante un gate oval los que corresponderían morfológicamente a células. A continuación, se visualizan los eventos seleccionados en un histograma mostrando la fluorescencia en el canal FL9 (B), lo que nos permite descartar las células muertas y centrar los análisis en las células vivas. Posteriormente, se visualizan las células vivas en histogramas mostrando la intensidad de fluorescencia en los canales FL1 (C, para el anticuerpo anti-CD54 conjugado a FITC) y FL2 (D, para el anticuerpo anti-CD62E conjugado con PE). En este paso se analizan las células marcadas con los controles de isotipo y se establecen umbrales de lo que se consideran células marcadas y no marcadas, así como se calcula la compensación de fluorescencia que habrá que aplicar al doble marcaje. Por último, sobre las células con doble marcaje se aplican los umbrales para marcas positivos determinados con los controles y se hace una representación bidimensional que permitirá determinar la proporción de células con cada marcaje (E).

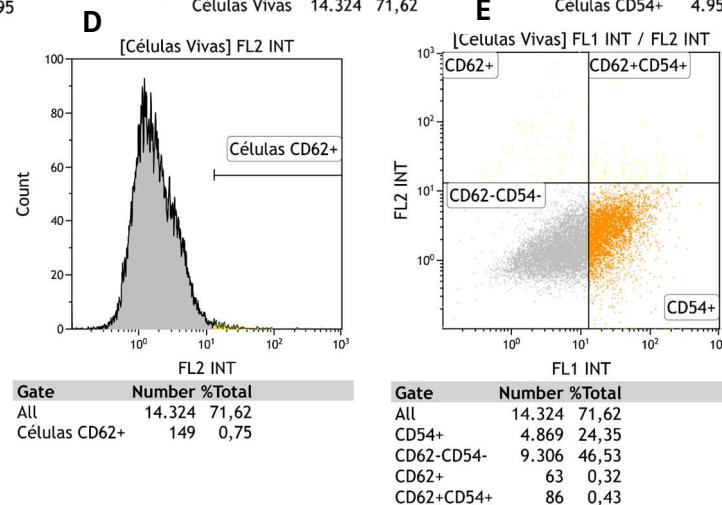
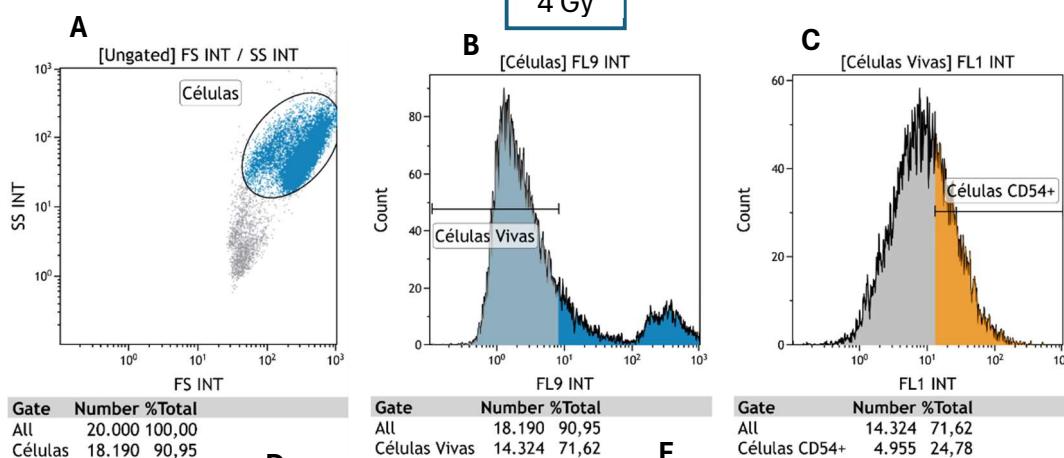
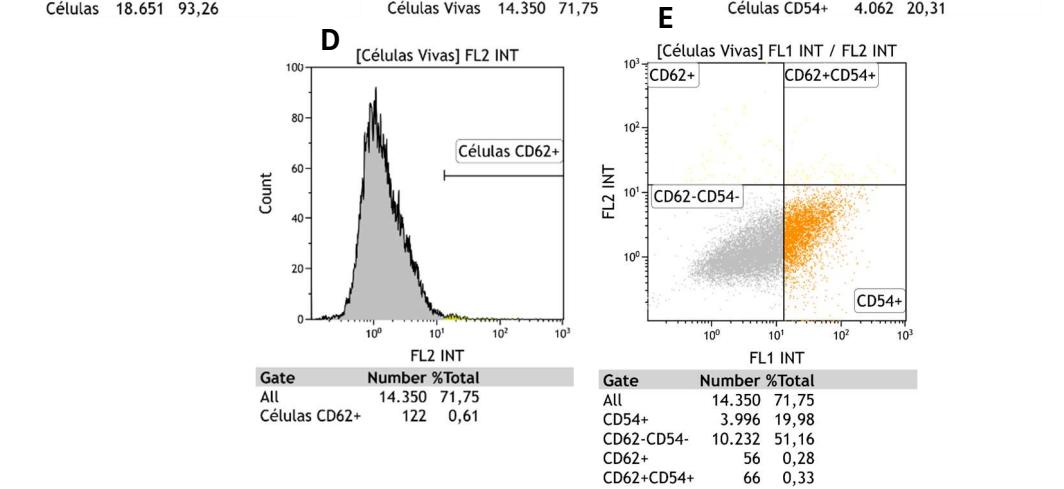
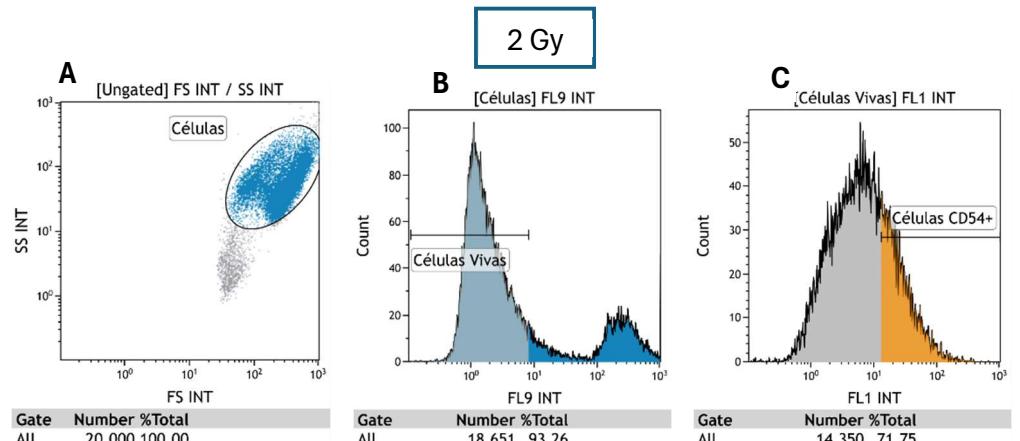


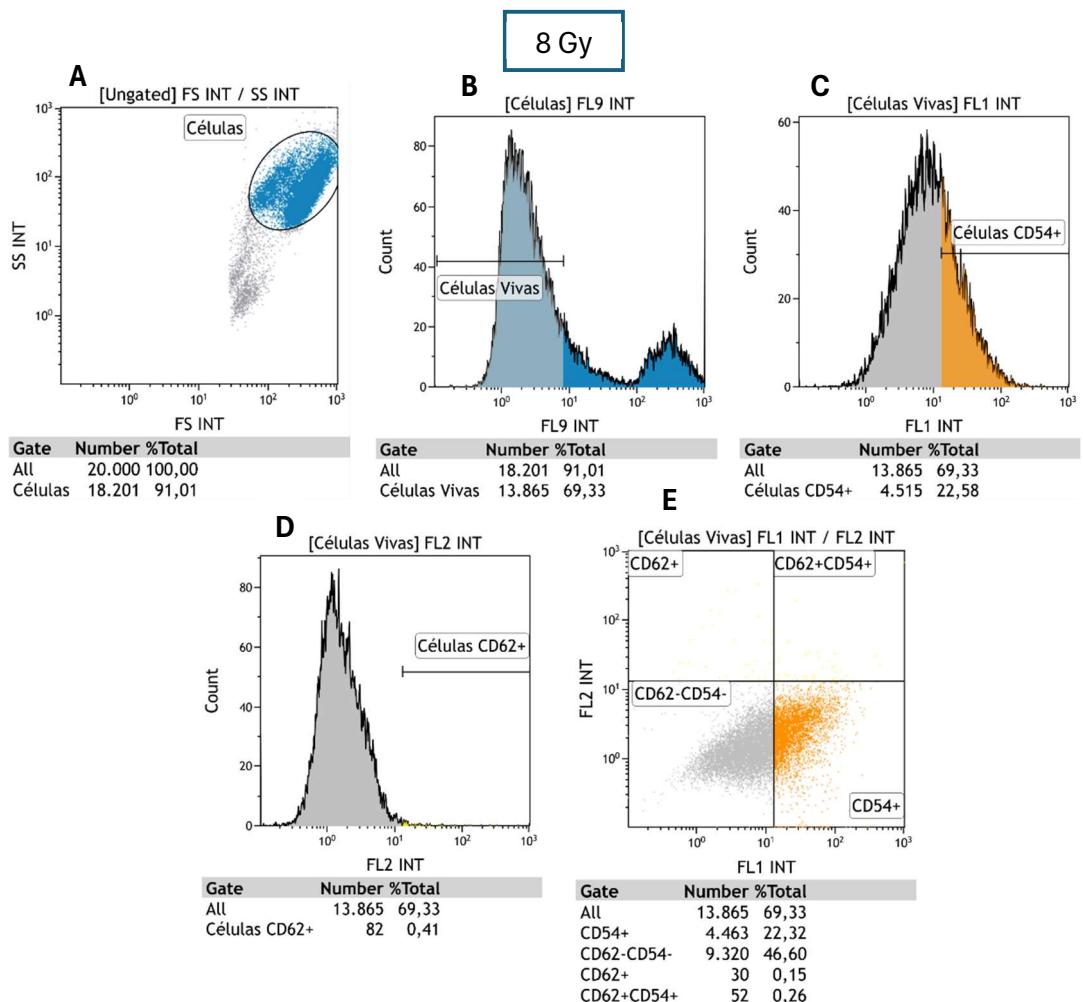
Isotipo PE



Control







8.3 Anexo iii:

Los primers directo y reverso para cada gen medido en la qPCR se compraron en Sigma y su secuencia es la siguiente:

- Gen GAPDH: Primer directo: 5'- CAA TGA ATA CGG CTA CAG CAA-3'; primer reverso: 5'- AGG GAG ATG CTC AGT GTT GG-3'.
- Gen NOS3: Primer directo: 5'- GTG GCT GGT ACA TGA GCA CT-3'; primer reverso: 5'- GTG GTC CAC GAT GGT GAC TT -3'.
- Gen VEGFA: Primer directo: 5'- GGA GGG CAG AAT CAT CAC GAA G -3'; primer reverso: 5'- CAC ACA GGA TGG CTT GAA GAT G -3'
- Gen CDKN1A: Primer directo: 5'- TAC CCT TGT GCC TCG CTC AG -3'; primer reverso: 5'- CGG CGT TTG GAG TGG TAG A -3'.
- Gen CDKN2A: Primer directo: 5'- GTG GAC CTG GCT GAG GAG -3'; primer reverso: 5'- CTT TCA ATC GGG GAT GTC TG -3'.

8.4 Anexo iv:

Tablas con los datos numéricos resultantes de los ensayos de crecimiento de las células ECFCs con cristal violeta. Se pueden ver los tiempos del ensayo en horas, los resultados del experimento expresados como absorbancia normalizada a la media común de todas las condiciones en el tiempo cero (representa el 100%) y los errores estándar de cada medida. En orden de arriba a abajo las tablas corresponden a los datos de las réplicas biológicas del experimento con 25.000 cel/pocillo iniciales, 15.000 cel/pocillo iniciales y 5.000 cel/pocillo iniciales.

Tiempo (horas)	Control	Error estándar	2 Gy	Error estándar	4 Gy	Error estándar	8 Gy	Error estándar
0	100,0	3,8	100,0	2,5	100,0	2,0	100,0	2,3
24	165,4	5,1	178,1	5,9	134,8	3,2	156,0	4,5
48	229,4	5,3	224,9	7,2	163,2	2,9	176,5	6,0
72	219,7	3,3	227,3	4,0	147,2	2,7	193,5	5,0

Tiempo (horas)	Control	Error estándar	2 Gy	Error estándar	4 Gy	Error estándar	8 Gy	Error estándar
0	100,0	3,4	100,0	2,6	100,0	2,8	100,0	2,3
24	145,2	3,2	138,2	1,9	150,8	4,8	158,3	2,0
48	163,2	3,5	155,4	3,1	155,8	4,6	158,7	2,8
72	161,6	3,8	135,9	1,3	148,1	2,1	124,5	3,2

Tiempo (horas)	Control	Error estándar	2 Gy	Error estándar	4 Gy	Error estándar	8 Gy	Error estándar
0	100,0	2,0	100,0	1,2	100,0	2,1	100,0	2,8
24	101,8	2,9	127,0	5,6	122,8	3,6	136,5	3,9
48	133,3	2,6	141,3	1,6	165,5	4,1	148,0	5,3
72	160,5	4,3	171,2	2,1	182,4	4,1	162,6	2,9

8.5 Anexo v:

Tablas con los datos numéricos resultantes de los ensayos de crecimiento de las células ECFCs con resazurina. Se pueden ver los tiempos del ensayo en horas, los resultados del experimento expresados como fluorescencia normalizada a la media común de todas las condiciones en el tiempo cero (representa el 100%) y los errores estándar de cada medida. En orden de arriba a abajo las tablas corresponden a los datos de las réplicas biológicas del experimento con 25.000 cel/pocillo iniciales, 15.000 cel/pocillo iniciales y 5.000 cel/pocillo iniciales.

Tiempo (horas)	Control	Error estándar	2 Gy	Error estándar	4 Gy	Error estándar	8 Gy	Error estándar
0	100,0	8,1	100,0	1,3	100,0	1,0	100,0	1,2
24	178,7	13,5	165,2	2,1	165,2	2,1	167,7	3,8
48	213,0	12,5	187,8	2,8	184,9	3,0	177,7	3,0
72	240,1	3,1	223,6	3,0	214,8	3,0	227,7	3,6

Tiempo (horas)	Control	Error estándar	2 Gy	Error estándar	4 Gy	Error estándar	8 Gy	Error estándar
0	100,0	0,9	100,0	1,4	100,0	4,0	100,0	1,4
24	172,3	4,7	170,5	4,5	174,6	2,7	179,7	3,4
48	197,1	4,9	188,1	3,2	194,9	2,8	196,0	2,4
72	234,7	6,1	217,8	4,0	204,3	5,4	209,0	5,9

Tiempo (horas)	Control	Error estándar	2 Gy	Error estándar	4 Gy	Error estándar	8 Gy	Error estándar
0	100,0	1,9	100,0	1,6	100,0	0,7	100,0	1,7
24	192,3	3,8	196,5	2,0	200,2	4,3	203,1	4,9
48	277,3	3,4	250,6	2,2	263,0	3,7	256,8	6,1
72	301,6	3,8	247,7	3,1	260,2	4,6	255,2	4,2