

Javier Lozano Gerona

# Efecto de la Hipoxia sobre las Células Progenitoras Endoteliales

Departamento  
Bioquímica y Biología Molecular y Celular

Director/es  
GARCÍA OTÍN, ANGEL-LUIS

<http://zaguan.unizar.es/collection/Tesis>



Reconocimiento – NoComercial – SinObraDerivada (by-nc-nd): No se permite un uso comercial de la obra original ni la generación de obras derivadas.

© Universidad de Zaragoza  
Servicio de Publicaciones

ISSN 2254-7606



**Universidad**  
Zaragoza

Tesis Doctoral

**EFFECTO DE LA HIPOXIA SOBRE LAS CÉLULAS  
PROGENITORAS ENDOTELIALES**

Autor

Javier Lozano Gerona

Director/es

GARCÍA OTÍN, ANGEL-LUIS

**UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA**

Bioquímica y Biología Molecular y Celular

2018





**Universidad**  
Zaragoza

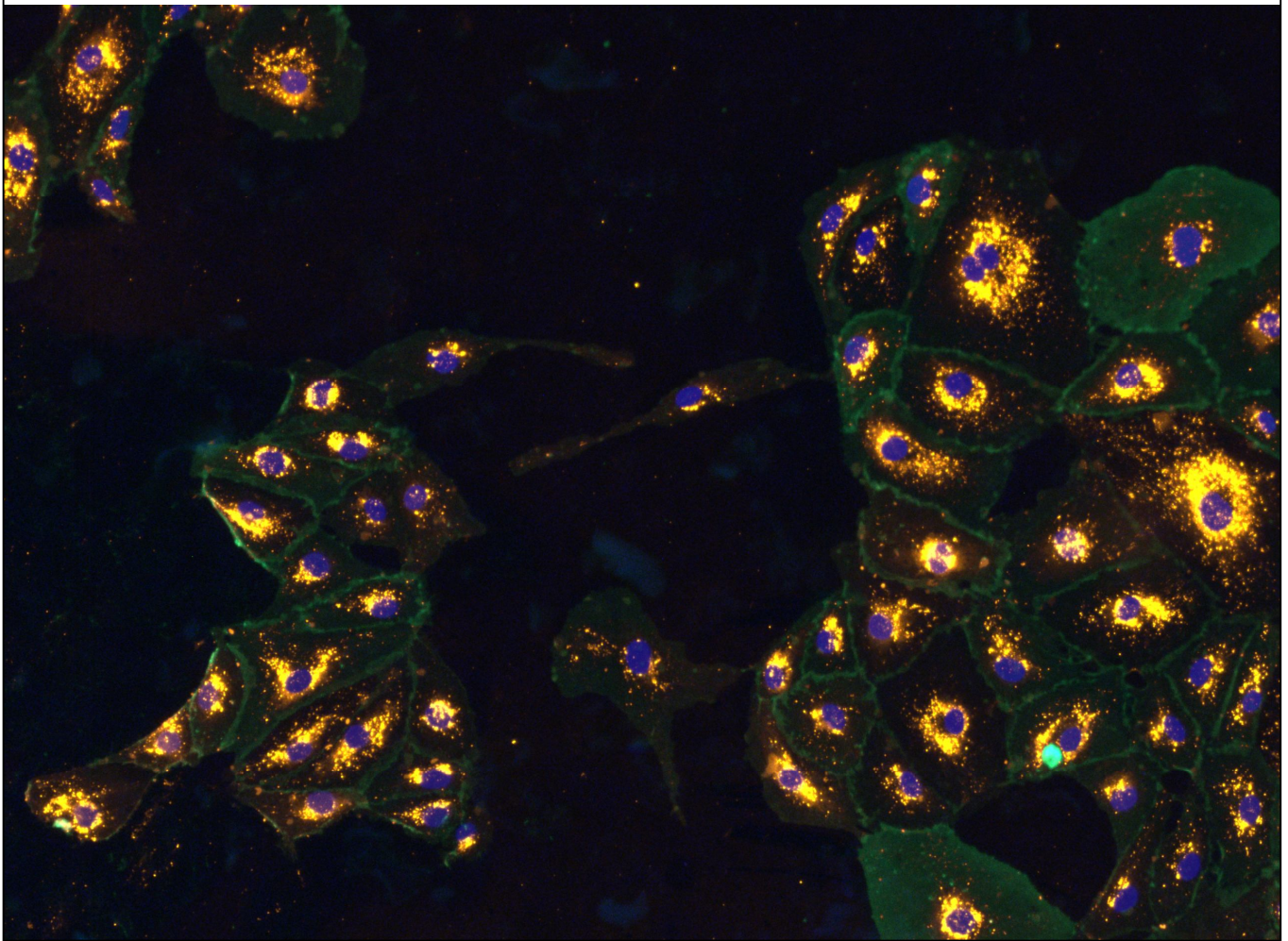


**Instituto Aragonés de**  
**Ciencias de la Salud**

# **Efecto de la Hipoxia sobre las Células Formadoras de Colonias Endoteliales**

Tesis Doctoral

Javier Lozano Gerona





# Universidad Zaragoza

**Facultad de Ciencias**

**Departamento de Bioquímica y Biología Molecular**



**Hospital universitario Miguel Servet**

**Unidad de Investigación Traslacional**

## **Efecto de la Hipoxia sobre las Células Progenitoras Endoteliales**

Memoria presentada por:

**Javier Lozano Gerona**

Licenciado en Bioquímica y Máster en Biología Molecular y Celular para optar al grado de Doctor por la Universidad de Zaragoza 2018

Tesis dirigida por el Dr. **Ángel-Luis García Otín**



D. Ángel-Luis García Otín, Doctor en Ciencias Químicas por la Universidad de Zaragoza, certifica que la Memoria de tesis Doctoral titulada: “Efecto de la Hipoxia sobre las Células Progenitoras Endoteliales”, presentada por D. Javier Lozano Gerona ha sido realizada en la Unidad de Investigación Traslacional del Hospital Universitario Miguel Servet bajo su dirección, y que reúne los requisitos necesarios para ser presentada por su autor para optar al Grado de Doctor por la Universidad de Zaragoza.

En Zaragoza a 27 de septiembre del 2018.

Fdo. Dr. Ángel-Luis García Otín





# 1 Agradecimientos

El presente trabajo resume un total de 4 años de trabajo de tesis doctoral. 5 si se tiene en cuenta el periodo de máster previo, que fue un preludio de este proyecto. Es importante por lo tanto indicar que, obviamente, es el resultado de la participación de mucha gente. No necesariamente de forma directa, mantener una relación estrecha con alguien también se traduce en avances profesionales.

Por lo tanto es imprescindible mencionar a varias personas. Primeramente, por rigor profesional, debo mencionar obviamente a mi director, el Dr. Ángel Luis García Otín, y de forma similar a todos con los que he compartido el laboratorio estos años, el Dr. Ralf Köhler, Jorge, Laura, Sergio etc. Así como los compañeros de despacho; Blanca, Lorena, Andrea, Alberto y todos aquellos que han ido pasando a lo largo de los años. De forma especial me gustaría mencionar a Vanesa Pérez Laguna, que ha tenido la paciencia de aguantar mis frecuentes diatribas cuando el trabajo se hacía pesado.

Por supuesto no queda más remedio que recordar a todos los profesores que me han transmitido un gran interés por la ciencia. A nivel de Universidad, instituto o colegio, todos ellos tienen también una cierta corresponsabilidad con lo conseguido. Por poner un ejemplo de cada nivel podríamos mencionar al Dr. Javier Sancho, a Norberto Cuartero Requejo o Javier Rivero Palomo.

Con el paso del tiempo he venido a apreciar también a los estudiantes de proyectos que han pasado por el grupo (graduados, máster, formación profesional...). Dar explicaciones de cómo funciona algo o por qué seguimos cierto protocolo resulta extraordinariamente relajante cuando se tiene la suerte, como he tenido yo, de tener un público tan atento y dedicado.

Por último, y probablemente con mayor importancia, quiero agradecer a mi familia el apoyo constante que he recibido. Cualquier éxito que haya conseguido o pueda conseguir se debe a ellos en gran medida. A mis padres y a mi hermano, por encima de cualquier otra mención, les debo todo.

Hay mucha más gente a la que convendría mencionar aquí, pero podría llenar un sinnúmero de páginas y no quisiera que un apartado secundario del trabajo se extendiera demasiado. Por lo tanto sólo dejaré por escrito mi más sincero agradecimiento a todos los que me han ayudado o soportado durante este tiempo.

Podéis estar orgullosos de vuestra participación en los avances y éxitos que deriven de este proyecto. Los fracasos son sin duda culpa mía.

Gracias a todos.

Este trabajo ha sido posible gracias al disfrute de una beca predoctoral concedida por la DGA en el BOA nº 168 del 28 de Agosto de 2014, número de referencia C072/2014.

## 2 Índices

### 2.1 Secciones

1	Agradecimientos .....	5
2	Índices .....	7
2.1	Secciones .....	7
2.2	Figuras .....	10
2.3	Tablas .....	12
3	Abreviaturas .....	13
4	Resumen .....	15
5	Introducción.....	17
5.1	Endotelio Vascular .....	17
5.1.1	Estructura del Endotelio .....	17
5.1.2	Funciones del endotelio vascular .....	18
5.1.3	Importancia del endotelio en patologías.....	22
5.2	Células progenitoras endoteliales.....	27
5.3	ECFC .....	31
5.3.1	Localización y Migración.....	34
5.3.2	Utilidad médica.....	37
5.3.3	Crecimiento <i>in vitro</i> de las Células Formadoras de Colonias Endoteliales.....	42
5.4	Tensión de Oxígeno .....	43
5.4.1	Tensión de oxígeno <i>in vivo</i> .....	44
5.4.2	Tensión de Oxígeno en Cultivos Celulares .....	47
5.4.3	Respuesta a Hipoxia .....	49
5.4.4	Inductores Químicos de Hipoxia .....	52
5.5	Hipoxia sobre endotelio y ECFC .....	55
6	Hipótesis y Objetivos .....	57
7	Materiales y Métodos.....	59
7.1	Obtención de las líneas celulares .....	59
7.1.1	Aislamiento de las ECFC .....	59
7.1.2	Cultivos Celulares .....	61
7.1.3	Caracterización de ECFC .....	63
7.2	Manejo de los Esferoides.....	64
7.2.1	Formación de esferoides.....	64
7.2.2	Internalización de nanopartículas ferromagnéticas.....	65
7.2.3	Angiogénesis tridimensional .....	65
7.3	Transducción.....	66
7.4	Testado de inductores de hipoxia.....	67
7.5	Estudios de proliferación .....	68
7.5.1	Proliferación en pases sucesivos .....	68
7.5.2	Proliferación en placa.....	69
7.6	Expresión génica .....	70
7.6.1	Elección de los genes a medir.....	73
7.6.2	Elección de la concentración a emplear .....	74
7.6.3	Elección de genes de referencia .....	75
7.7	Citometría .....	75
7.7.1	Apoptosis .....	75

7.7.2	Ciclo Celular.....	76
7.7.3	Marcaje de superficie .....	78
7.7.4	Marcaje de aldehído deshidrogenasa .....	79
7.8	Senescencia.....	80
7.9	Clonogenicidad .....	82
7.10	Western-Blot.....	84
7.10.1	Obtención de proteína .....	84
7.10.2	Medida de la concentración de proteína.....	85
7.10.3	Incubación con anticuerpos .....	85
7.11	Formación de túbulos sobre matriz basal .....	86
8	Resultados .....	89
8.1	Obtención de las líneas celulares .....	89
8.1.1	Aislamiento de las ECFC .....	89
8.1.2	Cultivo de las ECFC .....	91
8.1.3	Caracterización de las ECFC.....	91
8.1.4	Medida de ALDH .....	95
8.2	Desarrollo de modelo individualizado de angiogénesis.....	95
8.2.1	Control mediante nanopartículas ferromagnéticas .....	96
8.2.2	Pruebas de angiogénesis tridimensional.....	97
8.3	Modificaciones terapéuticas de las ECFC.....	99
8.3.1	Comprobación de la eficacia .....	100
8.3.2	Transducción de factores proangiogénicos .....	100
8.3.3	Proliferación en pases sucesivos.....	101
8.3.4	Proliferación a tiempos cortos .....	102
8.3.5	Ensayo de senescencia .....	103
8.3.6	Ensayo Clonogénico .....	104
8.3.7	Expresión genética .....	108
8.3.8	Formación de túbulos sobre matriz basal.....	109
8.4	Caracterización del efecto de la Hipoxia en las ECFC .....	110
8.4.1	Ensayos con inductores químicos de Hipoxia .....	111
8.4.2	Normoxia frente a Hipoxia moderada.....	130
8.4.3	Normoxia frente a Hipoxia aguda.....	145
9	Discusión.....	167
9.1	Obtención de las líneas celulares .....	167
9.2	Modelo individualizado de angiogénesis .....	170
9.3	Modificación génica de las ECFC .....	172
9.4	Respuesta a inductores químicos de Hipoxia .....	174
9.5	Efecto de la Hipoxia.....	183
9.5.1	Diferencias entre líneas de adulto y cordón .....	184
9.6	ECFC en clonogenia .....	185
9.6.1	Senescencia celular como posible causa .....	186
9.6.2	Selección de subpoblaciones como posible causa .....	187
9.6.3	Secreción al medio como posible causa.....	189
9.6.4	Expresión génica en clonogenia .....	192
9.7	Estudio de marcadores de superficie.....	195
9.8	Detección de HIF mediante Western-Blot .....	197
9.9	Ideas finales .....	199
10	Conclusiones .....	201
11	Bibliografía .....	205
12	Anexos .....	225

12.1	Anexo I.....	225
12.2	Anexo II.....	230
12.3	Anexo III.....	242
12.4	Anexo IV .....	244

## 2.2 Figuras

Figura 1: Características de arterias y venas. ....	18
Figura 2: Funciones del endotelio vascular. ....	21
Figura 3: Causas y consecuencias de las afecciones del endotelio vascular. ....	26
Figura 4: Subpoblaciones por diferentes protocolos de aislamiento.....	30
Figura 5: Mecanismo de reclutamiento y migración de las ECFC. ....	35
Figura 6: Hipotético tratamiento celular en base a las ECFC.....	39
Figura 7: Variables que afectan al nivel de O <sub>2</sub> en cultivo.. ....	49
Figura 8: Proceso de degradación y efecto de Factor Inducible de Hipoxia. ....	54
Figura 9: Separación por gradiente de una muestra de sangre. ....	59
Figura 10: Aislamiento de las ECFC a partir de las MNC sembradas.....	60
Figura 11: Ejemplo de células ECFC con tinción identificativa. ....	64
Figura 12: Formación de los esferoides. ....	65
Figura 13: Análisis de una medida de apoptosis.....	76
Figura 14: Resultado de una medida de ciclo celular. ....	77
Figura 15: Pasos de análisis del análisis de ALDH. ....	80
Figura 16: Imágenes del análisis de senescencia. ....	82
Figura 17: Proceso del ensayo clonogénico. ....	83
Figura 18: Formación de una estructura vascular sobre de Cultrex.....	87
Figura 19: Crecimiento de ECFC de cordón umbilical +HC y -HC.....	91
Figura 20: A) Pase final de las líneas. B) Tiempos de duplicación .....	93
Figura 21: Curvas de crecimiento de todas las líneas.. ....	94
Figura 22: Nivel de actividad de ALDH en la línea BH20.. ....	95
Figura 23: Efecto de las nanopartículas sobre la apoptosis.....	96
Figura 24: Colonias de la resiembra de esferoides. ....	97
Figura 25: Reconstrucción del modelo de angiogénesis tridimensional. ....	98
Figura 26: Medio EGM-2 vs medio OptiMEM sobre las ECFC.....	99
Figura 27: Medidas de microscopía y citometría de las líneas con GFP. ....	100
Figura 28: Curva de crecimiento en pases sucesivos de las líneas transducidas .....	101
Figura 29: Crecimiento de las células transducidas.. ....	102
Figura 30: Senescencia en las líneas transducidas.....	103
Figura 31: Senescencia en la línea transducidas de C2.1 (pase 18).....	104
Figura 32: Histograma del ensayo clonogénico con las líneas transducidas.....	107
Figura 33: Representación por cuartiles del ensayo clonogénico sobre las líneas transducidas. ....	107
Figura 34: Expresión de qPCR de las líneas transducidas. ....	108
Figura 35: Angiogénesis en células expuestas a medio de las líneas transducidas. ....	109
Figura 36: Angiogénesis con las células transducidas. ....	110
Figura 37: Crecimiento a 24 horas de BH54 pase 3 con CoCl <sub>2</sub> , DFO, y DMOG.....	112
Figura 38: Crecimiento a 24 horas de BH54 pase 5 con CoCl <sub>2</sub> , DFO y DMOG.....	113
Figura 39: Crecimiento a 24 horas de C1.2 pase 7 con CoCl <sub>2</sub> , DFO y DMOG. ....	114
Figura 40: Crecimiento de 3 días con CoCl <sub>2</sub> . ....	116
Figura 41: Crecimiento de 3 días con DFO.....	117
Figura 42: Crecimiento de 3 días con CoCl <sub>2</sub> y DMOG.....	117
Figura 43: Senescencia con CoCl <sub>2</sub> y DMOG.....	118
Figura 44: Muerte celular con CoCl <sub>2</sub> .....	119
Figura 45: Angiogénesis de las líneas C2.1 y BH10.....	121
Figura 46: Estabilidad de genes housekeeping.....	122

Figura 47: Expresión a 6, 24 y 48 horas en C2.1 pase 7 con CoCl <sub>2</sub> y DMOG. ....	124
Figura 48: Expresión a 6, 24 y 48 horas en BH10 pase 5 con CoCl <sub>2</sub> y DMOG. ....	125
Figura 49: Expresión a 1, 3, 6 y 24 horas en C1.2 pase 7 con CoCl <sub>2</sub> , DFO y DMOG...	127
Figura 50: Expresión a 1, 3, 6 y 24 horas en BH54 pase 5 con CoCl <sub>2</sub> , DFO y DMOG. ....	128
Figura 51: Proliferación en pases sucesivos en normoxia (21%), e hipoxia (5%).....	131
Figura 52: Proliferación en pases sucesivos en normoxia (21%), hipoxia (5%), y una condición intermitente. ....	132
Figura 53: Proliferación a tiempo corto de BH20 pases 2, 3, 4, 5 y 6 en normoxia o hipoxia (5%).....	133
Figura 54: Proliferación a tiempo corto de C1.4 pases 5, 7 y 9 en normoxia o hipoxia (5%). ....	134
Figura 55: Tiempos de duplicación para las líneas BH20 y C1.4 en normoxia o hipoxia (5%). ....	135
Figura 56: Proliferación a tiempo corto de C5.1 (aislada en normoxia) y la línea C5.2 (aislada en hipoxia 5%) en los pases 3 y 4, en normoxia o hipoxia (5%). ....	136
Figura 57: Histograma de las colonias con las líneas de cordón en normoxia e hipoxia (5%). ....	139
Figura 58: Histograma de las colonias con las líneas de adulto en normoxia e hipoxia (5%). ....	140
Figura 59: Representación por cuartiles del ensayo de clonogenia comparando normoxia frente a hipoxia al 5% .....	142
Figura 60: Expresión de marcaje en normoxia (21%) e hipoxia (5%).....	144
Figura 61: Curva de crecimiento en pases sucesivos en normoxia e hipoxia al 3 y 1% .	145
Figura 62: Curvas de crecimiento corta en normoxia e hipoxia al 3% y 1%. ....	147
Figura 63: Histograma de las colonias en normoxia e hipoxia al 3% y 1%. ....	148
Figura 64: Representación por cuartiles de clonogenia en normoxia e hipoxia al 3% y 1% .....	148
Figura 65: Histograma comparando normoxia e hipoxia al 3% y 1%, con cambio de medio diario o habitual.....	151
Figura 66: Histograma de las colonias con cambio de medio diario o habitual. En normoxia, hipoxia al 3% y al 1%. ....	152
Figura 67: Representación por cuartiles del ensayo clonogénico comparando normoxia, hipoxia al 3% y 1%, con cambio de medio habitual o diario .....	153
Figura 68: Senescencia en normoxia, hipoxia 3% y 1%. ....	155
Figura 69: Pases de la expansión en condiciones clonogénicas de la línea C2.1. ....	157
Figura 70: Pases de la expansión en condiciones clonogénicas de la línea C1.2 .....	158
Figura 71: Expresión génica de la línea BH10 pase 6 en clonogenia o habitual en condiciones de normoxia, hipoxia al 3% y 1%.....	160
Figura 72: Expresión génica de la línea C2.1 pase 6 en clonogenia o habitual en condiciones de normoxia, hipoxia al 3% y 1%.....	162
Figura 73: Expresión génica de la línea C2.1 pase 6 en clonogenia o habitual en condiciones de normoxia, hipoxia al 3% y 1%.....	163
Figura 74: Western-Blot sobre células HepG2 control del análisis de HIF1 $\alpha$ y HIF2 $\alpha$ .	164
Figura 75: Western-Blot de la línea C2.1 pase 6 en normoxia e hipoxia al 3% y 1% para HIF2 $\alpha$ .....	165
Figura 76: Esquema de las rutas afectadas por HIF1 $\alpha$ .....	181



## 2.3 Tablas

Tabla 1: Resumen del crecimiento en condiciones control para líneas empleadas. ....	92
Tabla 2: Tiempos de duplicación del crecimiento a pases sucesivos. ....	102
Tabla 3: Tiempos de duplicación obtenidos de las líneas transducidas. ....	103
Tabla 4: Características de los ensayos clonogénicos sobre células transducidas.....	105
Tabla 5: Número de colonias por condición de las células transducidas. ....	105
Tabla 6: Apoptosis para concentraciones crecientes de CoCl <sub>2</sub> .....	119
Tabla 7: Porcentaje de células en cada fase del ciclo celular a concentraciones crecientes de CoCl <sub>2</sub> .....	120
Tabla 8: Detalles del ensayo clonogénico en normoxia frente a hipoxia al 5%. ....	137
Tabla 9: Número de colonias obtenidas en normoxia e hipoxia 5%.....	138
Tabla 10: Apoptosis en normoxia frente a hipoxia al 5% .....	142
Tabla 11: Porcentaje de células en cada fase del ciclo celular en normoxia e hipoxia 5% .....	143
Tabla 12: Detalles del ensayo clonogénico en normoxia frente a hipoxia al 3 y 1% .....	147
Tabla 13: Número de colonias entre normoxia, hipoxia 3% y 1%.....	148
Tabla 14: Detalles del ensayo clonogénico en normoxia frente a hipoxia al 3 y 1% bien cambiando el medio cada 5 días o diariamente. ....	149
Tabla 15: Medida de apoptosis de la línea C2.1 en pase 6 entre normoxia, hipoxia 3% e hipoxia 1%.....	155
Tabla 16: Porcentaje de células en diferentes fases del ciclo celular en normoxia, hipoxia al 3% y al 1%.....	156
Tabla 17: Características del ensayo clonogénico con las líneas aisladas a partir de la expansión clonogénica de la línea C2.1 a diferentes concentraciones de oxígeno.....	157

### 3 Abreviaturas

ALDH: Aldehído deshidrogenasa

AM: Adrenomedulina

ARNT: Translocador nuclear receptor de aril hidrocarbano, también llamado HIF $\beta$

Atm: Atmósferas

BCA: Ácido Biquinónico

CAC: Células angiogénicas circulantes

CAIX: Anhidrasa carbónica 9

CDKN1A y CDKN2A: Inhibidor de la kinasa dependiente de ciclina 1A y 2A

CFU: Unidades formadoras de colonias

CXCR4: Receptor de citoquinas tipo CXC 4

DEAB: Dietilaminobezaldehído

DFO: Deferoxamina

DMOG: Dimetiloxalilglicina

DMSO: Dimetilsulfóxido

ECFC: Células formadoras de colonias endoteliales

eNOS: Óxido Nítrico Sintasa endotelial

EPO: Eritropoyetina

FBS: Suero Fetal Bovino

FGF2: Factor de Crecimiento Fibroblástico 2

GAPDH: Gliceraldehíd-3- fosfato deshidrogenasa

GFP: Proteína fluorescente verde

GLUT1: Proteína transportadora de glucosa 1

HDL: Lipoproteínas de alta densidad

HIF1: Factor inducible de hipoxia 1

HPP-ECFC: Células formadoras de colonias endoteliales de alta capacidad proliferativa

hTERT: Telomerasa humana

HUVEC: Células de endotelio vascular umbilical humano

ICAM: Molécula de adhesión intercelular

iPSC: Célula madre pluripotente inducida

KDR: Dominio receptor de inserto de kinasa, también llamado VEGFR-2

LDL: Lipoproteínas de baja densidad

miRNA: micro RNA

mmHg: milímetros de mercurio

MNC: Células Mononucleares Circulantes

mRNA: RNA mensajero

NO: Óxido Nítrico

NOS3: Óxido Nítrico Sintasa 3

Pa: Pascales

PAD: Enfermedad arterial periférica

PBS: Buffer salino de fosfato

PHD: Prolil hidroxilasa

PIGF: Factor de crecimiento de placenta

PPAM: Preproadrenomedulina

RANTES: o CCL5, ligando quemokina

5

REST: Factor silenciador de la transcripción en elemento represor 1

ROS: Especies reactivas de oxígeno

RPLP0: Proteína ribosomal P0

SDF-1: Factor derivado de células estromales

SOD: Superóxido Dismutasa

TLR4: Receptor tipo toll 4

TNF $\alpha$ : Factor de necrosis tumoral  $\alpha$

VCAM: Molécula de adhesión de célula vascular

VEGFA: Factor de crecimiento del endotelio vascular A

VEGFR-2: Receptor del factor de crecimiento del endotelio vascular 2

VSEL: Células madre similares a embrionarias muy pequeña

## 4 Resumen

Las ECFC son células progenitoras endoteliales, una subpoblación de las MNC, muy minoritaria con importantes funciones de angiogénesis, vasculogénesis y reparación del endotelio dañado en humanos.

Por ello se está profundizando en su funcionamiento con la intención de desarrollar nuevas terapias celulares para multitud de patologías con las que están relacionadas. Dicho uso viene requerido de un paso de cultivo en laboratorio debido al bajo número de estas células circulando en sangre. Consecuentemente, la búsqueda de las condiciones óptimas de cultivo de las ECFC presenta un gran interés.

Este trabajo se centra en la hipoxia; una señal en el organismo indicativa de problemas en el riego de un tejido. Es de esperar que tenga importantes efectos sobre las ECFC, participantes de su reparación.

Para el estudio se han obtenido líneas de sangre periférica de adulto y sangre de cordón umbilical, aislado las ECFC y cultivado *in vitro*. Estas células se han expuesto a una concentración de oxígeno menor a la atmosférica y considerado una serie de características.

Hemos observado que la hipoxia con respecto a la normoxia no afecta a la proliferación en condiciones habituales de las ECFC, pero a un mismo tiempo aumenta significativamente su capacidad clonogénica, la senescencia y ligeramente la apoptosis. También se han estudiado cambios a nivel de expresión genética y en la presencia de proteínas de superficie.

En conjunto se concluye que la hipoxia acelera una modificación que se produce de forma natural al cultivar las ECFC a un fenotipo más diferenciado que excreta una mayor cantidad de factores proangiogénicos. La inducción de dichos factores puede ser interesante como parte de la terapia con ECFC, pero por los efectos negativos de la hipoxia sugieren que la expansión sería más eficaz en normoxia.

Paralelamente se ha avanzado en otras aproximaciones que faciliten la transferencia de las ECFC a la medicina. Éstas incluyen el desarrollo de técnicas de cribado de su eficiencia por modelo de angiogénesis tridimensional, así como vías para lograr modificarlas genéticamente mediante vectores lentivirales para impulsar efectos beneficiosos.



## 5 Introducción

### 5.1 Endotelio Vascular

#### 5.1.1 Estructura del Endotelio

Todos los organismos superiores, por su tamaño, presentan la necesidad de repartir los nutrientes por los diferentes tejidos. La solución evolutiva ha sido el sistema circulatorio, un complejo circuito cerrado de vasos que recorren el organismo prácticamente en su totalidad transportando en su interior la sangre. La sangre, impulsada por el corazón, es una mezcla de compuestos en suspensión (suero) y células circulantes, en su mayor parte glóbulos rojos con función de transporte.

Los nutrientes así transportados son extravasados a los tejidos para cubrir sus necesidades, del mismo modo los residuos son recogidos y posteriormente eliminados por filtración en hígado y riñones. Este transporte de sustancias y células entre la sangre y el tejido circundante lo controla el endotelio vascular.

El endotelio es un tejido especializado compuesto por células endoteliales completamente diferenciadas. La morfología de estas células es aplanada y extendida, conformando una monocapa continua para poder actuar como frontera. Se encuentran sujetas por una estructura subyacente de células estromales que actúan como andamiaje de las células endoteliales. Las células del endotelio reciben información mediante sensores químicos y mecánicos del contenido sanguíneo (Badimón and Martínez-González, 2006) y emiten factores para lograr una respuesta apropiada en cada caso.

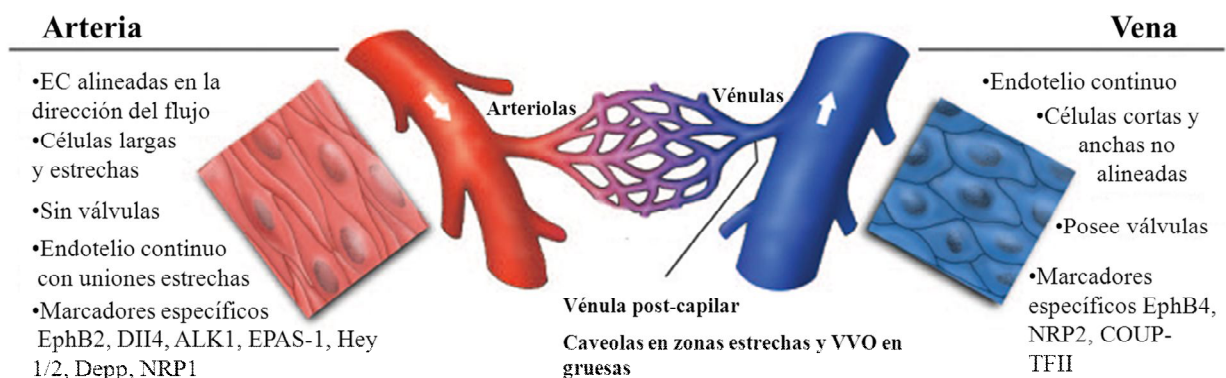
Debido a este papel organizador de frontera, el endotelio es un elemento común a todos los vasos del sistema circulatorio. Y como el sistema circulatorio irriga todas las células del organismo alcanza una considerable extensión al sumar todos los conductos que lo componen. Así, por ejemplo, los eritrocitos sumarían un 84% de las  $3 \times 10^{13}$  células que conformarían un ser humano adulto medio (aunque sólo representan el 3% de la masa del individuo por ser células muy pequeñas). Por el mismo motivo, el endotelio alcanza un importante 2.1% del total de las células, aproximadamente  $6.3 \times 10^{11}$  células, recubriendo a una densidad promedio de  $8.33 \times 10^4$  células endoteliales por  $\text{cm}^2$  de endotelio vascular los  $1.59 \times 10^7$  metros de vasos sanguíneos diversos (Sender et al., 2016). Éstas se encuentran repartidas por todos los rincones del organismo formando parte de las venas,

arterias, capilares y conductos intermedios. En todos los vasos las células endoteliales se organizan en una monocapa, pero en cada uno presentan importantes diferencias fenotípicas.

Estas diferencias se producen entre los endotelios de los diferentes tipos de vasos (dela Paz and D'Amore, 2009), de los diferentes órganos e incluso de la zona de un mismo órgano (Ribatti et al.).

El endotelio de las arterias es continuo, con un importante papel a la hora de regular el tono muscular de la capa subyacente, y se encuentra preparado para soportar una presión mayor. Las células se encuentran alineadas en la dirección del flujo y fuertemente unidas. Marcadores específicos incluyen los genes Efrina B2, DII4, ALK1, EPAS-1, Hey 1 y 2, Depp y NRP1.

Las células de las venas, por el contrario, aunque tampoco permiten el transporte de nutrientes, se encuentran dispuestas de forma más regular, sin una dirección concreta dado que la presión a la que se encuentran expuestas es mucho menor. Esta baja presión obliga, no obstante, a la presencia de válvulas a intervalos regulares para impedir el reflujo de la sangre. Marcadores que las caracterizan son Efrina B4, NRP2 o COUP-TFII (ver Figura 1) (Aird, 2007a).



**Figura 1: características de arterias y venas. Imagen de Aird 2007b, traducida.**

### 5.1.2 Funciones del endotelio vascular

Queda claro, por lo tanto, que el endotelio vascular es un tejido muy heterogéneo que cumple un amplio abanico de funciones aparte de la conocida función de frontera entre la sangre y el resto de tejidos. Enumerando brevemente algunas estas funciones tenemos:

- Barrera semi-selectiva.

Como ya se ha comentado, una de las funciones capitales del endotelio es el intercambio de nutrientes y compuestos entre el interior de los vasos sanguíneos y el tejido circundante. Se produce principalmente en los capilares, con excepción del intercambio de oxígeno que tiene lugar en gran medida en las arteriolas (Pittman, 2011). Debemos distinguir entre la permeabilidad basal y la permeabilidad inducida. Ambos procesos se producen en una extensión muy diferente entre los diferentes órganos, según el tipo de endotelio presente (ver **¡Error! La autoreferencia al marcador no es válida.**). La permeabilidad basal se produce principalmente mediante el transporte paracelular que tiene lugar entre las células, especialmente cuando se trata de endotelio fenestrado o discontinuo, pero también transcelularmente mediante las caveolas y los orgánulos vesículo-vacuolares (VVO). Por su parte la permeabilidad inducible, que tiene lugar principalmente durante los procesos de inflamación, se produce mediante la apertura de canales transendoteliales y mediante vacuolas (Aird, 2007a).

- Regulación del tono vascular.

Un proceso producido en arterias y arteriolas donde las células del endotelio actúan como reguladores de la contracción de la capa muscular que las rodea según la información mecánica, química y hormonal que reciben, como la insulina (Back et al., 2012). Para transcribir esta señal al tejido muscular el principal efector es el NO, producido por la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS), aunque hay otros como la prostaciclina (Fleming, 2000) o las uniones mioendoteliales que transmiten los cambios de potencial entre las células endoteliales y las musculares (Mathew John et al., 2018). El NO atraviesa libremente las membranas celulares, alcanza el músculo liso e induce contracción o relajación según el vaso en cuestión. El NO es muy sensible a los ROS presentes en forma de  $O_2^-$  (creado por la NADPH oxidasa), haciendo a los vasos sensibles a la disponibilidad de oxígeno (Golub and Pittman, 2013).

- Coagulación.

Que el endotelio impide la coagulación de la sangre es una función ampliamente conocida, pero de una complejidad mayor de lo que podría parecer. Pasivamente el endotelio expone al flujo sanguíneo una superficie anticoagulante, siendo el colágeno



bajo él el iniciador del proceso de coagulación como mecanismo de reparación en caso de rotura de un vaso (Cooley, 2013). Pero además participa activamente en la emisión de factores pro y anti trombocíticos en caso de necesidad, participando por ejemplo en la agregación de plaquetas o el reclutamiento de leucocitos. La cantidad y tipo de los marcadores varía según el vaso estudiado, lo que hace que el riesgo de trombosis accidental no sea homogéneo en el organismo (Rajendran et al., 2013).

- **Inflamación y regulación inmunológica.**

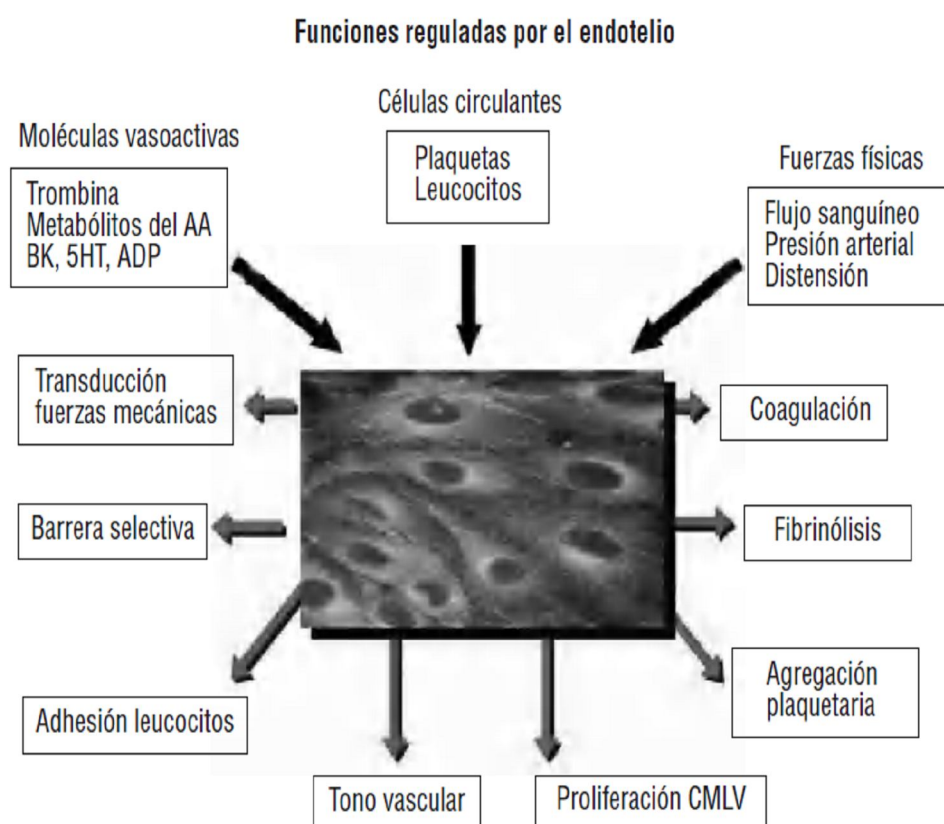
Las células endoteliales son críticas para la extravasación de las células inmunes a las zonas infectadas. El proceso de inflamación, típicamente inducido por citoquinas como el TNF $\alpha$ , induce respuesta en gran número de tejidos al activar la ruta metabólica del NF $\kappa$ B. En las células endoteliales estos cambios incluyen la exposición a la luz del vaso de P-selectinas que interaccionan con las ICAM de las células inmunes, ralentizándolas, haciéndolas rodar y finalmente provocando su extravasación (Rajendran et al., 2013). Las células endoteliales sobreexpresan TNFAIP3, lo que las protege del efecto proapoptótico de TNF $\alpha$  (Guo et al., 2014). Todo este proceso de reclutamiento se produce principalmente en las vénulas postcapilares, una vez las células blancas han sido activadas por las citoquinas emitidas por la zona afectada, pudiendo pasar por los huecos entre células o incluso a través de los canales transendoteliales que atraviesan la célula endotelial en algunos vasos (Aird, 2007b).

- **Angiogénesis.**

Aparte del proceso de vasculogénesis donde se forman vasos a partir de islotes independientes (proceso de formación de la vasculatura principalmente durante el desarrollo fetal), las células endoteliales se caracterizan por protagonizar un crecimiento del sistema vascular por extensión de vasos preexistentes denominado angiogénesis. En este proceso una de las células modifica su expresión y pasa a ser “líder”, expresando metaloproteinasas que remodelan la matriz extracelular y le permiten migrar (Eilken and Adams, 2010). Gracias a las citoquinas expresadas por esta célula, las que le siguen proceden a dividirse y reorganizarse tras ella extendiendo así un nuevo vaso en la dirección desde donde llegan las señales de falta de riego. Una vez instaladas regeneran la matriz secretando fibronectina (Korybalska et al., 2013).

- Homeostasis tisular.

Una de las funciones más conocidas e importantes del endotelio es la regulación y mantenimiento de la homeostasis en los diferentes tejidos del organismo. Se entiende por homeostasis al mantenimiento en un rango relativamente estrecho de la composición y propiedades en un medio, el organismo en este caso. Para lograrlo el endotelio recurre a las propiedades ya comentadas, detección de la situación del tejido y el contenido en sangre, seguido de la propia emisión de señales celulares y adecuación de la permeabilidad correspondiente de forma coordinada. Aunque buena parte del intercambio entre el seno del vaso y las células fuera del mismo se produce mediante vías dirigidas por gradiente de los compuestos transportados como H<sub>2</sub>O, solutos pequeños o incluso lipoproteínas (Michel et al., 2015) también hay un importante transporte activo con participación de mecanismos propios de las células endoteliales. Cuando el transporte pasivo no se produce en la extensión necesaria estos mecanismos activos entran en juego para compensar desviaciones en la homeostasis. Estos procesos incluyen la formación de vacuolas de clatrina o captación por receptor de macromoléculas (BAUM et al.).



**Figura 2: Funciones del endotelio vascular. Imagen de Badimón y Martínez-González 2006.**

Asimismo, dado que el sistema vascular es la base de la nutrición tisular, juega un papel fundamental en el desarrollo de órganos. No sólo a la hora de formarse durante el desarrollo fetal, sino también en cualquier proceso de remodelación. Las células endoteliales participan activamente en la destrucción y reconstrucción de la matriz extracelular y preceden cualquier aumento o disminución en el tamaño de un órgano, adaptando previamente la distribución del sistema vascular en la zona (Tirziu and Simons, 2009). Siendo un ejemplo característico de este proceso, por extenso, la reparación de un hueso roto (Xue et al., 2013).

### **5.1.3 Importancia del endotelio en patologías**

Tras repasar la gran cantidad de funciones de las que participa el endotelio, resulta claro que cuando falla en su papel se producen gran número de procesos patológicos. Los fallos en los que puede derivar pueden, groseramente, dividirse en dos procesos contrarios; la disfunción endotelial y la angiogénesis patológica.

Podríamos definir la disfunción endotelial como toda situación en la que las células endoteliales no cumplen las funciones enumeradas en el apartado anterior o no lo hacen en la extensión que debieran. Las causas pueden ser múltiples, así como sus consecuencias, a continuación intentaré enumerar las principales:

- Acumulación de nutrientes.

Uno de los motivos de una mayor incidencia es la acumulación en el flujo sanguíneo de ciertos nutrientes en exceso. Es el caso de la diabetes, donde un nivel excesivo de azúcar en sangre provoca, de forma leve pero continuada en el tiempo, un daño en el endotelio vascular expuesto, principalmente por desequilibrios metabólicos y fragmentación mitocondrial con un aumento de los ROS generados. Dado que el endotelio es el principal encargado de exportar al resto de tejidos la insulina circulante juega un papel fundamental a la hora de determinar la gravedad de la patología, a mayor resistencia a insulina por parte del endotelio menor presencia en todo el organismo (Kolka and Bergman, 2013). Asimismo, otra patología característica es la aterosclerosis, donde en este caso los lípidos captados por las células endoteliales son los que se acumulan bajo éstas. La primera, debilitante del endotelio, podría incluso inducir la segunda (Ellis et al., 2013).

- Edad.

La edad en sí misma es también elemento causal de la disfunción endotelial. Se ha observado en células de endotelio vascular umbilical humano (HUVEC), modelo de estudio del endotelio vascular, que conforme las células envejecen tras sucesivas duplicaciones sufren acumulación de homocisteína, lo cual inhibe la metilación en ciertas zonas del DNA como es el caso de la zona promotora del gen de la telomerasa humana (hTERT), inhibiendo epigenéticamente el gen. Se produce consecuentemente un acortamiento de los telómeros y aumento de las proteínas de control p16, p21 y p53. Finalmente se observa estrés oxidativo y reducción de la actividad de eNOS. Este proceso inducido en modelos de ratón deriva en un aumento importante de las placas ateroscleróticas (Zhang et al., 2015).

- Hipertensión.

Padecerla de forma continua es otra de las causas que inducen un estrés constante sobre el endotelio. Parece ser simultáneamente causa y consecuencia de la disfunción endotelial, agravando sus efectos (Bernatova, 2014). Mencionar que, aunque no se ha demostrado aún en humanos, el estrés podría ser fuente de hipertensión y por lo tanto otro factor de la disfunción endotelial.

- Obesidad.

No sólo es causa de hipertensión, niveles excesivos de lípidos e insulina en sangre, sino que los niveles altos de adipocinas emitidos por los adipocitos aumentan el riesgo de sufrir los problemas propios de la disfunción endotelial (Prieto and Sanchez, 2014).

- Isquemia.

Padecer episodios de isquemia, falta de oxígeno, habitualmente debido a infartos, es otra causa. En un intento de solucionar la falta de riego se iniciará un proceso angiogénico de emergencia, lo que impone un gran nivel de estrés sobre el endotelio, lo que a su vez puede derivar en disfunción del mismo.

Una vez causada la disfunción endotelial, ésta tiene una serie de consecuencias:

- Aneurisma.

Supone la rotura del vaso sanguíneo. Habitualmente este es un caso extremo y varios factores deben acumularse en una sección especialmente débil, por malformación congénita, para que tenga lugar. No obstante la rotura espontánea de un vaso sanguíneo, o aneurisma, típicamente en arteria debido a la alta presión, es una patología de una mortalidad extremadamente alta (Skagius et al., 2008).

- Patologías crónicas.

Varias enfermedades derivadas de la disfunción endotelial se consideran crónicas en la mayoría de casos. Los procesos de diabetes tratada o aterosclerosis son de incidencia lenta, asintomáticos en un principio, pero de graves consecuencias a largo plazo. Afectan a un 4.1% y un 21.8% de la población respectivamente (Koulaouzidis et al., 2014; Nichols et al., 2015), con especial incidencia en individuos de mayor edad, varones, con hipertensión o dislipemias. Se considera excesivo en un decilitro de sangre medir 300 mg de colesterol total, o bien a 100 mg de partículas LDL (Royo-Bordonada et al., 2016). Por su parte, tener más de 125 mg de azúcar por decilitro de sangre en condiciones basales supone un riesgo para el desarrollo de diabetes (SAILA).

Se ha visto que tanto la diabetes como la isquemia provocan un fallo en el funcionamiento de las uniones entre las células endoteliales. Como resultado se pierde coordinación entre las células y se agravan los problemas derivados de la disfunción (Boedtkjer et al., 2013).

La aterosclerosis acaba formando una placa ateromatosa, formada por la acumulación de lípidos, que inducen inflamación, y células espumosas (derivadas de los monocitos reclutados) que agravan el problema (Fenyo and Gafencu, 2013). Las células endoteliales entran en senescencia y, finalmente, la placa en crecimiento acaba tapando la luz del vaso, se parte creando un trombo o incluso deriva en rotura del endotelio e inicia la cascada de coagulación (Korybalska et al., 2013), provocando todas estas posibilidades un infarto.

Por otra parte, una angiogénesis excesiva es también fuente de multitud de problemas.

Las causas tras este crecimiento también son variadas:

- Diabetes.

Sorprendentemente, la diabetes, a pesar de ser una de las causas mencionadas en el apartado anterior, también es causa de una angiogénesis excesiva en tejidos específicos, como en la retina, lo que se conoce como retinopatía diabética (Tepper, 2002).

- Malformación en el desarrollo fetal.

Muchos de los procesos patológicos relacionados con la angiogénesis tienen lugar durante el desarrollo fetal, donde la formación del sistema vascular es de importancia capital. Si durante este proceso se produce un desbalance de los gradientes que regulan la formación de órganos pueden derivar en serios problemas para el feto.

- Inflamación crónica.

La angiogénesis también tiene lugar en procesos de inflamación continuados en el tiempo. En el caso de infecciones crónicas o procesos autoinmunes puede ocurrir que la acumulación de factores proinflamatorios deriven en diversas patologías de esta índole, como sería por ejemplo la artritis reumatoide (Elshabrawy et al., 2015).

- Cáncer.

No obstante, la mayor causa con diferencia del exceso de crecimiento vascular es el crecimiento tumoral. Dado que los tumores crecen de forma descontrolada su núcleo rápidamente se queda sin nutrientes para mantener su crecimiento. Este hecho provoca que sólo aquellos casos donde se produzca una comunicación entre la vasculatura y el tumor para inducir una angiogénesis forzada que lo irrigue deriven en un tumor de crecimiento rápido, siendo por tanto los casos que reportan mayor gravedad. Se han dado casos de tumores que interaccionan con el endotelio mediante proteínas de superficie (Sennoune et al., 2014), secreción de fragmentos proteicos señalizadores (Sato et al., 2014), secreción de proteínas completas (Woon Kim et al., 2013), o incluso mediante exosomas (Tadokoro et al., 2013).

El endotelio que irriga los tumores tiende además a perder parte de su selectividad como barrera, facilitando la transición epitelio-mesenquimal, primer obstáculo a superar por el tumor para metastatizar (Yang and Wu, 2008).

Ciertos tejidos son especialmente sensibles a procesos de angiogénesis patológica. Es el caso de la retina, ya mencionado, así como el sistema nervioso central. Cuando se

produce un episodio isquémico, herida, etc. que requiera una remodelación del flujo en el cerebro, éste debe producirse con una urgencia superior a otros tejidos menos sensibles. Esta urgencia puede derivar en un proceso de inflamación patológica o incluso acabar con la continuidad de la barrera hemato-encefálica. Actualmente es objeto de investigación el delicado equilibrio entre factores pro y antiangiogénicos que regula este proceso (Vallon et al., 2014).

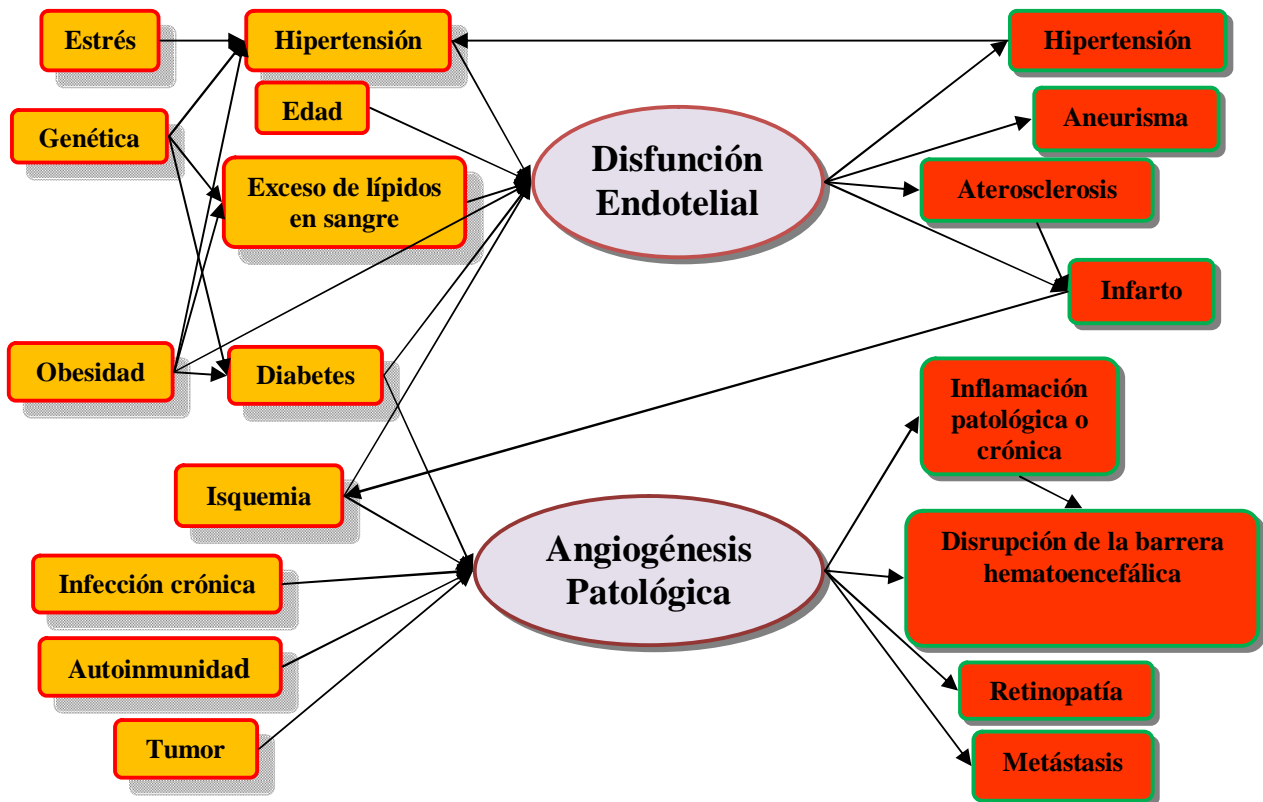


Figura 3: Causas y consecuencias de las afecciones del endotelio vascular.

## 5.2 Células progenitoras endoteliales

Todas las células del organismo proceden de las células madre originales o troncales. Estas células poseen una capacidad proliferativa muy elevada y conforme se van creando los diferentes tejidos del organismo pasan por un proceso de varios pasos de diferenciación que las dirige a un estadio final donde acaban perdiendo esa capacidad proliferativa para ganar las funciones que deberán desempeñar. Según en qué estadio de la diferenciación se encuentre una célula en concreto se le dan diferentes nombres; célula madre totipotente, pluripotente, célula progenitora o precursora y célula diferenciada.

Las células progenitoras endoteliales se definen como aquellas células que no han concluido por completo su diferenciación a célula endotelial y conservan una alta capacidad proliferativa basal, aunque han transcurrido ya los pasos necesarios para que, de forma natural, no puedan retrotraerse al estadio de célula madre pluripotente.

Comparten por lo tanto muchas características comunes a las células endoteliales, pero a diferencia de aquellas no son adultas maduras ni capaces de cumplir sus funciones. Tampoco comparten su limitada capacidad proliferativa basal (Basile et al., 2012).

Históricamente, se tenía constancia desde hace tiempo de la existencia de reservorios en el endotelio donde las células poseían una capacidad de proliferación muy superior al resto (Schwartz and Benditt, 1976). Este misterio fue resuelto en 1997 con el trabajo de Asahara et al. (Asahara et al., 1997). En este trabajo, se define una nueva subpoblación minoritaria de la fracción de células mononucleares circulantes (MNC) en sangre periférica a la que denominan células progenitoras endoteliales (EPC). Estas células serían las responsables de esa proliferación extraordinaria y localizada en el endotelio.

Desde la publicación de dicho trabajo la definición exacta de EPC ha variado sensiblemente a lo largo de los años conforme se iban descubriendo detalles. De hecho, poco después de su descubrimiento se observó que lo que se había supuesto una nueva población celular era en realidad una mezcla heterogénea con multitud de subpoblaciones diversas de clasificación bastante más compleja.

Uno de los problemas a la hora de estudiarlas es que hay muy pocas EPC circulando en un momento determinado en la sangre periférica de un individuo, entre 1 y 10 EPC por cada millón de células mononucleares (MNC). Dado que en cada mililitro de sangre de un individuo sano encontramos entre 4 y 10 millones de MNC y se acepta de forma general



que un adulto posee 5 o 6 litros de sangre en todo su cuerpo, se deduce que, de forma muy aproximada, el número de EPC circulando en un momento dado en la sangre periférica de un ser humano ronda entre 20.000 y 600.000, números irrisorios en biología celular. De hecho, no en todas las muestras de sangre es posible aislar colonias de EPC.

En los trabajos publicados las cifras de éxito para su aislamiento divergen en gran medida. Corselli et al. obtienen EPC de un 81.5% (Corselli, 2008) de las muestras, otros en un 61% de muestras de sangre periférica (Ott, 2005), Tasev et al. Menciona un rendimiento de 0.08-0.16 colonias por mL de sangre (Tasev et al., 2015) y en otra publicación se menciona 0.017 colonias por millón de MNC (Yoder et al., 2007).

Los principales motivos de esta variabilidad parecen ser el procedimiento de aislamiento, la superficie sobre la que se siembra, la cantidad de suero empleado, la salud del donante y, de forma muy importante, si la muestra de sangre tenía un origen de cordón umbilical o de sangre periférica.

Debido a la necesidad de cribar gran número de células para poder localizar las EPC se ha recurrido típicamente a la citometría de flujo para poder encontrar y clasificar estas células. Desgraciadamente, a pesar de diversos trabajos al respecto (Estes et al., 2010; Mund et al., 2012) no se ha logrado un set de marcadores que logren una separación completa (Ribatti, 2007). Eso no implica que no resulten de utilidad, pues acotan en gran medida la búsqueda. En los sets empleados se incluyen marcadores propios de células hematopoyéticas inmaduras como CD133 o CD34 así como marcadores típicos de célula endotelial como el receptor del factor de crecimiento vascular tipo A (VEGFA), KDR.

Las pruebas de cultivo tampoco son determinantes por sí mismas a tiempos cortos, dado que entre las EPC suelen encontrarse también circulando en sangre trazas de células madre de médula ósea y otras subpoblaciones (Yoder et al., 2007). Algunas de estas células dan lugar a monocitos en cultivo, otras participan in vivo del proceso de reparación del endotelio vascular, como emisores de factores proangiogénicos, lo cual complicó aún más acotar la clasificación. Atendiendo a diferentes criterios se han definido diferentes clasificaciones posibles (George et al., 2011).

De acuerdo al procedimiento de aislamiento de las EPC se distinguen las siguientes subpoblaciones principales (aunque existen más tipos minoritarios), obtenibles mediante diferentes protocolos sembrando MNC de sangre en placas recubiertas de fibronectina o

colágeno con medio de cultivo para células endoteliales (Hirschi et al., 2008; Williamson et al., 2012) como se muestra en la Figura 4:

- Unidades formadoras de colonias (*colony forming units* CFU)

También llamadas en algunos trabajos EPC tempranas, son las primeras colonias en formarse (en la primera semana), con una estructura característica con diferentes poblaciones celulares hematopoyéticas. Presentan grandes células en el centro rodeadas de células pequeñas y puntiagudas similares a fibroblastos en la zona exterior. Pero una vez formadas las colonias, éstas no crecen, sino que poco a poco las células se van perdiendo hasta desaparecer. Se ha observado que estas células emiten diversas citoquinas proangiogénicas (VEGFA, HGF, IGF y otros (Asahara et al., 2011)). Presentan en su superficie marcadores CD45, CD14, VEGFR2 y CD31. Surgen con mayor facilidad empleando superficies recubiertas de fibronectina en lugar de colágeno (Bou Khzam et al., 2015; Minami et al., 2015).

- Células angiogénicas circulantes (*circulating angiogenic cells* CAC)

Células que en ningún momento forman colonias, pero que permanecen adheridas a la placa de cultivo. Son las más numerosas a la hora de realizar el aislamiento en los primeros momentos del mismo, los protocolos desarrollados para obtenerlas recomiendan seleccionarlas en el día 4 tras la siembra. Como las anteriores ayudan en el proceso angiogénico mediante la emisión de citoquinas proangiogénicas. Se trata de una población heterogénea de origen monocítico.

- Células formadoras de colonias endoteliales (*endothelial colony forming cells* ECFC)

Son las últimas en aparecer al aislarlas (segunda semana). Acaban formando colonias homogéneas de células con una morfología típica de célula endotelial, pero el número de estas colonias es muy inferior a los dos grupos mencionados. Su origen en la jerarquía de diferenciación no está del todo claro, aunque parecen derivar de hemangioblastos en lugar de células hematopoyéticas (Asahara et al., 2011; George et al., 2011). A diferencia de los dos grupos anteriores su principal función como células proangiogénicas es la de incluirse como parte de los nuevos vasos sanguíneos en creación convirtiéndose al final en células endoteliales maduras (Kawamoto et al., 2001), se diferencian de aquellas en la proliferación y la falta de CD36 (Ott, 2005). Comparativamente, emitirían pocos factores que promuevan el crecimiento de las

endoteliales ya existentes. Expresan en su superficie marcadores CD34, VEGFR2, CXCR4, CD105 y CD133 (Asahara et al., 2011).

- Células madre similares a embrionarias muy pequeñas (*very small embryony-like cells* VSEL)

Son células con una cierta capacidad proangiogénica paracrina, aunque de menor grado que las poblaciones mencionadas. Como células madre también tienen una cierta capacidad vasculogénica. Habitualmente las VSEL son casi inexistentes en sangre periférica, pero son movilizadas de la médula ósea en episodios de isquemia (Guerin et al., 2015) e infarto (Wojakowski et al., 2008).

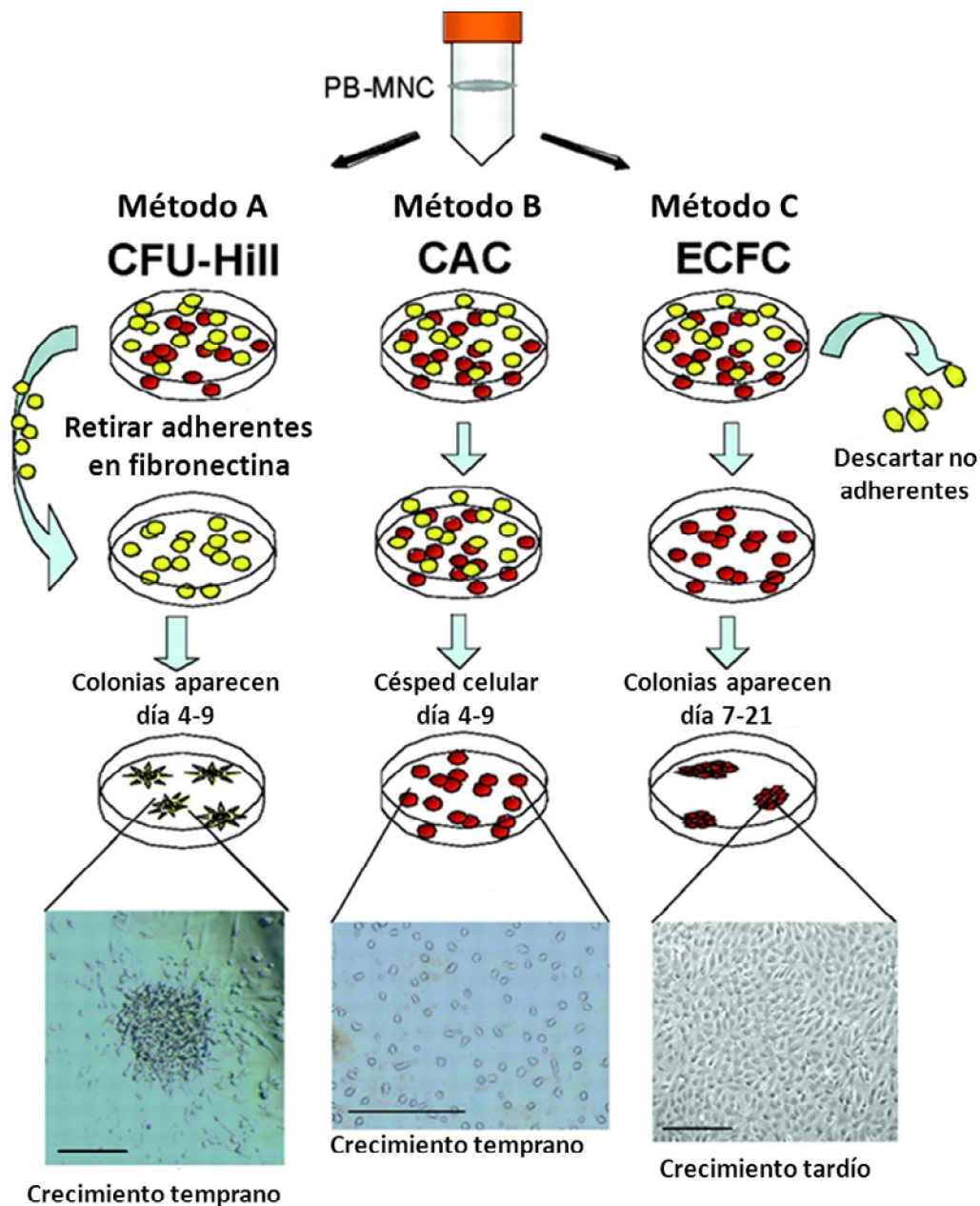


Figura 4: Subpoblaciones angiogénicas que surgen por los diferentes protocolos de aislamiento a partir de MNC. Imagen de Hirschi et al. 2008, traducida.

De todas las poblaciones mencionadas, sólo las ECFC cumplirían su función principalmente pasando a formar parte realmente de los nuevos vasos sanguíneos. Al aparecer de forma algo más tardía han recibido varios nombres en diversos trabajos publicados; células formadoras de colonias endoteliales (ECFC), células predominantes endoteliales (*Endothelial Outgrowth Cells*, EOC) o células progenitoras endoteliales tardías (*late EPC*).

### 5.3 ECFC

Las ECFC se encuentran presentes en todos los humanos, tanto adultos como neonatos. Si bien en cantidad pequeña y muy variable entre individuos. Estas células serían las principales encargadas de la reparación de zonas dañadas del endotelio, ayudarían a la extensión y generación de nuevos vasos sanguíneos y conceden, incluso en individuos adultos, la capacidad de llevar a cabo la vasculogénesis (Asahara et al., 2011). La vasculogénesis es un proceso de creación de nuevos vasos sanguíneos por la cual células derivadas de hemagioblastos aún no diferenciadas forman un cúmulo en una zona del tejido y se estructuran en forma de túbulo, el cual se extiende hasta finalmente conectar con el resto del sistema circulatorio. Este proceso, hasta el trabajo de Asahara, se creía exclusivo de embriones en mamíferos y que individuos adultos sólo podían extender vasos preexistentes, por angiogénesis, para mejorar la irrigación de tejidos.

Al ser células primarias, las ECFC presentan una gran diversidad entre las líneas aisladas, siendo no sólo difícil lograr un consenso entre los procedimientos de aislamiento e identificación sino con los valores de proliferación y capacidad angiogénica. Se acepta como valor prospectivo de la viabilidad de una línea aislada de ECFC el tiempo en que tarda en formar una colonia visible cuando la fracción de células mononucleares de sangre se siembra sobre colágeno con medio de crecimiento propio de células endoteliales. A menor tardan en formar una colonia de tamaño visible al microscopio mayor capacidad proliferativa y mayor número de pases antes de alcanzar la senescencia se obtendrán (Minami et al., 2015). Incluso existe la posibilidad, aunque el número de medidas al respecto no permite confirmarlo, que a más tarde se aísle la colonia ésta se compondrá de células más diferenciadas a endotelio (Collet et al., 2016), lo que explicaría la reducción en la capacidad proliferativa. Dando peso a esta teoría, si se crean con vectores lentivirales células madre pluripotentes inducidas (iPSC) a partir de ECFC de

cordón, éstas proporcionan una mayor eficiencia, expresión de genes asociados a pluripotencia (DNMT3B, GBX2, GDF3, GRB7, ISL1, PODXL, NANOG, SOX2 y TDGF1) y número de pases en cultivo superior a las iPSC que se obtienen a partir de células endoteliales de arteria humana (HAEC) (Guillevic et al., 2016).

El aislamiento en cualquier caso conviene realizarlo sobre muestras frescas dado que, aún conservadas, las muestras antiguas ofrecen un rendimiento reducido. Si bien no es imposible sacar líneas de estas muestras (DiMaio et al., 2016).

Poseen una capacidad proliferativa importante, en experimentos realizados en el grupo hemos llegado a observar tiempos de duplicación de hasta menos de 20 horas en algunos casos. Durante los primeros pases de cultivo incluso se ha observado que presentan cierta actividad telomerasa (Ingram, 2004) pudiendo durar gran número de pases antes de entrar en senescencia, en nuestra experiencia han alcanzado hasta 20 pases sucesivos acumulando casi 30 duplicaciones acumuladas medidas, es de suponer que el número total sea bastante superior pues no se incluyen las duplicaciones al inicio de la expansión. Las células obtenidas a partir de sangre de cordón umbilical en cualquier caso crecen más deprisa y durante más pases que aquellas obtenidas a partir de muestras de sangre periférica de adulto. Ingram et al. (Ingram, 2004) incluso hace una distinción entre subpoblaciones de ECFC de acuerdo a su capacidad proliferativa, denominando a aquellas con un mayor crecimiento “ECFC de alto poder proliferativo” (HPP-ECFC), asegurando que ciertas líneas llegan a alcanzar más de 100 pases sucesivos sin aparente pérdida de sus propiedades.

Estas HPP-ECFC surgen siempre de las muestras de sangre de cordón umbilical, aunque si su ausencia de muestras de adultos es debido al envejecimiento natural de todas las células del cuerpo o si realmente se trata de una subpoblación sólo presente durante el desarrollo fetal no está claro. Sugiriendo que no se trata de una subpoblación específica fetal se ha observado que las ECFC obtenidas de muestras de sangre de cordón umbilical de recién nacidos prematuros muestran un contenido superior en células madre mesenquimales que las muestras de sangre de cordón umbilical de neonatos a término pero al mismo tiempo un menor número de ECFC (Javed et al., 2008).

De acuerdo a (Patel et al., 2016) las HPP-ECFC al ir creciendo van modificando algunos de sus marcadores y aquellas que mantienen el marcaje CD34+ continúan comportándose como HPP-ECFC mientras que aquellas células que lo pierden sufren así mismo una

reducción en su capacidad proliferativa, clonogénica y de formación de vasos. La migración de estas células procedentes de cordón en los experimentos *in vitro* también es superior (Cheng et al., 2012). La proteína CD34 es una proteína transmembrana que controla la localización de otras proteínas de membrana celulares para organizar la direccionalidad, algo importante en migración, adhesión y mantenimiento de pluripotencia (Nielsen and McNagny, 2008).

Por contra existen algunas observaciones que desdican los coherentes resultados que se observan *in vitro*. Las ECFC aisladas de la macrovasculatura fetal de placenta, a pesar de mostrar mejor comportamiento *in vitro*, resultaron en una generación de capilares *in vivo* en ratones con displasia broncopulmonar inducida, falta de capilares pulmonares, reducida al comparar con las ECFC de la microvasculatura materna de esas mismas placentas (Solomon et al., 2016). Cabe preguntarse, no obstante, si las ECFC de la parte materna de la placenta son representativas del comportamiento habitual de las células adultas, especialmente cuando el nivel de ECFC en circulación de las mujeres embarazadas aumenta significativamente (Elicha Gussin et al., 2002).

Cuando las células aisladas de sangre de cordón se exponen a radiación entran en apoptosis, mientras que las de adulto entran en senescencia. Asimismo, hay una serie de mRNA y miRNA cuya expresión tiende a diferir entre las líneas de estos orígenes, siendo el miRNA-31 un ejemplo característico que está sobreproducido en ECFC de cordón respecto a las de adulto. Cuando se induce este miRNA artificialmente en las células procedentes de adulto se mejoran los resultados de migración (Cheng et al., 2012).

El efecto de ECFC en la reparación y formación de vasos sanguíneos ha sido repetidamente mostrado en modelo de ratón con isquemia inducida, inyectando las células tanto en la zona afectada (Goto et al., 2016; Pesce, 2003) como en el flujo sanguíneo (Burger et al., 2015; Fan et al., 2010), en todos los casos las ECFC introducidas eran humanas sobre ratones desnudos. Debido a la baja proporción de las EPC en sangre no resulta práctico intentar obtener líneas de estos animales, llevando originalmente a dudas sobre su mera existencia en roedores, luego desmentido en ratas (Zhou et al., 2017) y ratones (Wang et al., 2015). En humanos se han logrado también mejoras con ECFC (Botham et al., 2013) y EPC (Tateishi-Yuyama et al., 2002), pero por el momento las mejorías, aunque consistentes, son limitadas (Möbius-Winkler et al., 2009).

### 5.3.1 Localización y Migración

A día de hoy se acepta la existencia de reservorios con ECFC en ciertas zonas arteriales (Yoder, 2012) y parece haber un reservorio en la zona pulmonar (Alphonse et al., 2015), pero la mayoría de las células en circulación por sangre periférica parecen ser reclutadas de un reservorio principal en la médula ósea (Goldstein et al., 2006; Prisco et al., 2014; Yoder, 2010), donde por el efecto de citoquinas proangiogénicas o inflamatorias se induce su reclutamiento y migración a sangre para alcanzar las zonas dañadas del endotelio (en la Figura 5 se muestra un resumen). Este reclutamiento sería fundamental a la hora de responder a un infarto (Premer et al., 2015). En el trabajo de Fadini et al. (Fadini et al., 2012) se observa que el nivel de ECFC circulantes en sangre en pacientes con riesgo de infarto decae progresivamente pero tiene un pico inmediatamente tras el infarto, aunque sin llegar al nivel de controles sanos.

La cantidad exacta de las ECFC que provendrían de cada fuente se encuentra en discusión. Lin et al. (Lin et al., 2000) observan que tras 9 días de cultivo el 6% de las EPC aisladas en pacientes con trasplante de médula provenían del donante y el resto eran del receptor. Pero tras 27 días de cultivo sólo restaban un 17% de células del receptor, las de donante habían crecido mucho más. Parecería que las EPC con capacidad proliferativa alta son las de médula mientras que las que quedan en los vasos están más diferenciadas o son las restantes de un proceso previo de migración y adhesión de las ECFC de origen en médula.

Diversos estudios indican que esta migración viene guiada por los ejes VEGFA/KDR y SDF-1/CXCR4 (Chavakis, 2005; Fan et al., 2010; Suh et al., 2005) aunque otros también participan en cierta medida, CXCR2, CXCR1, CCR5 o CCR2 y 5 (Balaji et al., 2013; Hou et al., 2015). Un reclutamiento que es especialmente importante en aquellos casos que requieren una reparación más intensa de los vasos sanguíneos: como es la remodelación ósea tras fractura (Kawakami et al., 2015), donde los ejes mencionados también promueven, por acción del NO interno, la inducción de metaloproteinasas para remodelar la matriz extracelular (Balaji et al., 2013); o la glomerulonefritis o trasplante de riñón (Rookmaaker et al., 2007) donde RANTES también parece tener un papel en reclutamiento de células EPC. Es de interés que otras células endoteliales no presentan la regulación sobre el receptor CXCR4 (Smadja et al., 2011) que sí presentan ECFC y otras EPC (Kawakami et al., 2015). Probablemente los diferentes ejes de señalización

mencionados cambian en importancia a la hora de reclutar ECFC a lo largo de la vida de las mismas conforme concluyen su maduración.

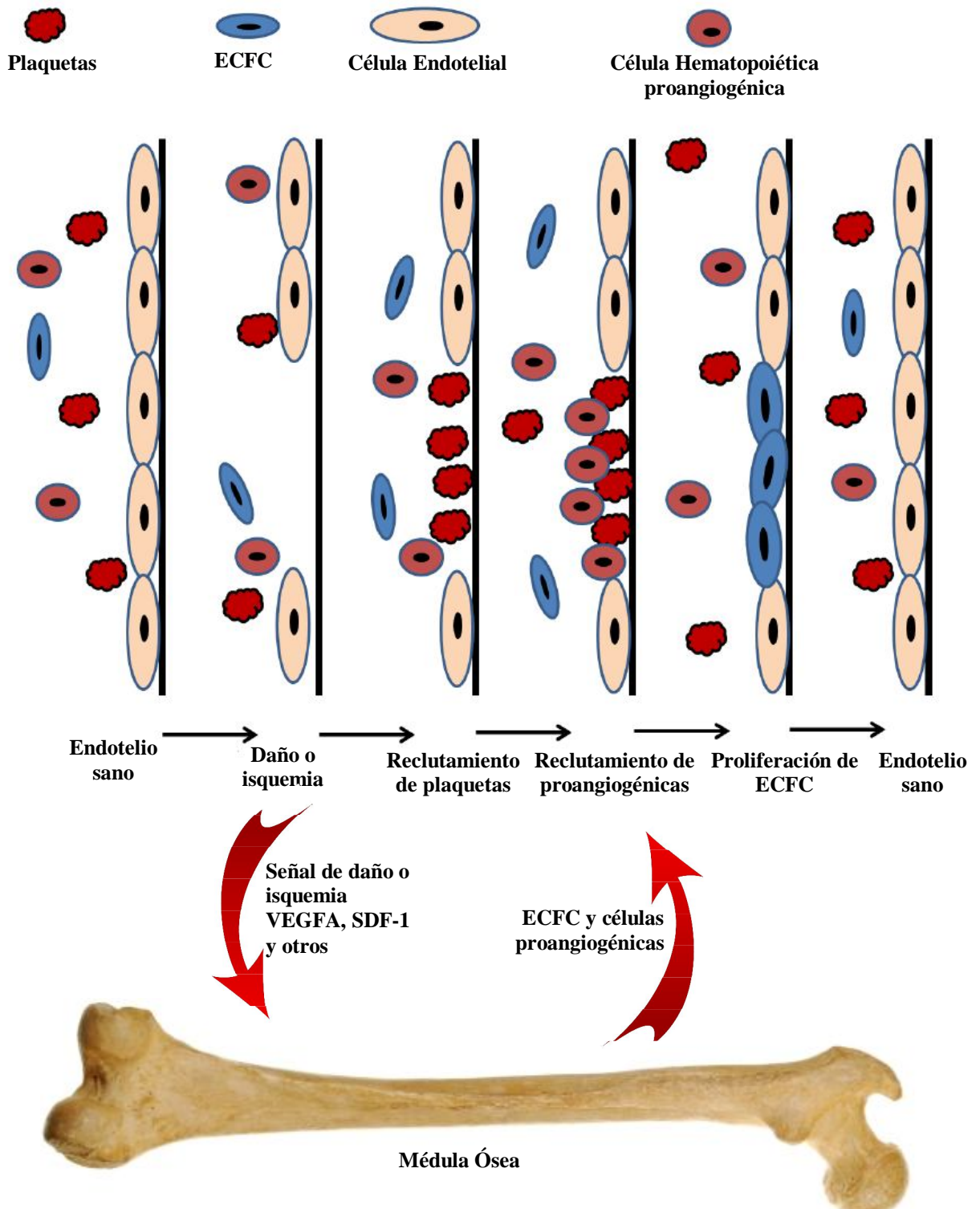


Figura 5: Mecanismo de reclutamiento y migración de las ECFC. Imagen de Salter 2014, modificada.



Estos ejes participan en el desarrollo de tumores, especialmente el CXCR2 según modelos murinos de cáncer pancreático, reclutando EPC (Li et al., 2011), por lo que se ha planteado su bloqueo mediante la unión a su dominio PDZ para el tratamiento de este tipo de cáncer (Hou et al., 2015).

Existe un estudio que indica la existencia de ECFC especializadas, clasificables según si expresan VEGFR1 vascular, receptor sensible a VEGF-A, o VEGFR3 linfático, receptor sensible a VEGF-C. Las células presentaban algunas diferencias génicas en los genes Wnt, Notch, Sonic, Id1 y 2 y prox1. Dado que las diferentes líneas se aislaron de muestras de un mismo individuo, esto daría pie a la posibilidad de la existencia de células preprogramadas para acudir a los diferentes endotelios del organismo (DiMaio et al., 2016).

A lo largo de la vida de las EPC, se ha observado que expresan diversas integrinas, de unión a médula ósea ( $\alpha4$  y  $\beta3$ ), de unión a zona donde se produce angiogénesis ( $\beta2$ ) (Chavakis, 2005) y de unión a matriz extracelular ( $\alpha3$  y  $\beta1$ ). Son por tanto capaces de reconocer las integrinas de células endoteliales y extravasar o bien la matriz que se expone en caso de herida o daño endotelial. Las diferentes conexiones probablemente afecten al repertorio de citoquinas que ellas a su vez generan (Balaji et al., 2013). Una maduración y migración que es acelerada por las citoquinas secretadas por las plaquetas adherentes, en proceso de reparación vascular (Langer, 2006), a las que las EPC se unen mediante las P-selectinas que expresan. En contraposición, las EPC parecen inhibir parcialmente la agregación plaquetaria, quizá como parte del proceso de regeneración de la vasculatura tras un daño tisular (Bou Khzam et al., 2015).

Señales de inflamación también inducen el reclutamiento de EPC. TNF $\alpha$  aumenta la proliferación y reclutamiento de las diversas EPC a la zona afectada, esto no va acompañado de un aumento de integrinas, sino una selección de aquellas de mayor afinidad. A pesar de que en otros tejidos el TNF $\alpha$  induce la proteína proapoptótica p55, en las EPC induce la vía del NF $\kappa$ B y supervivencia (Prisco et al., 2014), si bien hay trabajos que indican que la respuesta es variable entre líneas aisladas (Tasev et al., 2015). Esta respuesta contraria entre ECFC frente al TNF $\alpha$  parece deberse a que esta proteína se expresa en su forma transmembrana en el endotelio. La forma transmembrana une al receptor 2 con mayor afinidad que el receptor 1 que prioriza la forma soluble (Green et al., 2016). La respuesta que induce el receptor 2 es este crecimiento, siendo la respuesta del receptor 1 la que tiende más hacia la apoptosis. Las células de endotelio de zonas

ateroscleróticas pierden en gran medida la expresión de TNF $\alpha$  en su forma transmembrana, factor que dificulta la actuación de las ECFC.

El TNF $\alpha$  también ayudaría facilitando la adhesión de las ECFC al endotelio de los vasos por los que migran, al menos se ha visto con células HUVEC, efecto incrementado aún más en hipoxia 1% respecto a Normoxia 21% (Lewis et al., 2015).

Los estrógenos también inducen una proliferación aumentada de las ECFC por la ruta de las MAP quinasas, tanto *in vitro* como en injertos de tejido (Lee et al., 2014). Lo que se correlaciona con el aumento de ECFC observado en mujeres embarazadas (Elicha Gussin et al., 2002).

Por último, mencionar que las ECFC también tienen una importante presencia del receptor tipo toll 4 (TLR4), y una cierta presencia de TLR2, receptores que identifican la presencia de lipoproteínas de microorganismos infecciosos. La activación de TLR4 induce en estas células la síntesis de IL6, por lo que las ECFC, como otras líneas endoteliales, ayudarían parcialmente a hacer frente a las infecciones (Mazzucchelli et al., 2015).

### 5.3.2 Utilidad médica

Debido a la relación directa entre las enfermedades de afectación vascular y el nivel de ECFC presentes o reclutables se les suponen varias vías de utilidad práctica en medicina:

Se ha planteado un empleo de ECFC como marcador de prognosis en isquemia (Smadja et al., 2012) o riesgo cardiovascular (Fadini et al., 2012) dada la relación entre el riesgo cardiovascular y el nivel circulante de estas células. Un menor nivel de ECFC se relacionaría con un riesgo mayor de episodio cardiovascular (Fadini et al., 2012) e incluso se ha visto que niveles sanos de ejercicio pueden afectar al nivel de ECFC, presentando una posible relación causal del efecto cardioprotector del ejercicio (Rehman et al., 2004). El problema del bajo número de ECFC en circulación hace, no obstante, que para estos objetivos sea imprescindible observar el nivel de otras subpoblaciones además de ECFC como las CFU (Smadja et al., 2012). La cuestión vuelve a ser el procedimiento de detección. Según los marcadores seleccionados o sustancias medidas en citometría hay artículos donde se mencionan diferencias (Fadini et al., 2012; Smadja et al., 2011) y otros donde indican que no las hay (Campioni et al., 2013).

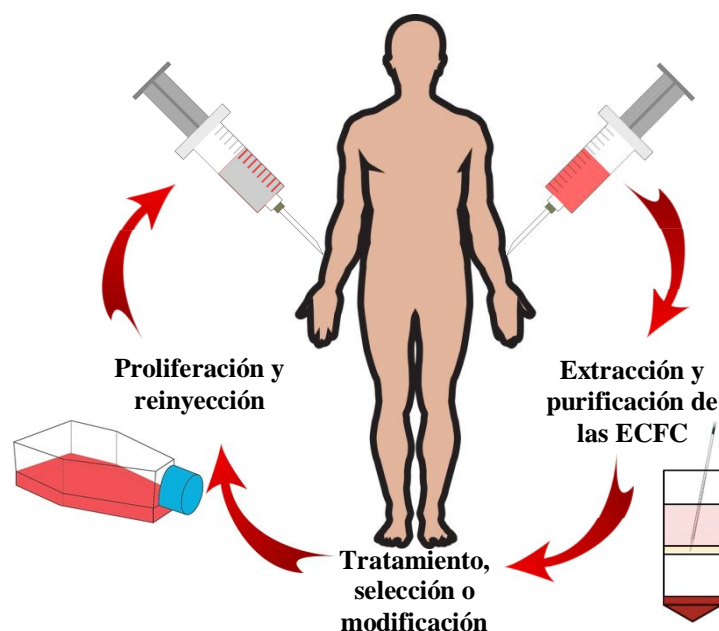
De forma contraria, las ECFC también serían útiles como prognosis para los casos de tromboembolismo venoso. En esta enfermedad, que afecta más a mujeres que a varones y suele derivar en trombosis venosa profunda o embolismo pulmonar, muestra un incremento en las ECFC aislables, cuyas colonias además aparecen antes en el aislamiento. Estas ECFC presentaban un funcionamiento en sus mitocondrias respecto a individuos sanos alterado, lo que deriva en un aumento de los ROS producidos (Alvarado-Moreno et al., 2016).

Por otra parte, las ECFC parecen tener un papel principal en la evolución de tumores agresivos. Su rápido consumo de nutrientes tiende a crear un ambiente hipóxico en su interior, promoviendo la emisión de hormonas como VEGFA o PDGF-2, reclutando EPCs. Influenciar sobre este reclutamiento, impidiéndolo, reduciría la agresividad de estos tumores (Collet et al., 2012). Incluso, dado que hay casos donde el propio tumor adquiere propiedades de endotelio y se entrelaza con ECFC, hay quien plantea tratamientos celulares con ECFC modificadas para que actúen como “caballo de Troya” dado que serían reclutadas hacia el tumor (Collet et al., 2016). Un control que también podría resultar beneficioso en otras patologías cuya fuente sea la angiogénesis excesiva. Se ha observado su participación, por ejemplo, en algunos casos de hipertensión pulmonar donde se genera un ambiente hipóxico en la zona pulmonar, se reclutan ECFC que remodelan los vasos pulmonares y puede derivar en problemas graves (Nijmeh et al., 2014).

Del mismo modo una promoción de estas células puede tener grandes aplicaciones en el tratamiento de problemas derivados de trasplantes donde un esfuerzo de intensa revascularización es necesario. Se ha probado a inyectar EPC humanas en ratones desnudos modelo de diabetes junto con isletas de células beta de páncreas de cerdo, mejorando mucho la producción de insulina con respecto al tratamiento con sólo células beta (Kang et al., 2012).

Por último, el planteamiento más claro es aquel relacionado con degradación del endotelio o insuficiencia de riego en un tejido. En los ejemplos por antonomasia, aterosclerosis e isquemia, se hace necesaria la sustitución del endotelio dañado en el primer caso o la generación de capilares en el tejido con falta de riego en el segundo. El objetivo final sería el desarrollo de un esquema de actuación similar al que se resume en la Figura 6. Las pruebas de formación de capilares *in vivo* han mostrado no obstante que de las ECFC inyectadas en los modelos sólo un porcentaje relativamente bajo acaba

formando parte de los nuevos capilares, un valor que varía mucho según los trabajos publicados y tejidos observados; 7.5% (Suh et al., 2005), 13% (Ott, 2005), 26.5% (Murayama et al., 2002), 29% (Pesce, 2003), si bien todas las variables consideradas de mejoría de la patología mejoran significativamente en la práctica totalidad de los trabajos (Kawamoto et al., 2001).



**Figura 6: Hipotético tratamiento celular en base a las ECFC.**

Se estima que uno de los principales problemas que las ECFC deben superar es adherirse a la zona dañada y comenzar una colonia. Apoyando esta posibilidad hay algunos trabajos en los que el resultado mejora cuando las ECFC se introducen inmersas en un hidrogel con base de ácido hialurónico que facilita este proceso (Gaffey et al., 2015). Se ha propuesto incluso que estos geles se creen con factores o directamente tratar el área dañada para reclutar las ECFC autólogas, bien afectando al eje SDF1/CXCR4 o con E-selectinas solubles diluidas en la matriz (Musilli et al., 2015; Williams and Silva, 2015). La concentración, tipo y lote de la matriz introducida afecta sensiblemente al número y tamaño de los vasos generados (Critser et al., 2010). Se ha planteado, incluso, el desarrollo de matrices de colágeno autólogo modificado *ex vivo* para reducir el riesgo de rechazo, donde la presencia de MSC junto a las ECFC ayuda a la supervivencia de las células introducidas (Kuo et al., 2015).

No obstante, el uso de las ECFC propias del paciente puede no ser aplicable a muchos casos, dado que se ha observado niveles reducidos de estas células en diabetes (Bitterli et

al., 2015), enfermedad arterial periférica (PAD) (Smadja et al., 2011), y aterosclerosis (Zhang et al., 2015), aunque no es una observación generalizada (Stroncek et al., 2009). Lo que es más, otros estudios indican que en las enfermedades mencionadas, las ECFC restantes se encuentran impedidas para cumplir apropiadamente su función (Fadini et al., 2012). Se ha observado que las EPC de pacientes de diabetes mellitus, debido a un estrés oxidativo aumentado, presentan una menor cantidad de receptor de bradiquinina, lo cual deriva en un incremento de la p53 proapoptótica (Fu et al., 2015).

Efecto extensible también a otras de las subpoblaciones mencionadas de EPC (Tepper, 2002), que también se reducen sensiblemente y pierden adhesión a las zonas dañadas y aumentan su senescencia (Ye, 2015). Esto también ocurre en otras subpoblaciones celulares de función relacionada. Premer et al. (Premer et al., 2015) prueban a tratar pacientes con fallo cardíaco con células madre mesenquimales autólogas o alogénicas, donde sólo el segundo grupo mejoró tras tres meses de tratamiento.

En modelo de ratón de aterosclerosis se reduce el nivel de las ECFC, su capacidad migratoria y la expresión de Stim1, Orai1 y TRCP1, relacionados con el transporte de calcio y dando a entender una relación entre este ión y la actividad terapéutica de las ECFC (Wang et al., 2015). En pacientes de PAD se registró un alto nivel de trombospondina-1 que provocaba una reducción en la capacidad proliferativa de las ECFC y de la expresión del eje SDF-1/CXCR4 (Smadja et al., 2011). Todo ello obliga a una modificación *in vitro* de las células o bien la selección de poblaciones sanas o especialmente proliferativas, como la conservación preventiva de las ya mencionadas HPP-ECFC a partir de la sangre de cordones de neonatos. Se han observado ya mejorías en pruebas de laboratorio con EPC tratadas con el gen Sonic Hedgehog, con el compuesto AMD3100, antagonista de CXCR4, o con modificaciones génicas para la serin-proteasa calicreína tisular, o tratadas con estatinas, adiponectina, timosina  $\beta$ 4 (T $\beta$ 4), losartan, aliskiren, GTP ciclohidrolasa I, o ephrin-B2/Fc (Ye, 2015), o bien transducidas con el gen de la integrina  $\beta$ 1, lo que facilita la adhesión a la matriz extracelular, como se ha indicado antes (Goto et al., 2016). Parecen obtenerse también mayor número de ECFC seleccionando aquellas que expresen la forma transmembrana de TNF $\alpha$ , promotora de la proliferación (Green et al., 2016).

Irónicamente, a pesar de las medidas que indican una pérdida del número y capacidad de las EPC, la diabetes cursa con un importante aumento de los capilares en el ojo que deriva en retinopatía diabética y pérdida de visión. Capilares que alcanzan hasta un 26.5% de

presencia de EPC en modelos de ratón (Murayama et al., 2002). Un detalle de la enfermedad aún por dilucidar.

En muchos casos de pacientes con deficiencias genéticas o epigenéticas, éstas se mantienen en las líneas derivadas de estas personas. Aplicando procedimientos de diferenciación a EPC a partir de células madre pluripotentes usando células madre inducidas (iPSC) de diferentes individuos se ha observado que aquellos donantes que padecían sobrepeso daban lugar a EPC derivadas con una capacidad vasculogénica menor (Yoder, 2015).

En cualquier caso, dado el bajo número de ECFC obtenidas a partir de una muestra de sangre se hace imprescindible una fase de amplificación previa a su aplicación, se aplique previamente una selección o modificación o no. Lo que da una importancia especial al crecimiento *in vitro* de estas células.

Por su mecanismo de acción, conformando por sí mismas nuevos vasos o reparando los preexistentes, las ECFC se contemplan como la hipotética base idónea para el desarrollo de futuras nuevas terapias contra las patologías que afectan al endotelio vascular. El principal problema a sobrepasar es, de nuevo, su bajo número en sangre circulante.

Como solución alternativa al bajo número de ECFC circulantes se ha planteado el uso de selecciones menos exigentes. Es decir, recurrir al empleo de todas las poblaciones de EPC mencionadas. Todas ellas comparten el marcador CD34, siendo por tanto seleccionables con una cierta facilidad. Este planteamiento es más sencillo y es efectivo, dado que los diferentes tipos de células juegan papeles sinérgicos (Duong et al., 2011). Pero tiene el riesgo, observado en modelos de isquemia en ratón, de derivar en procesos inflamatorios contraproducentes (Pesce, 2003).

Este efecto inflamatorio resulta especialmente grave en ciertas patologías como es la lesión renal aguda, donde una selección más específica puede resultar imprescindible. Se ha planteado escoger concretamente la fracción CD133- o sus exosomas (enriquecidos en miR-486-5p), lo que mejora los síntomas de esta patología en ratones (Burger et al., 2015; Viñas et al., 2016). A pesar de que muchos trabajos indican que las ECFC sí expresan CD133 es posible que lo pierdan rápidamente conforme se inicia el proceso de maduración.

En estudios de pacientes con tratamientos autólogos de médula ósea se ha visto desde hace tiempo mejoras en la generación de vasos sanguíneos, proceso en el que participan multitud de poblaciones, progenitoras y pluripotentes (Tateishi-Yuyama et al., 2002).

### **5.3.3 Crecimiento *in vitro* de las Células Formadoras de Colonias Endoteliales**

Como se ha indicado, la mayoría de usos terapéuticos de las ECFC pasan por un crecimiento o modificación *in vitro* de las mismas. Buscando esto se han planteado métodos para intentar acelerar el crecimiento *in vitro* de las ECFC mediante diversas aproximaciones. Bien modificando los protocolos de cultivo (Hofmann et al., 2009; Reinisch et al., 2009), incluyendo glicosaminoglicanos a la matriz sobre la que se crecen las células (Chevalier et al., 2014), o realizando un cocultivo (Wu et al., 2012) con otras MNC. Incluso se ha observado que existe un efecto positivo fraccionando otros extractos de la sangre del mismo paciente del que se pueden obtener las ECFC. Parece que un lisado de plaquetas resulta ventajoso frente a suero o plasma (Tasev et al., 2015). Esto tiene especial interés si se logra minimizar el uso de reactivos de origen animal que puedan resultar en reacciones de rechazo. Otro estudio indica que esta mejoría se debe a la presencia de la tetraspanina CD151 en las plaquetas, por unión a la integrina  $\alpha 6\beta 1$  y activación de la ruta de la fosfoinositol 3-kinasa (Huang et al., 2016).

Se debe considerar no obstante si un crecimiento acelerado haría perder la capacidad reparadora de las ECFC. En varios trabajos (Patel et al., 2016; Tasev et al., 2016) mencionan que es necesario que conserven el marcador CD34 para mantener óptimas su aptitudes, lo cual logran en sus reservorios naturales en la médula ósea por efecto del gen señalizador Notch. El primero de estos estudios asegura que la pérdida de CD34 es un proceso irreversible que aumenta la proliferación, mientras que el segundo sostiene que el proceso sí es reversible y sin distinción de capacidad proliferativa. Ambos coinciden en la importancia de la presencia de CD34 en la capacidad de formar colonias. Asimismo hay estudios que indican que en los países más tardíos los telómeros se acortan sensiblemente con las duplicaciones de las ECFC (Tasev et al., 2015).

Así pues, no basta con determinar la proliferación de las células, sino sus propiedades angiogénicas. De forma general, para determinar si un cultivo de ECFC mantiene su utilidad terapéutica una vez lleguen las células a la zona de actuación (adhiriéndose y creciendo para ayudar a generar vasos sanguíneos) se vienen usando diversas pruebas:

- Capacidad clonogénica; se trata de sembrar ECFC de forma individual para a continuación ver si se forma una colonia y cómo de grande.
- Formación de estructuras tubulares; sembrando las células sobre una superficie cubierta por matriz de la membrana basal del tumor Engelbreth-Holm-Swarm, de mayor similitud a la matriz extracelular presente in vivo, células de múltiples líneas presentan comportamientos diferentes al cultivo habitual. En el caso de aquellas de naturaleza endotelial esto se traduce en la generación de estructuras características en forma de red, con huecos, reminiscentes de una red capilar. Sólo las ECFC (de otras EPC) serían capaces de formar estas estructuras (Sieveking et al., 2008).
- Medidas de viabilidad; determinando niveles de apoptosis en el cultivo, senescencia y porcentaje de células que desarrollen el ciclo celular.

Diversos estudios (Cipolleschi et al., 1993; Hou et al., 2015; Lee et al., 2015; Minami et al., 2015; Patel et al., 2016; Smadja et al., 2011; Solomon et al., 2016; Tepper, 2002) emplean estas pruebas con este propósito sobre las ECFC. Smadja et al. (Smadja et al., 2007) encuentran que una expansión de varios pases de ECFC únicamente modifica la expresión de VEGFR2, lo cual sólo afectaría a su migración, no a su proliferación. Esto iría en contra de la función conocida de VEGFR2, pero las ECFC *in vitro* podrían madurar y perder capacidad proliferativa en general.

## 5.4 Tensión de Oxígeno

El oxígeno es un gas que utilizan los seres vivos como fuente de poder oxidante para empujar la cadena de transporte electrónico en la mitocondria y así generar un gradiente de protones que posteriormente se aprovecha para generar ATP, de alto contenido energético, necesario para que las células lleven a cabo sus funciones básicas. En los organismos superiores el oxígeno es adquirido del aire a través de los pulmones y transportado al resto del cuerpo por la sangre.

El oxígeno en condiciones normales se encuentra en fase gaseosa y se disuelve en pequeña concentración en las diluciones acuosas. Por lo tanto, la forma más cómoda e inmediata de indicar la cantidad de este gas es por su concentración en el aire que se encuentra en contacto con el líquido. La atmósfera presenta una composición del 78%



nitrógeno (N<sub>2</sub>), un 21% de oxígeno, (O<sub>2</sub>), y una mezcla de muchos otros gases en cantidad minoritaria. Debe tenerse en cuenta, no obstante, que esta forma de hablar de la concentración de oxígeno en el aire, muy común, tiene en realidad una correlación pobre con la cantidad que se encuentra presente en el seno del líquido. La cantidad real depende de múltiples variables; temperatura, volumen, grado de agitación, presencia de compuestos químicos y, en el caso que nos ocupa, presencia de células que lo vayan consumiendo conforme se disuelve y generen un gradiente.

Cuando el oxígeno en la fase gaseosa ronda esa concentración del 21% se habla de Normoxia atmosférica. A concentraciones menores se le denomina hipoxia atmosférica. Debido al complejo circuito que debe seguir este gas por el organismo, lo que perciben los tejidos de un organismo vivo habitualmente, la Normoxia biológica, supone una concentración bastante menor a la Normoxia atmosférica. La Normoxia biológica además es un valor que varía de unos tejidos a otros debido a su función y localización concreta. Ejemplos extremos serían el epitelio de la piel, expuesto prácticamente a la concentración atmosférica y que no necesitaría oxígeno proporcionado por irrigación sanguínea (Stücker et al., 2002), frente a la médula ósea que equivaldría a tener una concentración atmosférica del 2-3% (Spencer et al., 2014). Debido a estas desviaciones se toma como Normoxia biológica a un valor cercano al equivalente a tener un 5% de oxígeno en aire y a aquellos tejidos con una concentración fisiológica inferior se les denomina naturalmente hipóxicos.

Asimismo, mencionar que hay muchos trabajos donde no miden el oxígeno como concentración presente en una mezcla, sino que proporcionan cifras de presión parcial de oxígeno. La suma de todas las presiones parciales de todos los gases resulta en la presión total, por lo que se puede calcular la presión parcial a que corresponde una concentración dada de oxígeno al multiplicar ese valor por la presión total, que suele ser de una atmósfera (atm). No es extraño encontrar estos valores en pascales (Pa), unidad de presión del sistema internacional, o milímetros de mercurio (mmHg), unidad histórica de medida de presión. La equivalencia es  $1 \text{ atm} = 101.325 \text{ Pa} = 760 \text{ mmHg}$ .

#### **5.4.1 Tensión de oxígeno *in vivo***

El oxígeno es un reactivo fundamental en multitud de reacciones del metabolismo celular. Especial interés tiene en nuestro caso la síntesis de NO por la eNOS en células

endoteliales, que actúa como mensajero químico. Además el NO reduce el consumo de O<sub>2</sub> por parte de las células endoteliales (Zhdanov et al., 2010).

La sangre es el medio en el que se transporta el oxígeno. Dada su baja solubilidad en este medio, 5 µLO<sub>2</sub>/mL, (como ocurre en la mayoría de medios acuosos) se almacena en su mayor parte, hasta el 98%, en forma de oxihemoglobina, una proteína de transporte que se acumula en el interior de los eritrocitos. El oxígeno en la hemoglobina tiende a unirse o soltarse dependiendo de multitud de factores (pH, temperatura, presencia de competencia como CO o CO<sub>2</sub>) que suelen coordinarse permitiendo captar más en los alvéolos y cederlo posteriormente. Para facilitar el proceso los eritrocitos tienen una alta relación superficie/volumen.

A pesar de este reservorio, el transporte de oxígeno desde el interior del flujo sanguíneo depende principalmente de la concentración de oxígeno disuelto, su concentración parcial suele variar desde los 90 mmHg al salir de los pulmones hasta los 60 mmHg en las inmediaciones de los tejidos y llega a 25 mmHg en vena cava, según medidas directas sobre muestras de pacientes en (Allen and Bhatia, 2003).

El gradiente pulmón/sangre es de 50 mmHg/micra mientras que el capilar/tejido es de 0.5 mmHg/micra (Tsai A.G. 2006). A pesar de sus bajos requerimientos energéticos, la propia pared vascular tiene un cierto consumo de oxígeno. Tsai et al (Tsai et al., 2006) indican que este consumo es alto, pudiendo alcanzar hasta aproximadamente un tercio del cedido, debido a que produce diversos compuestos a partir de aquél, NO, prostaglandinas, colágeno, etc. Sin embargo en Pittman (Pittman, 2011) indica que se trata de un error de metodología y que su consumo es similar al de células musculares en reposo. No se considera en cualquier caso que el endotelio sea una traba a la cesión de oxígeno por parte del seno del flujo sanguíneo al tejido circundante.

La cantidad de oxígeno capaz de ser cedida en sangre se acerca a la total, ya que éste no se distribuye por su seno mediante difusión sino por convección, según diversas modelizaciones del mismo (Coppola and Caro, 2008; Fedosov et al., 2010). Para ello las paredes de las arterias presentan irregularidades que aumentan la viscosidad efectiva de la sangre y una estructura helicoidal que promueve su mezclado. El modelado de la sangre es, no obstante, muy complejo ya que no es una solución homogénea y su comportamiento como fluido es no newtoniano. El hematocrito baja algo en la zona

interna de las curvas en arterias habiendo por lo tanto una ligera hipoxia, lugares donde suelen iniciarse los problemas de aterosclerosis (Biasetti et al., 2014).

Se ha observado que el traspaso de oxígeno desde la sangre hacia los tejidos tiene lugar en su mayor parte, hasta dos tercios del total, en las arteriolas aunque es posible que los capilares cercanos capten parte de ese oxígeno para redistribuirlo a una zona más amplia (Pittman, 2011).

En la médula ósea por regla general se alcanzan valores excepcionalmente bajos. Debido a la dificultad de realizar estas medidas, no obstante, el valor concreto varía sensiblemente entre trabajos. Harrison et al. (Harrison et al., 2002) miden 54.9 mmHg en muestras frescas ex vivo humanas, pero Spencer et al. (Spencer et al., 2014) llegan a medir in vivo por fluorescencia en ratas valores de 20 mmHg. La hipoxia, por vía de HIF1 es necesaria para la generación y regulación de las células madre y de las progenitoras hematopoyéticas que residen en la médula (Toussaint et al., 2011) probablemente para evitar el efecto de ROS, (Imanirad et al., 2014). Sin embargo, se ha observado que pequeños grupos de células madre siguen apareciendo en ratones KO condicionales para HIF en células endoteliales, dando a entender que ciertas líneas progenitoras poseen otras vías de respuesta a hipoxia. Ivanovic (Ivanovic, 2009) va más allá y asegura que la intensidad de la respuesta de las células madre frente a las citoquinas varía según el oxígeno disponible, cuya concentración sitúa entre un 0 y un 4% por modelización del tejido. Desde hace tiempo se acepta que el nivel de pluripotencia en los reservorios de células madre en la médula ósea está directamente relacionada con la hipoxia presente, entendiéndose que, de forma general, a menor oxígeno disponible menor proliferación pero mayor pluripotencia (Cipolleschi et al., 1993). Una relación que no tiene por qué mantenerse en otros tejidos, sólo en la médula como reservorio natural de las células madre.

En modelo de isquemia femoral en ratón se observa un aumento de las EPC circulantes y una mejora en la cicatrización de heridas dirigida por la producción de NO en la zona afectada cuando los animales eran sometidos a tratamiento con oxígeno a alta presión (Goldstein et al., 2006). Esto da a entender que, de forma localizada, la tensión de oxígeno baja induce la generación de citoquinas que provocan una respuesta en todo el organismo.

## 5.4.2 Tensión de Oxígeno en Cultivos Celulares

Típicamente en Biología Celular se ha utilizado la presión de oxígeno de una atmósfera enriquecida en CO<sub>2</sub> como Normoxia. Eso supone aproximadamente un 20% de oxígeno, 150-160 mmHg, que es muy superior al fisiológico. Sin embargo, no todo ese oxígeno es capaz de alcanzar las células, ya que es muy poco soluble en los medios de cultivo de base acuosa (8 mgO<sub>2</sub>/L como máximo), y de esa cantidad no todo llega a entrar en contacto con las células, ya que éstas lo van consumiendo en el fondo del frasco del cultivo creándose un gradiente desde la superficie del medio donde se va disolviendo el gas y las inmediaciones de las células.

El problema se complica aún más porque cada tipo de célula tiene, debido a sus funciones, un consumo diferente de oxígeno (suponiendo una misma disponibilidad). Este consumo, a su vez, varía con la confluencia que las células en las condiciones testadas sean capaces de alcanzar. Por ejemplo, la línea tumoral T47D con alto consumo, da las siguientes medidas de concentración de oxígeno: 19% en el aire, 17% en la superficie del medio y sólo lo que equivaldría a un 8% en las cercanías de las células en el trabajo de Pettersen et al (Pettersen et al., 2005). Kieninger et al. (Kieninger et al., 2014), en cambio, dan cifras de hasta un 4% entre las células. Metzen et al. (Metzen et al., 1995) modelizan el comportamiento de aorta de vaca y determina que el consumo de células endoteliales de aorta bovina es de  $4.0 \pm 0.7 \text{ nmol} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg prot} \times \text{cel}^{-1}$ , lo que supone que de los 143 mmHg de oxígeno (19%) que hay en el aire las células endoteliales sólo entran en contacto con 73 mmHg (9.6%).

A pesar de los gradientes formados la concentración de oxígeno a la que se exponen los cultivos sigue siendo sensiblemente superior a la fisiológica. En un intento por disponer de valores más próximos a los fisiológicos, un procedimiento habitual en biología celular es cultivar células en incubadores cuya atmósfera además de estar enriquecida en CO<sub>2</sub> se encuentra disminuida en oxígeno. Para lograrlo es muy empleado el desplazamiento del oxígeno en los incubadores mediante inyección de nitrógeno gas. El N<sub>2</sub> es prácticamente inerte y no afecta al comportamiento celular. El problema es que esto requiere de la adición a las estufas de otro sistema de bombas y sensores, así como de una fuente considerable de este gas que debe desplazar al oxígeno presente, todo ello aumentando mucho los costes de mantenimiento. Mediante esta metodología se pueden alcanzar

niveles de oxígeno desde un 10% hasta un 1%. Esta metodología, no obstante, dista de ser perfecta.

Un problema es que resulta necesario retirar de la incubadora la placa de cultivo (salvo que se trabaje en una campana hermética de la que pocos laboratorios disponen) para poder manejarla, lo que expone el cultivo a una concentración atmosférica por lo que la hipoxia no es constante.

Además, debido al bajo ritmo de transporte de oxígeno entre las fases líquida y gaseosa se tardan varias horas en equilibrar el interior del medio de cultivo con la atmósfera de trabajo. Según el estudio realizado en placas sin células por Allen et al. (Allen et al., 2001) los frascos que habitualmente se utilizan en Biología Molecular con una cantidad normal de medio tardan alrededor de 3 horas en alcanzar un grado de hipoxia razonable. Este hecho impide apreciar, si las hay, reacciones rápidas ante una hipoxia repentina por este método. Estudios similares con presencia de células resultan confusos, dando valores que son sensiblemente menores, 75min (Chen et al., 2013) o mayores, entre 5 y 10 horas (Kieninger et al., 2014). Probablemente el tiempo de estabilización dependa de forma importante del consumo de oxígeno por parte de las células en cultivo, lo cual a su vez depende de la línea y la confluencia.

De otros trabajos se deduce que otra variable tiene una importancia aún mayor, el grosor de la capa de medio. Utilizando varias veces más medio que en las otras medidas, el tiempo requerido para la estabilización asciende a 12 o 16 horas (Abaci et al., 2010; Newby et al., 2005), otros han llegado a modelizar esta relación matemáticamente (Zhdanov et al., 2010). Es decir, que un formato de placa de cultivo que permita el uso de una capa más estrecha de medio entre las células y el aire permitirá reducir estos tiempos.

De la multitud de valores diversos disponibles en la bibliografía queda claro que la concentración real a la que se exponen las células y el tiempo que tarda el sistema en alcanzar el equilibrio depende de multitud de variables, algunas no modificables como son el metabolismo basal de la línea trabajada o un grosor mínimo de medio a añadir sobre las células. En la Figura 7 se muestra una recopilación de estas variables. No obstante, dadas las limitaciones materiales a la hora de solventar estos problemas, el uso de estufas de oxígeno controlado es el más común en biología celular.

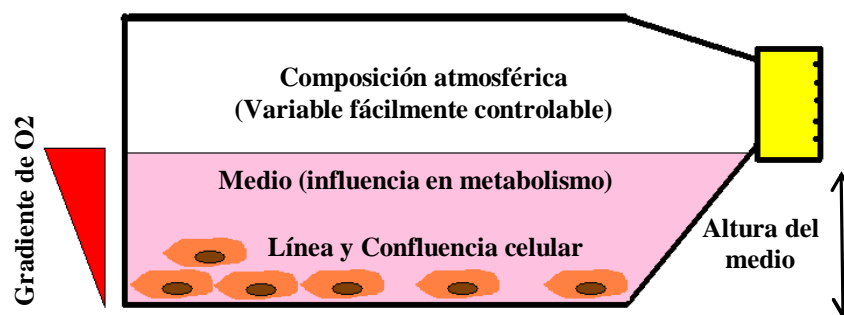


Figura 7: Variables que afectan al nivel de O<sub>2</sub> en cultivo.

De interés es que, de acuerdo a Subczynski et al. (Subczynski et al., 1992), la membrana celular en ningún caso supone un impedimento a la distribución o captación de oxígeno por parte de las células, pudiendo el gas atravesarla libremente.

### 5.4.3 Respuesta a Hipoxia

La necesidad del estudio de la hipoxia radica en que el comportamiento de las células cambia considerablemente cuando se encuentran con una cantidad de oxígeno diferente a la habitual, comenzando por regular el consumo propio del gas y la proliferación, pero modificando también la expresión proteica y en algunos casos incluso el grado de diferenciación. Hay casos en que el comportamiento real puede quedar enmascarado por una cantidad de oxígeno superfisiológica con la Normoxia atmosférica. Por ejemplo en los hepatocitos, cuyos requerimientos mínimos de oxígeno son extraordinariamente bajos, la disponibilidad de oxígeno se relaciona con la posición relativa entre venas porta y cava y por lo tanto cambia considerablemente el comportamiento para poder cumplir con todas las funciones del hígado (Allen and Bhatia, 2003).

El principal regulador de la respuesta frente a hipoxia es la familia de factores inducibles en hipoxia (HIF). Esta familia está compuesta por tres subunidades alfa (120 KDa), la 1 ubicua en las células de mamífero y las 2 y 3 específicas, que unen una beta (91-94 KDa), también llamada ARNT, para actuar como factor de transcripción. Varios ciclos de retroalimentación regulan finamente la extensión de la respuesta a hipoxia, distinguiendo entre la respuesta puntual aguda y una respuesta más comedida ante una situación que se cronifica. Una regulación compleja en la que parecen intervenir las diferentes versiones de la subunidad alfa de HIF (Koh and Powis, 2012). HIF-1 $\alpha$  se expresa también en algunos tejidos en Normoxia o frente a otros tipos de estrés. En cerebro, por ejemplo,

tiene relación con los ciclos circadianos. El principal mecanismo por el que esta proteína se regula es el siguiente:

La subunidad  $\alpha$  posee en su posición 402 y 564 aminoácidos de prolina en los cuales actúan prolil-hidroxilasas (PHD) (Ke and Costa, 2006). De las 3 PHD participantes (PHD1, 2 y 3), la 2 es la más importante y sobre cuyo promotor actúan hormonas para adaptarse a medios hipóxicos, como el factor de crecimiento transformante  $\beta$ 1 (McMahon et al., 2006). El papel de los otros PHD tiene más que ver con evitar que el pico de HIF dure más de lo imprescindible. Estos PHD introducen grupos hidroxilo, los cuales generan un punto de unión de la proteína Von Hippel-Lindau. Sobre el complejo que ofrecen ambas proteínas se puede unir la enzima ubiquitín-transferasa añadiendo una cadena de ubiquitinas, cadena que señala la degradación del conjunto en el proteasoma.

Todo este proceso de degradación viene regulado porque el primer paso, de hidroxilación, requiere de la participación de 2-oxoglutarato como coenzima y oxígeno libre,  $O_2$ , como reactivo. De esta forma, si la disponibilidad de oxígeno se reduce entonces la reacción no tendrá lugar, HIF1 $\alpha$  se estabilizará y tendrá oportunidad de actuar como factor de transcripción.

Cuando comienza a acumularse HIF1 $\alpha$  sufre una fosforilación, probablemente sobre la treonina 796 (Ke and Costa, 2006; Wenger, 2002). La subunidad es transportada al interior del núcleo celular por los poros nucleares, donde se encuentra la subunidad beta almacenada. Ambas subunidades se unen para formar el complejo activo, éste ya sí con actividad de factor de transcripción. El factor se une a las secuencias de DNA promotoras de respuesta a hipoxia. La respuesta exacta dependerá de la línea celular, siendo habitual la sobreexpresión de proteínas de la glucólisis como GLUT-1, de regulación del ciclo como p53 y en tejido endotelial hormonas proangiogénicas como VEGFA, Eritropoyetina (EPO) o el factor de crecimiento fibroblástico 2 (FGF2), receptores como CXCR4, CRR7 o CRLR, integrinas de adhesión, metaloproteinasas y el gen TWIST, necesario para producirse en un tumor la transición epitelio-mesenquimal. En médula ósea HIF1 con Notch mantiene la pluripotencia de las células madre, y HIF2 induce el gen de pluripotencia Oct4 (Liu et al., 2012). De ahí que este tejido sea especialmente hipóxico.

Sin detrimento del mecanismo explicado, trabajos más recientes indican que el nivel de HIF1 $\alpha$  también es regulado al nivel transcripcional mediante diversos mecanismos que varían entre tejidos (Minet et al., 1999). En cerebro EPO aumenta la transcripción de

HIF1 $\alpha$  (Gorlach, 2009), en epitelio la proteína tristetraprolina reduce su expresión (Chamboredon et al., 2011). De forma general la proteína factor silenciador de la transcripción en elemento represor 1 (REST) se encarga de reducir la transcripción de HIF1 $\alpha$  en largos periodos de hipoxia (Cavadas et al., 2016). En general la respuesta frente a hipoxia tiene multitud de ciclos regulatorios dando como resultado un aumento rápido del factor a nivel de proteína con una bajada progresiva del mRNA. Bajada que se acelera si la hipoxia persiste (Chamboredon et al., 2011). El pico en el aumento de los genes cuya transcripción es inducida suele producirse entre 30 min y 2 horas (Zhdanov et al., 2015), aunque depende de la línea empelada.

Aparte de HIF1 $\alpha$  existen otros mecanismos de respuesta a hipoxia. McCartney et al. (McCartney et al., 2005) indican la existencia de un canal de potasio sensible al calcio que se cierra ante una hipoxia no fisiológica. La mitocondria también es capaz de detectar el nivel de O<sub>2</sub> por su implicación en la cadena de transporte electrónico. La cadena funciona de forma parcial en la producción de ATP, hasta prácticamente anoxia, y al bajar la cantidad de oxígeno se aumenta la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS). Gracias a la superóxido dismutasa (SOD) la principal de estas especies acumuladas es el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Esta especie es capaz de atravesar libremente la membrana mitocondrial y actúa como señalizador intracelular, entre otras respuestas induciendo una reducción en el consumo de ATP (Guzy and Schumacker, 2006).

Ante una hipoxia no fisiológica se produce una falta de la coenzima tetrahydrobiopterina, por lo que la enzima eNOS pasa a producir ROS, con las funciones de señalización comentadas. Estas especies inestables reducen además el nivel de NO, afectando a la señalización habitual de este compuesto (Michiels et al., 2000).

Otro mecanismo digno de mención es la traducción alternativa del mRNA. La elección de iniciar la traducción en el inicio del mRNA incluye una serie de proteínas que en algunos casos pueden venir influidas por la disponibilidad de oxígeno. Es el caso de la FGF2 en células de la dermis, donde hay dos estructuras posibles según la traducción se inicie al comienzo del mRNA o por un sitio interno de entrada al ribosoma. Esta segunda posibilidad incrementa la cantidad de FGF2 producida en los primeros momentos de un episodio hipóxico a pesar de producirse simultáneamente una reducción del mRNA para este factor (Conte et al., 2008).



La respuesta exacta frente a la hipoxia, incluso intermitente, varía de tejido en tejido; normalmente por participación de ciertas citoquinas en rutas metabólicas que acaban afectando a los promotores de traducción o transcripción. Como es el caso del FGF2 sobre HIF1 en células de piel de ratón (Conte et al., 2008), o en cerebro donde se ve implicada la ruta de PP2A que reduce ERK-1/2 (Chen et al., 2014). Pero hay otros mecanismos, en EPC también acaba produciendo modificaciones epigenéticas aumentando la expresión de eNOS, KDR, VE-caderina y vWF así como de la demetilasa Jmjd3 causante de estos cambios (Ohtani et al., 2011). Cambios no observados en HUVEC. Lo habitual es que la respuesta a la larga sea patológica dado que la mayoría de tejidos deberían mantener un cierto nivel de oxígeno disponible.

Un detalle derivado de la hipoxia que en ocasiones no se tiene en cuenta es el amplio rango de genes y proteínas sobre los que afecta. Esto es especialmente importante a la hora de realizar ciertas medidas, como la técnica de PCR a tiempo real para determinar la expresión génica, porque requiere de genes que actúen como control interno entre las condiciones testadas. Así pues, de los habituales muchos pasan a no ser apropiados, como el gen de la gliceraldehído -3- fosfato deshidrogenasa (GAPDH) que pertenece a la ruta de la glicolisis. Se hace necesaria la búsqueda de alternativas, como el gen de la proteína ribosomal P0 (RPLP0), que permanece constante en HUVEC en hipoxia (Bakhashab et al., 2014).

#### **5.4.4 Inductores Químicos de Hipoxia**

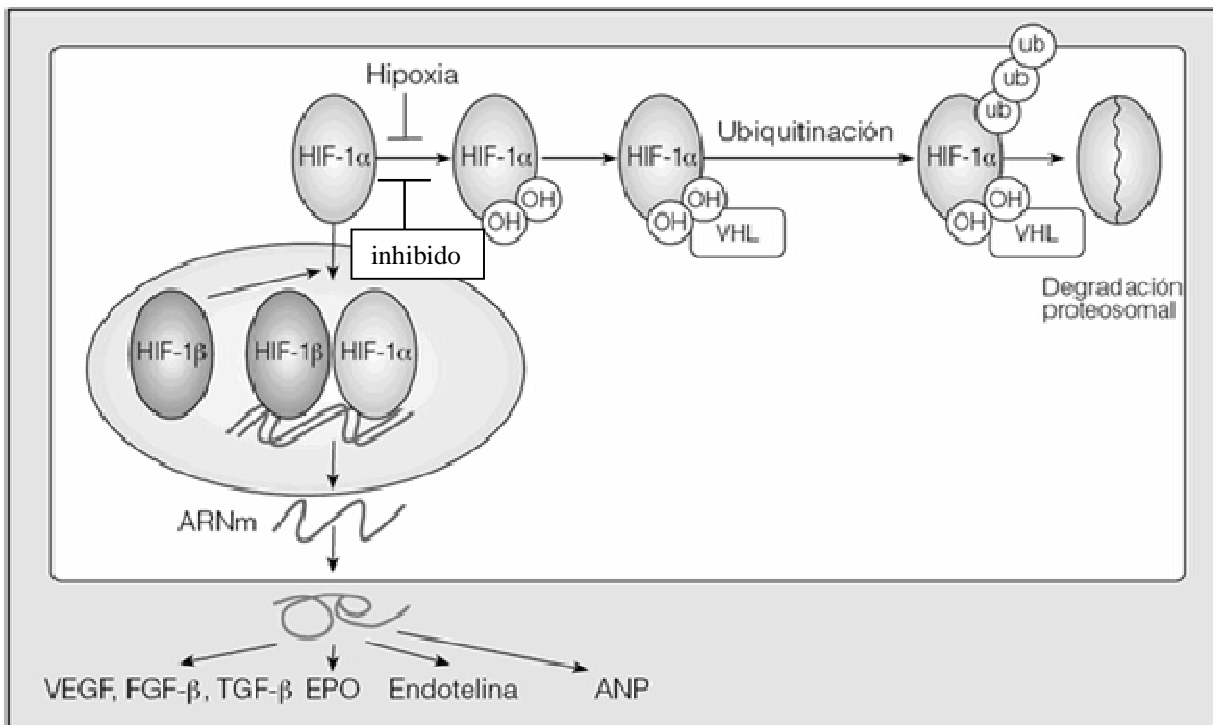
Como se ha comentado, el estudio *in vitro* de la respuesta frente a hipoxia presenta dos complicaciones importantes; su dificultad técnica que eleva costes, así como problemas a la hora de discernir respuestas rápidas debido a lo que se tarda en estabilizar el oxígeno disuelto en el medio de cultivo. Como solución, diversos trabajos recurren al uso de inductores de hipoxia. Estos son compuestos químicos que, una vez añadidos sobre el medio de cultivo, inducen una respuesta que se asemeja a la de la hipoxia real.

Por desgracia estos compuestos afectan necesariamente al metabolismo y tienden a tener una cierta toxicidad por lo que se hace necesario una comprobación previa de sus efectos sobre las células a estudiar. Como ejemplos característicos tenemos los siguientes compuestos:

- Cloruro de Cobalto ( $\text{CoCl}_2$ ): Uno de los más económicos y extendidos. Su funcionamiento se fundamenta en la similitud estructural del catión cobalto (II) con el hierro (II). El cobalto pasa a sustituirlo en el centro catalítico de enzimas de reducción-oxidación, inactivándolas dado que el ión cobalto (III) no es estable.
- Dimetiloxalilglicina (DMOG): Al introducirse en la célula se esterifica a N-oxalilglicina que es un inhibidor de prolil-hidroxilasas al competir por el sitio de unión con sus sustratos naturales.
- Deferoxamina (DFO): Se trata de un quelante de hierro (II) del medio, reduciendo la disponibilidad de este ión para las células.

Como se puede observar el funcionamiento de dos de los compuestos pasa por el secuestro o sustitución del hierro. El fundamento es que las enzimas que catalizan procesos de reducción-oxidación, muchas de ellas con participación del oxígeno, son las principales encargadas de la detección del nivel de oxígeno disponible. Ejemplo característico son las PHD ya mencionadas que regulan el primer paso de degradación del factor de transcripción  $\text{HIF1}\alpha$ , las cuales son inhibidas por el derivado esterificado del DMOG, la N-oxalilglicina. La mayoría de estas enzimas tienen hierro en su centro catalítico, este átomo varía entre sus estados de oxidación (II) y (III) durante la catálisis de reacciones de reducción-oxidación. Si el medio se queda sin hierro disponible o es sustituido por equivalentes estructurales sin la posibilidad de variar entre estados de oxidación se logra inhibir en gran medida estas enzimas. Efecto que ocurriría fisiológicamente si se quedaran sin el oxígeno necesario en sus reacciones, por lo que el efecto general sobre el metabolismo es que se provocan respuestas similares a las que se producen en hipoxia.

Obviamente las enzimas así inutilizadas también participan en muchas otras reacciones, por lo que el efecto de estos compuestos acaba resultando tóxico al alcanzar ciertos valores. En humanos, por ejemplo, el  $\text{CoCl}_2$  induce un aumento de nivel de EPO en sangre y tarda años en ser eliminado por completo del organismo (Simonsen et al., 2012). En líneas de leucemia el límite tóxico ronda los  $50 \mu\text{M}$  de  $\text{CoCl}_2$  o  $25 \mu\text{M}$  DFO (Guo et al., 2006) y en general de forma dosis dependiente se aumenta la apoptosis observada (Dai et al., 2012).



**Figura 8:** Esquema del proceso de degradación y efecto de Factor Inducible de hipoxia. Imagen de Náchér y Serrano-Mollar 2007, modificada.

Si bien el efecto sobre las PHD es importante, se producen otros procesos que ayudan a emular la hipoxia. El derivado del DMOG provoca la reducción parcial de la respiración mitocondrial de forma no dependiente de factores de transcripción, con el consiguiente aumento de  $\text{O}_2$ , citrato, piruvato, acetil-CoA y demás intermediarios (Zhdanov et al., 2015). Incluso alivia síntomas de la colitis al aumentar el  $\text{O}_2$  disponible en el centro de la inflamación.

## 5.5 Hipoxia sobre endotelio y ECFC

La respuesta de las células endoteliales frente a la hipoxia es especialmente interesante por sus efectos *in vivo*. Por una parte se induce angiogénesis, y se produce un aumento de la expresión de P y E-Selectinas, ICAM-1, VCAM-1, vWF, interleucinas 6, 1 $\alpha$ , 8 y MCP-1. Además aumenta la permeabilidad en el endotelio que es, con los cambios de expresión mencionados, fuente de inflamación. También se reduce la liberación de trombina y del inhibidor del activador del plasminógeno (PAI-1). Modificaciones que, junto con el bloqueo de la ruta de la prostaciclina, promueven la coagulación. Los ROS generados retiran el NO, afectando a la vasoconstricción, e inhiben canales de calcio y potasio (Chan and Vanhoutte, 2013).

Según la localización del endotelio también se producen otras respuestas, algunas incluso contradictorias, principalmente contracción o relajación, ya que dependiendo de la zona del sistema vascular puede requerir una u otra respuesta (Michiels et al., 2000). La exposición a hipoxia aumenta la vida y proliferación del músculo liso vascular.

Variaciones aún mayores en la respuesta tienen lugar cuando nos fijamos en las diferentes células progenitoras. Las células HUVEC, típicamente usadas como modelo de célula endotelial, aumentan su proliferación en hipoxia y acumulan HIF1 $\alpha$  al llegar a un 5% de tensión de oxígeno en aire. Por el contrario, las EPC no parecen aumentar su proliferación, y sólo se aprecian cambios mensurables en su nivel de HIF1 $\alpha$  al alcanzar entre un 1% de oxígeno en el aire (Abaci et al., 2010) y un 3% (Hookham et al., 2016). Según el trabajo de Hookham et al. (Hookham et al., 2016) cuando la hipoxia llega al 1% el efecto sobre las ECFC es similar a añadir DMOG al medio; crean más actina, se vuelven más adherentes y grandes, un mayor porcentaje entra en senescencia, forman menos túbulos sobre matriz de membrana basal, generan más factor de crecimiento de placenta (PIGF) y proliferan menos.

Debido a los problemas ya explicados a la hora de equilibrar el medio de cultivo con el oxígeno atmosférico, en el trabajo de Abaci et al. (Abaci et al., 2010) indican que el tiempo fue de 12h. No queda claro si el nivel de HIF1 $\alpha$  podría haber decaído en el momento de medir, porque a pesar de no encontrar diferencias en su nivel, sí que se pueden apreciar diferencias en la respuesta por parte de las EPC, incluso frente a una hipoxia moderada del 5% de oxígeno en aire. Otros estudios sobre otras líneas también

han detectado cambios mensurables sobre células antes de poder detectar HIF1 $\alpha$  (Conte et al., 2008).

Aumentar la expresión de HIF1 $\alpha$  en las EPC seleccionadas como CD133+ resulta en un aumento proliferativo importante así como la expresión de genes participantes en su migración (SDF-1, CXCR4, VEGF, FGF, NOS, MMP-2 y MMP-9) (Zan et al., 2015). Con las CAC la hipoxia reduce el envejecimiento celular e inhibe la senescencia (Lee et al., 2013), dando idea de que la hipoxia mejoraría su uso terapéutico, lo cual se ha confirmado en modelo de rata (Zhou et al., 2017). Sobre células madre mesenquimales ciertos trabajos también apuntan a un interesante efecto de la hipoxia sobre su utilidad terapéutica (Huang et al., 2014; Rosová et al., 2008). Pero esto no es directamente extensible a todas las subpoblaciones mencionadas en este trabajo. En las ECFC específicamente diversos estudios indican que se mejoran aptitudes como la migración, o que *in vivo* las mejoras obtenidas en modelos de isquemia en ratones con la arteria femoral seccionada (Lee et al., 2015), no obstante la proliferación no parece afectada en un sentido u otro en hipoxia. Aunque aún hay trabajos contradictorios que hacen pensar que la respuesta no es del todo directa, en (Goldstein et al., 2006) indican que el reclutamiento *in vivo* desde la médula ósea sería inducida por un aumento anómalo en el oxígeno en el tejido. Y hay indicios de aumentos proliferativos al inducir sobreexpresión de HIF1 $\alpha$  (Abaci et al., 2010).

## 6 Hipótesis y Objetivos

Dada la importancia de las ECFC en procesos críticos para la salud humana una mayor comprensión de los detalles de su actuación se hace necesaria. Con el suficiente conocimiento básico sobre estas células sería posible el desarrollo de nuevos procedimientos de tratamiento de patologías relacionadas con el sistema vascular mediante estas células.

Como se ha comentado, su bajo número exige como requisito imprescindible para el futuro desarrollo de semejantes tratamientos una expansión *in vitro* preliminar. Encontrar las condiciones idóneas que permitan una expansión acelerada de las células manteniendo óptimas sus propiedades terapéuticas tiene por tanto un gran interés.

De los trabajos expuestos en la introducción de esta memoria se deduce que la disponibilidad de oxígeno es un factor importante para las ECFC a lo largo de su vida, desde su mantenimiento en la médula ósea hasta su expansión a la hora de reparar y formar vasos sanguíneos. Se entiende que la hipoxia es un estímulo que promueve la acción de las ECFC, su reclutamiento desde sus reservorios, migración a zonas afectadas y reparación de las mismas.

Ciertos trabajos (Lee et al., 2013) sobre otras EPC indican que la hipoxia protegería de la senescencia tras varios pases de crecimiento. Además, se suman observaciones previas no sistemáticas del grupo que sugieren un crecimiento diferente por parte de las ECFC según se encuentren en condiciones de Normoxia o hipoxia atmosférica *in vitro*.

Por lo tanto, la hipótesis de partida del presente proyecto es que la tensión de oxígeno disponible en el cultivo de las ECFC afecta al comportamiento de las mismas.

En principio, debido a ser uno de los factores que induce su actuación, esperamos un aumento en propiedades de interés. Principalmente, esto se podría traducir en una capacidad proliferativa superior, una menor senescencia y capacidad clonogénica mayor cultivando las células a niveles de oxígeno inferiores a la Normoxia atmosférica.

Paralelamente, con la idea de determinar la posible utilidad de las ECFC en biomedicina, se plantea desarrollar vías de uso bien como modelo biológico por su similitud al tejido endotelial propio del paciente, así como posibles formas de mejorar su utilidad terapéutica en casos donde su función pudiese estar afectada.

Para comprobar la hipótesis de partida, se plantean los siguientes objetivos primarios y sus respectivos objetivos secundarios:

- Desarrollar la metodología de aislamiento y caracterización que permita la obtención de ECFC a partir de muestras de sangre humana.
  - Ajustar los protocolos de actuación necesarios en el tratamiento de las muestras biológicas.
  - Enunciar un listado de medidas necesarias para la identificación de las ECFC.
  - Adaptar las condiciones de cultivo y conservación para el mantenimiento de las líneas de trabajo.
  - Determinar diferencias entre las células procedentes de muestras de sangre de adulto y de cordón umbilical de neonato.
- Diseñar un procedimiento de empleo de ECFC propias de un paciente como modelo individualizado de su respuesta a fármacos.
  - Perfeccionar la metodología para la generación de esferoides como modelo tridimensional.
  - Comprobar su utilidad en modelos emuladores de angiogénesis.
  - Idear un procedimiento para controlar la localización en sistemas complejos.
- Aumentar la utilidad terapéutica de las ECFC.
  - Adaptar metodologías de transducción mediante vectores lentivirales.
  - Comprobar la eficiencia en la transducción.
  - Caracterizar el efecto derivado de la modificación génica.
- Caracterizar el efecto de la hipoxia sobre las ECFC expandidas *in vitro*.
  - Modelizar la respuesta a tiempo corto mediante inductores de hipoxia y buscar cambios en la expresión génica.
  - Comparar diferentes niveles de hipoxia.
  - Determinar en última instancia las causas de los cambios que se observaran.

## 7 Materiales y Métodos

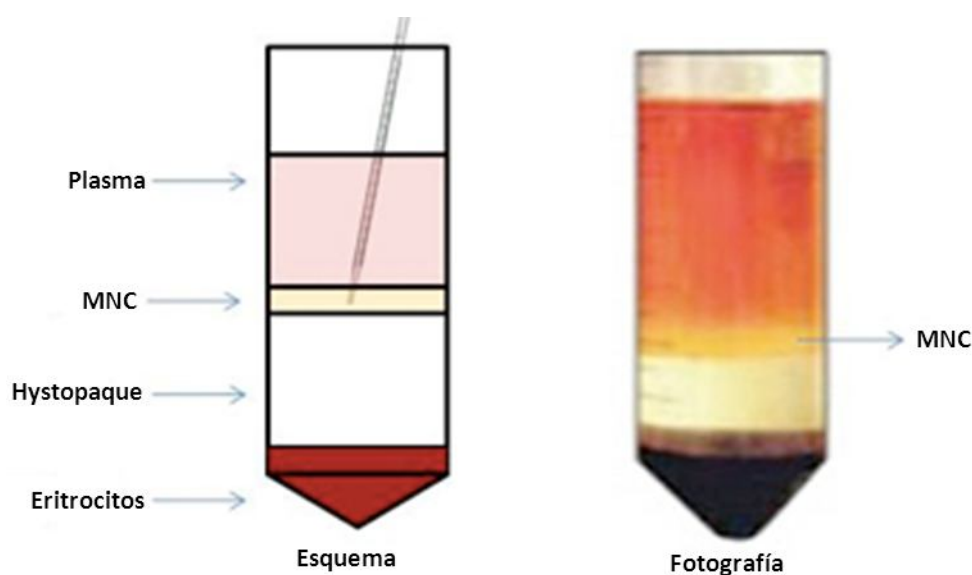
### 7.1 Obtención de las líneas celulares

Las células ECFC circulantes, base de este trabajo, se aislaron a partir de muestras de sangre, una vez obtenidas fueron identificadas mediante varias medidas de caracterización y expandidas in vitro para la consecución de los posteriores experimentos.

#### 7.1.1 Aislamiento de las ECFC

Originalmente se parte de muestras de sangre humana, las cuales se obtuvieron siguiendo los principios éticos de la declaración de Helsinki (2018) para estudios biológicos con humanos, así como la legislación en bioética vigente en el momento de la realización del estudio (BOE del 2007 (2007) desarrollado por el Real Decreto del 2011 (2011)). La obtención de la sangre así como del consentimiento informado de los donantes o sus tutores legales la llevó a cabo el Biobanco de sangre y tejidos de Aragón. El procedimiento de aislamiento se llevó a cabo inmediatamente tras la extracción de la muestra.

Se trabajó con la fracción de MNC (no útil para trasplante, en inglés denominado “*buffy coat*”) de bolsas de donación de sangre periférica de donantes adultos sanos, así como de sangre completa de cordón umbilical de neonatos que no fuese apta para el trasplante. No se discriminó sexo del donante.

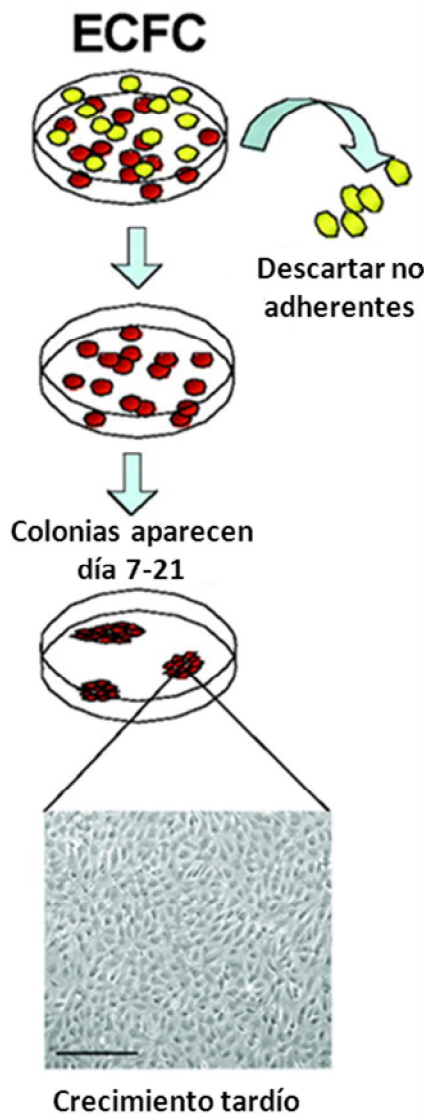


**Figura 9:** Resultado de la separación por gradiente de una muestra de sangre. Imagen de Spadaro et al. (2014), traducida.



El protocolo seguido es similar al definido por (Mead et al., 2008). La muestra de sangre diluida con solución equilibrada de Hanks (Merck, Darmstadt, Alemania) se deposita sobre un tubo Falcon o Accuspin® (Merck, Darmstadt, Alemania) de 50mL con un volumen de Histopaque® (Merck, Darmstadt, Alemania), una solución de polisacáridos de 1.077g/mL de densidad que previamente se había compactado mediante una centrifugación a 800g durante 5 minutos.

Los tubos con sangre e Histopaque® son centrifugados a 800g durante 15 minutos. El resultado es una separación por gradiente de densidad, donde se observan por orden las fases de plasma, células blancas mononucleares (MNC), Histopaque® y glóbulos rojos (ver Figura 9) (Spadaro et al., 2014).



**Figura 10: Aislamiento de las ECFC a partir de las MNC sembradas. Imagen de Hirschi et al. 2008, modificada.**

Todas las centrifugaciones se llevaron a cabo en una Laborzentrifugen 3k10 (Merck, Darmstadt, Alemania).

Se recogen las MNC que se siembran a una densidad de en torno a  $5 \times 10^6$  células/cm<sup>2</sup> en superficies de crecimiento recubiertas por colágeno. Estos cultivos se mantienen durante una semana con cambio de medio EGM-2 de Lonza (Basilea, Suiza) diariamente, con especial cuidado de no desprender células aun parcialmente adheridas. Tras la primera semana se realiza un lavado de la placa con PBS y el cambio de medio se hace ya de la forma habitual cada 2 o 3 días. Durante las 2 semanas siguientes se monitoriza el cultivo visualmente bajo el microscopio buscando la aparición de las colonias ECFC como se muestra en la Figura 10. Como se ha explicado esta aparición es tardía y viene precedida de otras poblaciones celulares.

En el momento en que dichas colonias alcancen un tamaño significativo, estimando 1.000-10.000 células, se procede a su selección mediante un anillo de clonaje. Las células se recogen así selectivamente

aplicando lavados de PBS y acutasa en el interior del anillo y son sembradas en una nueva placa recubierta de colágeno. Tras unos pases de expansión con medio EGM-2 el cultivo se vuelve homogéneo de ECFC.

### **7.1.2 Cultivos Celulares**

A continuación se resumen las condiciones en las que se llevó a cabo el cultivo celular. Para la condición de Normoxia las células se mantuvieron en una estufa modelo Hera Cell (ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos).

Para el cultivo de las células en hipoxia se recurrió a una estufa incubadora Forma Series II HEPA Class 100 (ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos) con suministro de nitrógeno gas para alcanzar una hipoxia del 5% de oxígeno en aire. Para el cultivo a concentraciones más hipóxicas, del 3% y 1%, se recurrió al servicio de cultivo celular del CIBA, donde disponen de estufas incubadoras con suministro de nitrógeno Forma serie II 3140 (ThermoFisher Scientific Waltham, Massachusetts, Estados Unidos).

Como se ha comentado en la introducción, el uso de estufas de nivel de oxígeno controlado presenta limitaciones a la hora de emular una hipoxia real, pero para este trabajo se ha aproximado que la concentración de oxígeno se puede considerar más o menos constante independientemente de la confluencia o la línea ECFC testada. Asimismo no nos queda más remedio que ignorar el período de equilibrado del nivel de oxígeno disuelto en el medio de cultivo. Unas aproximaciones alejadas de la realidad, pero sin una solución consensuada en este momento en el campo del cultivo celular. Estas limitaciones de la modelización asociadas al cultivo in vitro se han tenido en cuenta a la hora de plantear los diversos ensayos empleados en el trabajo, permitiendo a las células tiempo suficiente para realmente poder considerarse expuestas a la hipoxia. Cuando tiempos cortos fueron necesarios se recurrió a inductores químicos de hipoxia de acción más inmediata.

Las células ECFC se mantuvieron en cultivo siempre sobre superficies previamente recubiertas de colágeno. Este recubrimiento se logró disolviendo el colágeno hasta una concentración de 0.05 mg/mL en agua con un 0.116% de ácido acético y aplicando esta disolución sobre la superficie en cuestión. La superficie con el colágeno se mantuvo 1-2 horas a 37°C antes de retirar el resto líquido sobrante y guardar la placa en nevera hasta el momento de su uso.

A las células se les cambia el medio, salvo requerimiento especial de ciertos ensayos, cada 2-3 días. Se usó medio EGM-2 con un 5% de suero fetal bovino (FBS) así como los aditivos propios del medio; ácido ascórbico, factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), factor de crecimiento similar a insulina 1 recombinante, factor de crecimiento de fibroblastos recombinante, factor de crecimiento endotelial recombinante, el antibiótico gentamicina y el antifúngico anfotericina. El medio de la casa comercial también incluye hidrocortisona, pero debido a una comprobación preliminar (ver Figura 19), en línea con lo mencionado por otros autores (Kang et al., 2017), se observó que en el caso de las ECFC procedentes de sangre de cordón umbilical este aditivo es ligeramente perjudicial. Esto no ocurre con las células procedentes de sangre de adulto. Por lo tanto la hidrocortisona sólo se añadió al medio para el crecimiento de ECFC de las líneas procedentes de individuos adultos. La concentración exacta de los diferentes aditivos no ha sido proporcionada por Lonza.

Durante el cultivo, cuando la confluencia de las ECFC se acercaba al 100% se procedía a hacer un pase. Para pasar las células, adherentes, primero se realizaban tres lavados con PBS sin  $Mg^{2+}$  ni  $Ca^{2+}$ , debilitando las proteínas de unión a la matriz, luego se empleaban 0.04mL de acutasa, o en su defecto tripsina, por  $cm^2$ . La enzima se inactiva con un volumen de medio.

El crecimiento de las células en cada pase se monitorizó por contaje en cámara de Neubauer previa tinción de una alícuota con el colorante Trypan Blue (Merck, Darmstadt, Alemania). En las nuevas placas, salvo requerimiento concreto de cada experimento, las ECFC se sembraban a una concentración de 3.000-4.000 células por  $cm^2$ , siempre sobre placas con recubrimiento de colágeno.

De aquellas líneas que se obtuvo un alto número de células sobrantes en un pase dado se prepararon criotubos para congelar. Cantidades cercanas al millón de células eran separadas en alícuotas y resuspendidas en medio de congelación compuesto en un 95% FBS y el 5% restante dimetilsulfóxido (DMSO) como anticongelante. Como el DMSO es tóxico los viales eran rápidamente congelados a  $-80^{\circ}C$  y posteriormente guardados definitivamente en nitrógeno líquido a  $-195^{\circ}C$  aproximadamente.

### 7.1.3 Caracterización de ECFC

Una vez aisladas las células visualmente categorizadas como ECFC se procedió a comprobar mediante una batería de ensayos que realmente se trata de dicha población. Se siguieron los siguientes criterios:

- Criterio de proliferación

Una de las principales características de las ECFC frente a otras líneas es su capacidad de proliferar rápidamente, por lo que durante el aislamiento de las líneas se clonaron solamente aquellas colonias que fueron capaces de alcanzar un tamaño significativo en 3 semanas de cultivo. Colonias que debido al bajo número de ECFC en cultivo debieron aparecer a partir de una célula única en la mayoría de casos.

- Criterio morfológico

Está ampliamente descrito que en cultivo las ECFC deben comportarse de manera similar a las células endoteliales formando una monocapa de células de disposición geométrica en cercano contacto entre ellas, denominado típicamente en inglés “*cobblestone*” traducible como teselas. Tras la primera selección se comprobó visualmente en todos los casos que las células adquirirían esta morfología característica.

- Captación de LDL acetilado

Una característica propia de las células de la familia endotelial, como es el caso de las ECFC, conocida desde hace tiempo es la capacidad de captar las lipoproteínas de baja densidad (Voyta, 1984). Esta propiedad fue testada en las líneas aisladas para comprobar su comportamiento endotelial. Para ello las células eran expuestas en medio de Hanks con LDL acetilado marcado con DiI (emisión en rojo), a una concentración final de 10 µg/mL, durante 4 horas (ver Figura 11).

- Unión a Lectina

Las células de tipo endotelial se caracterizan también por exponer glicolípidos de cadena específica que unen con gran afinidad la lectina propia de *Ulex europaeus*. Lo que se ha venido usando para su identificación también desde hace décadas (Holthöfer et al., 1982; Molin et al., 1986). Las células se fijaron y expusieron a una solución de Lectina en medio de Hanks, a una concentración final de 10 µg/mL, durante 1 hora tras la tinción anterior (ver Figura 11).

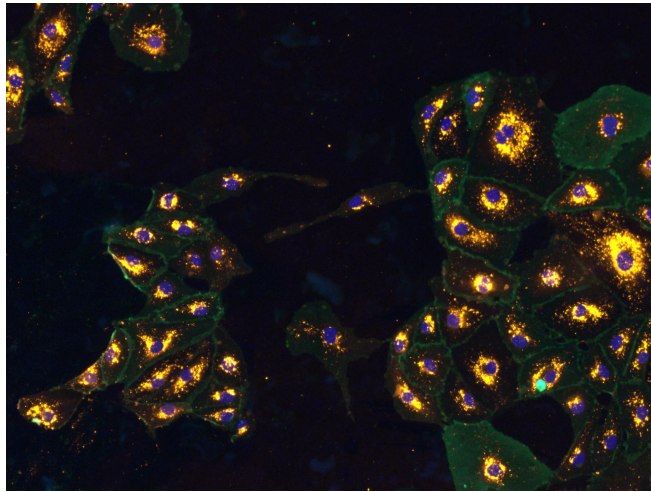


Figura 11: Ejemplo de células ECFC con tinción identificativa. Para un mismo campo se muestra tinción nuclear (DAPI, en azul), lisosomal (LDL acetilado con marcaje DiI, en amarillo) y membrana (lectina de Ulex europaeus marcado con FITC, en verde).

- Marcaje de superficie

Como se ha indicado, aunque la expresión exacta de marcadores varía sensiblemente según el momento y condiciones de medida, dado que hay una serie de proteínas que sí son comunes y se han caracterizado como necesariamente presentes en las ECFC se ha incluido una medida por citometría de flujo buscando esos marcadores. Se comprobó que las líneas aisladas fueran positivas para CD31, CD34, CD146, VEGFR2 y CXCR4 y negativas para CD14 y CD45. Los detalles se explican en el apartado 7.7.3

Marcaje de superficie.

## 7.2 Manejo de los Esferoides

Conforme se confirma la importancia de las ECFC en diversas patologías se hace necesario el desarrollo de técnicas que permitan su estudio detallado. Debido a su papel preponderante en angiogénesis recientemente se ha empezado a emplear modelos tridimensionales para analizar esta característica.

Una de las formas de lograrlo es mediante la generación de esferoides, agrupaciones celulares más o menos compactas que se introducen en las condiciones a testar. Es un procedimiento naciente con las ECFC en concreto (Shah and Kang, 2018; Sturtzel et al., 2018) que se ha abordado para su desarrollo de forma transversal a este proyecto.

### 7.2.1 Formación de esferoides

Para la formación de los esferoides se ha recurrido al procedimiento de gota colgante (Foty, 2011). Brevemente el protocolo consiste en:

Células que se tienen en cultivo bajo unas condiciones determinadas se levantan de la forma habitual y se contabilizan. Una cantidad de 200-1.500 células se mezclaban con medio de cultivo y un 20% en volumen de methocel (Sigma-Aldrich, San Luis, Misuri, Estados Unidos), un polímero derivado de la celulosa para aumentar la viscosidad y facilitar el proceso. El volumen final testado fue de 10-100  $\mu\text{L}$  por gota. Las gotas se dejan colgando 24 horas aproximadamente en estufa, sobre un reservorio de líquido que impida su desecación, y se emplean al día siguiente (esquema en la Figura 12). Para su empleo basta con pipetear la gota con una micropipeta con cuidado y depositar el contenido, incluyendo el esferoide, sobre la superficie donde se vaya a testar.

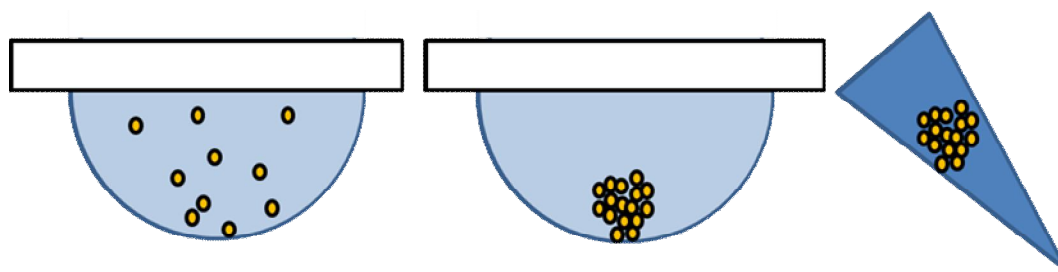


Figura 12: Formación de los esferoides.

### 7.2.2 Internalización de nanopartículas ferromagnéticas

Se emplearon después nanopartículas para funcionalizar los esferoides creados. El procedimiento de la internalización fue sencillo; las ECFC se mantuvieron en cultivo 24 horas añadiendo al medio una concentración entre 5 y 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de las nanopartículas. Tras ese tiempo las células se lavan tres veces con PBS para retirar el exceso de las nanopartículas, se levantan normalmente, contabilizan y emplean, en principio para generar esferoides con propiedades magnéticas.

Las nanopartículas empleadas fueron cedidas por el grupo de mecánica aplicada y bioingeniería de la Universidad de Zaragoza y poseen propiedades ferromagnéticas.

### 7.2.3 Angiogénesis tridimensional

Los esferoides se han venido usando desde hace algunos años embebidos en matrices tridimensionales para pruebas de angiogénesis sobre células endoteliales. Emulan mejor que el cultivo bidimensional el proceso para la búsqueda del efecto de factores o matrices particulares (Laschke and Menger, 2017). Se testó si podríamos duplicar esta

aproximación con las ECFC en nuestro laboratorio con la idea del desarrollo de ensayos individualizados a los pacientes probando variaciones de un procedimiento base:

Los esferoides se prepararon con 24 horas de antelación tal y como se recoge en el apartado anterior. Sobre una placa, inicialmente de 96 pocillos, 0.32 cm<sup>2</sup> de superficie, y luego placas  $\mu$ -Slide Angiogenesis (Ibidi, Martinsried, Alemania), 0.125 cm<sup>2</sup>, se prepara una cama de colágeno, procedente de cola de rata y neutralizado, en DMEM o matrigel en PBS, que se deja gelificar a 37°C durante 30 min. Se probaron varias concentraciones posibles, desde 1.8 mg/mL hasta 0.8 mg/mL para el colágeno y

Una vez preparada la base se repite el procedimiento incluyendo en el seno del gel el esferoide, se permite que gelifique a 37°C otros 30 min y se añade el medio. Tanto el medio como el preparado de gel en que se introdujeron los esferoides incluyeron bien VEGFA a la concentración propia del medio (aproximadamente 5 ng/mL), proangiogénico, o bien Bevacizumab a 2.27 mg/mL, anticuerpo que secuestra VEGFA e inhibe la angiogénesis.

Determinadas las condiciones idóneas se hizo un ensayo de angiogénesis tridimensional y se fotografió el resultado en el servicio de microscopía del Centro de Investigaciones Biomédicas de Aragón empleando un Microscopio Confocal Compacto Olympus FV10-i Oil Type (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania).

### 7.3 Transducción

Se realizó una modificación génica sobre ECFC para comprobar el efecto de la sobreexpresión de ciertos genes.

Una línea de células ECFC obtenida de sangre de cordón (C2.1) en su pase 6, así como una línea procedente de adulto (B29) en su pase 3, ambos pases relativamente tempranos, fueron sometidas a un procedimiento de transducción. El protocolo a seguir fue el indicado por la Dra. Anne-Catherine Prats. Las células de cada línea se expusieron a vectores lentivirales proporcionados, junto con el protocolo apropiado, por la Dra. Anne-Catherine Prats, del grupo TRADGENE EA 4554 “*Contrôle de la traduction et thérapie génique des pathologies vasculaires I2MC*” de la Université Toulouse III - Paul Sabatier en el marco del proyecto colaborativo Refbio-VEMT. Se introdujeron así los genes de

proteína fluorescente verde (GFP), Adrenomedulina (AM), Preproadrenomedulina (PPAM), FGF2 y se llevó a cabo el procedimiento sobre un control.

Sembramos un pocillo de placas de 6 (9.6 cm<sup>2</sup> por pocillo) por lentivector, cuando la confluencia se acercaba al 90% de la superficie se llevaron a una zona de trabajo con cultivos celulares dedicado al trabajo con vectores virales. Las condiciones de la transducción fueron sobre medio OptiMEM (ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos) sin suero, pero complementado con insulina, transferrina y selenio, ITS (ThermoFisher Waltham, Massachusetts, Estados Unidos) y con un 2.5% de protamina.

Se hicieron 2 lavados con medio de cultivo OptiMEM y se dejaron después con este mismo medio. En cada uno de los cuatro pocillos se añadieron los lentivectores correspondientes en cada caso, y la protamina. Se mantuvieron las células en estas condiciones durante 7 horas. Finalmente, el medio se retira y se añade medio EGM-2 habitual.

Se mantuvieron en crecimiento apartadas del resto de cultivos y sin emplear durante los dos pases siguientes para asegurar la pérdida de todos los vectores infecciosos restantes antes de iniciar experimentos o congelar las células.

## 7.4 Testado de inductores de hipoxia

Para este trabajo se ha testado no sólo diferentes concentraciones de oxígeno disponible, sino también se han realizado ensayos añadiendo al medio diferentes compuestos químicos que simulan la hipoxia. Los compuestos testados fueron: Cloruro de cobalto, Deferoxamina y Dimetiloxalilglicina.

Se comenzó con ensayos de proliferación a tiempo corto (descrito en el apartado 7.5.2 Proliferación en placa) con sólo 2 puntos de medida, antes de añadir los compuestos y 24 horas tras la adición de los compuestos a concentraciones de 0 a 900 µM para CoCl<sub>2</sub>, 0 a 700 µM para DFO y 0 a 2500 µM para DMOG. Este último debe diluirse en DMSO al no ser soluble en agua, producto de conocida toxicidad, por lo que se comparó contra un control que incluía la misma cantidad de DMSO que la que se añadió a las diferentes concentraciones de DMOG. A partir de esta medida se observó el efecto que los compuestos tenían sobre el crecimiento, ralentizándolo con una relación similar a una



función logarítmica. Sobre el rango testado se escogieron concentraciones cercanas al 50% del efecto observado para los ensayos. Esto supuso un empleo de las siguientes concentraciones: 200-300 $\mu$ M para el CoCl<sub>2</sub>; 500 $\mu$ M para el DMOG; y alrededor de 50 $\mu$ M para el DFO.

A partir de estos cultivos se obtuvieron muestras de RNA a los tiempos 0, 1, 3, 6 y 24 horas para la realización de medidas de qPCR tal y como se describe en el apartado 7.6 Expresión génica.

## 7.5 Estudios de proliferación

La proliferación de las diferentes líneas se midió mediante diferentes ensayos. Por una parte se hizo un seguimiento de las células en expansión conforme se fueron pasando, y por otra en momentos concretos se hicieron medidas en pases concretos de la cinética de su crecimiento.

### 7.5.1 Proliferación en pases sucesivos

Se mantuvo un seguimiento mediante contaje en cámara de Neubauer del número de células, de cada uno de los pases realizados. La evolución de crecimiento a lo largo de dichos pases ofrece información de la evolución de las líneas celulares a largo plazo.

La representación de estos datos se ha hecho mediante el número de duplicaciones acumuladas frente a días en cultivo, con las medidas realizadas a lo largo de los pases en que se mantuvieron las células. El cálculo de las duplicaciones acumuladas se hizo sumando las duplicaciones obtenidas en cada uno de los pases anteriores. Se tuvo en cuenta solamente el número de células que eran viables, ignorando las células muertas. Para hallar el número de duplicaciones para cada pase concreto se empleó la Ecuación 1.

**Ecuación 1: Número de duplicaciones en un pase de cultivo.**

$$N^{\circ} \text{ Duplicaciones} = \log_2(N^{\circ} \text{ Células}_{\text{obtenidas}} - N^{\circ} \text{ Células}_{\text{sembradas}})$$

En aquellos casos en que la línea no se planeaba mantener en expansión durante un número de pases lo suficientemente grande, se procedió a sembrar específicamente a este fin placas de 9.6 cm<sup>2</sup>. Así se obtuvieron datos, a coste bajo en medio, para pases más tardíos.

### 7.5.2 Proliferación en placa

Se estudió la cinética de la proliferación de algunas líneas celulares a tiempos cortos. Las células se sembraron sobre pocillos que se fueron fijando en días sucesivos para luego comparar su contenido.

Se sembraron un mismo número de células en los pocillos de una placa de 24 pocillos (1.9 cm<sup>2</sup>/pocillo). Estos pocillos se mantienen en crecimiento durante diferentes tiempos. Conforme se cumplen los tiempos planeados, se procede al fijado de parte de los pocillos, en principio los días 0, 1, 2, 3, 5, 7, 9 y 12. Las medidas se hicieron por triplicado.

El primer fijado se realiza una hora tras la siembra, o bien en el momento de añadir un compuesto al medio, continuando con las horas o días seleccionados como los puntos a tomar las medidas. Para fijar las células se retira el medio, se lavan con PBS y, tras retirarlo, se añade una solución de glutaraldehído al 1% en agua destilada. Esta solución se deja actuar durante 10 minutos a temperatura ambiente. Seguidamente se retira y se lava el pocillo tres veces para asegurarse de retirar los restos de aldehído. En aquellos casos en que aún quedarán células en crecimiento en otros pocillos de la placa se dejaba el PBS del último lavado para evitar que las células ya fijadas se sequen. En el momento en que todos los pocillos estuvieran fijados de esta manera se procedió a la tinción de la misma.

Para realizar la tinción se retira el PBS de los pocillos y se añade en todos ellos una solución de cristal violeta al 0.1%. Tras 40 minutos de incubación a temperatura ambiente esta solución se retira y los pocillos se lavan sucesivamente con agua hasta retirar todo el exceso de colorante. Los pocillos se dejan secar hasta que evapora la humedad restante, habitualmente 48 horas.

Se procede entonces a medir el colorante atrapado en las células fijadas. Para ello se añade una solución de ácido acético al 10%. Para los pocillos empleados se añaden 550 µL y así hacer duplicados técnicos de 250 µL. Esta solución extrae de forma prácticamente instantánea el colorante de las células fijadas. Se pasa la solución a pocillos de una placa de 96 pocillos para medir en espectrofotómetro, se empleó un Sinergy HT (BioTek, Winooski, Vermont, Estados Unidos).

La idea es que la absorbancia medida en el espectrofotómetro será proporcional a la cantidad de colorante atrapado en las células fijadas, dando idea del número de las

mismas en relación a la cantidad medida inicialmente. Los datos también se representan como número de duplicaciones, calculado de la forma mostrada en Ecuación 2.

**Ecuación 2: Número de duplicaciones a un tiempo dado en un ensayo de proliferación en pocillos.**

$$N^{\circ} \text{ Duplicaciones} = \log_2(Abs_{final} - Abs_{inicial})$$

## 7.6 Expresión génica

Se midió expresión de ciertos genes relacionados con la función endotelial y la hipoxia mediante medidas de PCR a tiempo real a partir de retrotranscritos.

Las células se mantuvieron en cultivo bajo diversas condiciones hasta el momento de la obtención del material genético. Entonces se procedió a retirar el medio, lavar con PBS y añadir 1mL Trizol (Merck, Darmstadt, Alemania) por placa. La superficie se rasca con una rasqueta y el volumen se recoge sobre un eppendorf que se guarda congelado a -80°C hasta el momento de la extracción del RNA.

La obtención de RNA a partir de las muestras congeladas en Trizol se hizo con el protocolo publicado por la casa comercial del Trizol, seguido del kit de concentración y purificación de RNA total de Norgen (Norgen Biotek Corp. Ontario Canadá) para purificación de muestras de RNA. La muestra así purificada y concentrada se midió en todos los casos en NanoDrop para determinar la concentración de RNA y la cantidad de DNAsa a aplicar del kit de Ambion (ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos).

De la muestra así purificada, concentrada y libre de DNA seleccionamos una cantidad sobre la que se aplicó la retrotranscriptasa Superscript IV (Invitrogen, Carlsband, California, Estados Unidos) de acuerdo a las instrucciones de la casa comercial. La retrotranscripción se llevó a cabo mediante un único ciclo de PCR con los siguientes pasos: 10 minutos a 23°C, 10 minutos a 55°C, 10 minutos a 80°C y enfriado. El cDNA así obtenido se conservó hasta su uso a -20°C, el RNA restante se conservó a -80°C.

En todos los casos una alícuota del RNA purificado se cargó en un gel de agarosa al 1.2% en Buffer TAE, para comprobar la calidad del RNA y la ausencia de DNA. La intensidad de la señal de las bandas pesada y ligera del RNA ribosómico era cuantificada y su relación comprobada. Idealmente si la integridad del material genético es óptima esta relación debe aproximarse a 2, pues una es el doble de grande que la otra y debería haber

una similar cantidad absoluta de ambos fragmentos. Si la muestra se encuentra degradada la banda más pesada, por su longitud, sufrirá más roturas reduciéndose esta relación.

Todo este proceso se realizó para cada conjunto de muestras a lo largo de una misma jornada de trabajo para minimizar la degradación del RNA.

Una vez conseguido el cDNA y confirmada la calidad de la muestra de partida se procede a las medidas por PCR a tiempo real. Éstas se llevaron a cabo con el reactivo SYBR Select Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, California, Estados Unidos) y los cebadores mostrados en el

Anexo IV.

Las cantidades a cargar por pocillo fueron: 7.5uL de Master Mix, 0.45µL de cada oligo (directo y reverso) a 10 µM, 10 ng de cDNA (o RNA para los controles) y completando con agua hasta los 15 µL de volumen final. El programa del termociclador a tiempo real Step One Plus (ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos) fue: calentamiento inicial a 90°C durante 10 minutos, seguido de 40 ciclos pasando de 60°C (60 segundos) a 90°C (15 segundos), seguido de una fase de disociación a 90°C durante 15 segundos y finalmente una curva de disociación (en inglés “*melting*”) de 60 a 90°C para comprobar que sólo hay un producto de amplificación.

Los resultados obtenidos se trataron con el software libre “LinReg” (Ruijter et al., 2009), preferido frente al software propio del termociclador. El programa del Step One Plus escoge el valor límite para el cálculo del ciclo limitante a partir de multiplicar el ruido basal 5 veces. Por el contrario, el LinReg escoge el valor límite como aquel donde el promedio de valores obtenidos presenta la segunda medida contando desde la zona superior de la zona lineal de la función de crecimiento exponencial. Como resultado de esta diferencia los valores son más precisos. Además, ofrece valores de eficiencia para cada reacción, calculada a partir de la pendiente de la función señal en su zona de crecimiento exponencial, en lugar de suponer el valor teórico perfecto de una eficiencia del 100%, esto es, una duplicación por ciclo de la reacción.

Los valores obtenidos se muestran finalmente con el valor de R calculado de la manera expuesta en la Ecuación 3. Este valor indica el número de veces en que el gen de interés se expresa respecto del gen control “casero” (del inglés “*housekeeping*”) en la muestra experimental respecto de la muestra control.

**Ecuación 3: Cálculo de la expresión genética normalizada al gen casero y la muestra control.**

$$R = \frac{Eficiencia_{GOI}^{Cq_{Control} - Cq_{Exp}}}{Eficiencia_{HK}^{Cq_{Control} - Cq_{Exp}}}$$

Donde Eficiencia<sub>GOI</sub> y Eficiencia<sub>HK</sub> indica la eficiencia para las reacciones del Gen de Interés y Gen casero o referencia respectivamente, Cq indica el ciclo que sobrepasa el límite (en otros trabajos a veces referido como Ct) para la muestra Control o experimental (Exp).

### 7.6.1 Elección de los genes a medir

De todos los genes en la célula se buscaron aquellos que pudiesen tener una variación importante o una relación de interés con la hipoxia. Se seleccionaron:

- HIF1 $\alpha$

Por ser predominante su proteína en la respuesta celular a la hipoxia ya expuesto en el apartado 5.4.3 Respuesta a Hipoxia este trabajo. A pesar de que el principal mecanismo de regulación se encuentre a nivel proteico hay descritas modificaciones importantes en sus niveles de expresión.

- El gen transmembrana de transporte de glucosa 1 (GLUT1)

También llamado miembro 1 de la familia 2 de transportadores de solutos. Un gen para una proteína que permite el paso por gradiente de concentración de glucosa al interior celular. Es un importante componente del metabolismo de la glucosa, cuyo uso está muy aumentado ante la ausencia de oxígeno.

- VEGFA

Codifica una hormona de crecimiento homodimérica unida por puente disulfuro. Es el principal inductor de crecimiento en las células endoteliales.

- KDR

Codifica dos receptores, del tipo tirosin quinasa, de la hormona anterior. Es un mediador principal en el crecimiento, migración y formación de túbulos por parte de las células endoteliales.

- FGF2

Miembro de la familia de factores de crecimiento fibroblástico con 5 isoformas según el codón de iniciación empleado con funciones paracrin, autocrinas e incluso intracrina (que actúa sobre la propia célula sin llegar a ser excretada fuera de la misma). Es otra de las hormonas inductoras del crecimiento del endotelio. Tiene una importante función en el desarrollo fetal, curación de heridas y desarrollo tumoral.

- Preproadrenomedulina (PPAM)

Se corta en dos péptidos con funciones angiogénicas y de vasodilatación. Uno de estos péptidos es la adrenomedulina (AM). Es otro importante promotor de la angiogénesis (Zhao et al.).

- Óxido nítrico sintasa 3 (NOS3)

De gran importancia en la regulación de los músculos en la túnica media de arterias. En condiciones de hipoxia aumenta su expresión.

- Anhidrasa carbónica 9 (CAIX)

Una metaloproteína transmembrana de la familia de anhidrasas carbónicas que hidratan el CO<sub>2</sub> para generar ácido carbónico y facilitar la remodelación de la matriz extracelular. Como los genes anteriores está implicado en el proceso de angiogénesis.

- Inhibidor de la quinasa dependiente de ciclina 1A (CDKN1A)

Codifica la proteína p21, inhibidor de los complejos ciclina quinasa dependiente de ciclina 2 y 4. La proteína codificada por este gen evita el avance del ciclo celular de la fase G1 a la fase S y es una de las proteínas principales inducidas por la proteína p53 inducida en condiciones de estrés para detener el ciclo y, llegado el caso, entrar en apoptosis.

- Inhibidor de la quinasa dependiente de ciclina 2A (CDKN2A)

Codifica varias proteínas, incluyendo un inhibidor de la quinasa dependiente de ciclina 4, con un efecto similar a la proteína anterior, y otra denominada ARF (o p16) que estabiliza p53 e inhibe la proteína MDM2 que degrada p53. Es decir, que igual que CDKN1A detiene el ciclo celular.

### **7.6.2 Elección de la concentración a emplear**

Se realizaron una serie de medidas preliminares con todos los genes sobre un cúmulo de material genético obtenido de varias líneas para determinar la cantidad de material genético que proporcionara un mejor rendimiento. Se testaron concentraciones seriadas de 50, 10, 2, 0.4 y 0.08 ng de material genético por reacción. Finalmente se escogió una cantidad de 10ng de cDNA a cargar por reacción en todos los casos al proporcionar valores de C<sub>t</sub> apropiados en los genes testados y emplear el mismo valor facilitaba el proceso y la comparación posterior.

### 7.6.3 Elección de genes de referencia

Debido a que la hipoxia tiene un efecto importante sobre un amplio abanico de genes fue necesaria una búsqueda de genes de referencia que no se vieran afectados por aquella. El resultado se muestra más adelante en la Figura 46. Como era de esperar, el gen GAPDH, participante de varios procesos afectados en hipoxia, ofrecía el peor valor de estabilidad de los testados. Se escogió una combinación de los genes RPLP0, B2MG y ACTB, empleando su promedio geométrico. Se ha descrito que emplear un promedio geométrico de 3 genes de referencia proporciona resultados más reproducibles al minimizar variaciones (Vandesompele et al., 2002).

## 7.7 Citometría

Para las medidas de citometría se recurrió al servicio de citometría del CIBA, donde se llevaron a cabo diversas medidas según fue requerido.

### 7.7.1 Apoptosis

Para medir el nivel de apoptosis en un cultivo celular se recurrió a la técnica habitual de tinción con Ioduro de propidio y Anexina V unido a FITC.

Para ello las células a medir se levantan con acutasa previo lavado con PBS sin iones divalentes. Se centrifugan, resuspenden en PBS y envían al servicio de citometría, donde son incubadas con estos dos compuestos. Las células que se encuentran inmersas en el proceso de apoptosis presentan fosfatidilserina hacia el exterior en su membrana celular. La anexina teñida que se añade une este componente y las marca.

Las células que hayan muerto definitivamente, se encuentren en las últimas etapas de la apoptosis o estén muriendo por necrosis, presentarán poros en su membrana celular. El Ioduro de propidio puede en estos casos entrar libremente, unirse al DNA de la célula y emitir señal, marcándolas.

La cantidad de células en uno u otro estado se determina por citometría. El aparato empleado fue un FACS Aria (Becton-Dickinson, Franklin Lakes, Nueva Jersey, Estados Unidos) y el software para el análisis de los resultados fue FACS Diva (Becton-Dickinson, Franklin Lakes, Nueva Jersey, Estados Unidos).



La selección se realiza primeramente distinguiendo las células únicas de otro tipo de eventos mediante una clasificación según la luz incidente y la luz reflejada (ver Figura 13 A). Una vez escogidas las células, éstas se separan según su señal positiva o negativa para los 2 fluoróforos considerados. Así se obtienen 4 subpoblaciones: células vivas (sin señal en ninguno de los 2), en apoptosis temprana (positivas para anexina V y negativas para yoduro de propidio), en proceso de necrosis (con yoduro pero sin anexina) y muertas (positivas para ambos) (ver Figura 13 B).

En este caso los resultados se muestran para cada ensayo como porcentaje de los eventos, células introducidas en el citómetro, clasificadas como células en proceso de necrosis, muertas, vivas o en proceso de apoptosis.

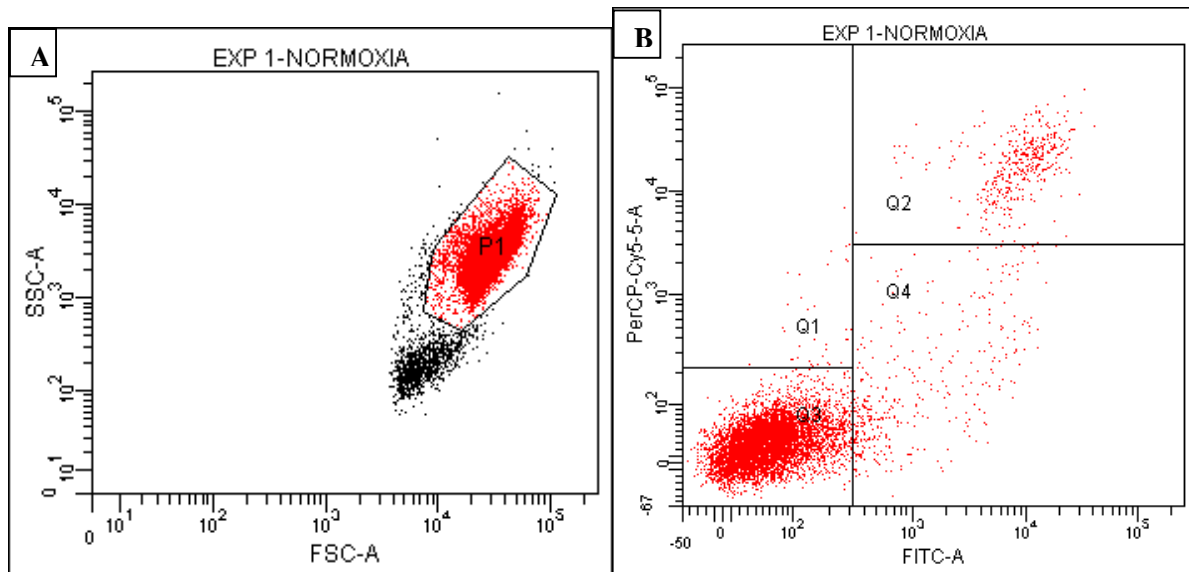
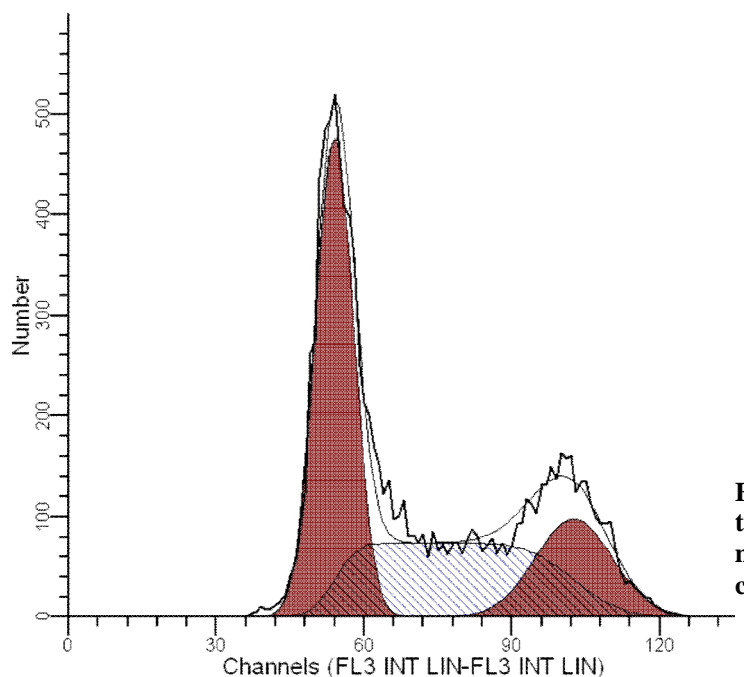


Figura 13: Ejemplo del análisis de los datos de una medida de apoptosis por citometría de flujo.

### 7.7.2 Ciclo Celular

La cantidad de células en uno u otro estadio del ciclo celular se determinaron también por citometría. A partir de estos datos se buscó información respecto del crecimiento.

Siguiendo un procedimiento parecido al mostrado para la apoptosis, las células se levantan con acetasa y son resuspendidas en PBS y llevadas al servicio de citometría. Allí son incubadas con etanol al 70% en PBS a 4°C hasta el día siguiente para generar poros en la membrana.



**Figura 14:** Ejemplo del resultado tras procesar los datos de una medida de ciclo celular por citometría de flujo.

A continuación se incuban con yoduro de propidio, que une al DNA dando una señal proporcional a la cantidad de material genético presente en cada célula. Cuando las células son introducidas en el citómetro de flujo se observan células con una cantidad de señal en aquellos casos en los que su contenido genético sea el básico (las 24 parejas de cromosomas), esto es que se encuentran en fase G0 o G1, o bien el doble de esta señal en aquellas células que hayan duplicado su material genético, esto es fase G2. Una señal entre estos dos extremos corresponderá a aquellas células que se encuentran en fase S inmersas en el proceso de duplicación del material genético (ver Figura 14). La cantidad de células en la fase de mitosis es habitualmente despreciable. El aparato empleado fue un FACS Array (Becton-Dickinson, Franklin Lakes, Nueva Jersey, Estados Unidos) y el software para el análisis de los resultados fue FACS Array Software System (Becton-Dickinson, Franklin Lakes, Nueva Jersey, Estados Unidos).

Los resultados de estas medidas se proporcionan como porcentaje de células en cada una de las fases discernibles; G0 o G1, G2 o M y fase S. También se indica el Índice de Proliferación (IP), entendido como el tanto por uno de células en fases del ciclo que derivan en duplicación, calculado según la Ecuación 4.

**Ecuación 4:** Cálculo del índice de proliferación.

$$IP = \frac{Céls\ G2\% + Céls\ S\%}{Céls\ G1\ o\ G0\% + Céls\ G2\% + Céls\ S\%}$$

### 7.7.3 Marcaje de superficie

Para varias muestras se procedió a un marcaje de superficie, midiendo mediante citometría de flujo la presencia de ciertas proteínas de superficie

El procedimiento fue levantar las células con acutasa previo lavado con PBS, centrifugar y resuspender en PBS con un 2% de suero. Las células entonces se incuban 25 minutos a 4 °C con la fracción constante del anticuerpo Inmunoglobulina G para reducir la señal inespecífica, dividiendo entonces en diferentes muestras que se incuban con diferentes anticuerpos para los marcadores a testar.

Se hicieron medidas para CD14, CD31, CD34, CD45, CD146, VEGFR2 y CXCR4 sobre cada línea aislada como comprobación de que se trata realmente de ECFC. Los resultados de estas medidas, siendo genéricas para todas las líneas empleadas, no se muestran en el trabajo.

Posteriormente sobre una línea de cordón (C1.4) también se hicieron ensayos para los marcadores CD3, CD13, CD29, CD54, CD62E, CD62P, CD73, CD90, CD105, CD106, CD117, CD133, CD144, HLA-ABC y HLA-DR. El listado de los orígenes de los anticuerpos empleados se encuentra en el

Anexo III.. El procedimiento seguido fue el mismo, se tomaron medidas para los pases 6, 8 y 10 en condiciones de Normoxia (21% oxígeno) e hipoxia moderada (5% oxígeno). El aparato empleado para todas las medidas de marcaje fue un FACS Aria (Becton-Dickinson, Franklin Lakes, Nueva Jersey, Estados Unidos) y el software para el análisis de la señal medida fue Kaluza (Beckman Coulter, Brea, California, Estados Unidos).

Los resultados de esta segunda tanda de medidas se muestran como porcentaje de células cuya señal percibida fue superior a la señal emitida por un control de la unión inespecífica para cada marcador (controles de isotipo). Asimismo, todas las medidas realizadas incluyeron controles para contrarrestar la invasión en la señal detectada procedente de fluoróforos de emisión amplia (compensación).

#### **7.7.4 Marcaje de aldehído deshidrogenasa**

Empleando el kit de marcaje AldeRed ALDH Detection Assay (Merck, Darmstadt, Alemania) se hicieron medidas de la actividad de enzimas aldehído deshidrogenasa en ECFC. Este grupo de enzimas son un marcador del grado de célula madre en un cultivo (Dollé et al., 2015) que catalizan el paso de grupos aldehído a ácido carboxílico.

El reactivo se compone de un aldehído neutro capaz de atravesar libremente la membrana celular quedando atrapado en la célula cuando la enzima aldehído deshidrogenasa (ALDH), si está presente en la célula, lo modifica a un ácido carboxílico cargado. Esta modificación, además, resulta en un compuesto fluoróforo.

Siguiendo las indicaciones del kit, las células se levantaron, resuspendieron en el buffer proporcionado que incluye verapamil para impedir la excreción del producto coloreado por parte de la célula, y expusieron al reactivo AldeRed 588<sup>a</sup>. Las células se incuban 30-60 min y se mide la fluorescencia por citometría de flujo comparando frente a un control con Dietilaminobenzaldehído (DEAB), inhibidor de la ALDH a medir.

Una vez obtenida la medida se siguen los pasos mostrados en el ejemplo de la Figura 15. Primero se hace una selección de las células ignorando otras partículas según la luz dispersada, luego se seleccionan las células viables por marcaje de los núcleos cuya membrana se encuentre dañada con cytox-blue, y por último se selecciona el área a considerar positiva para el marcaje de ALDH.

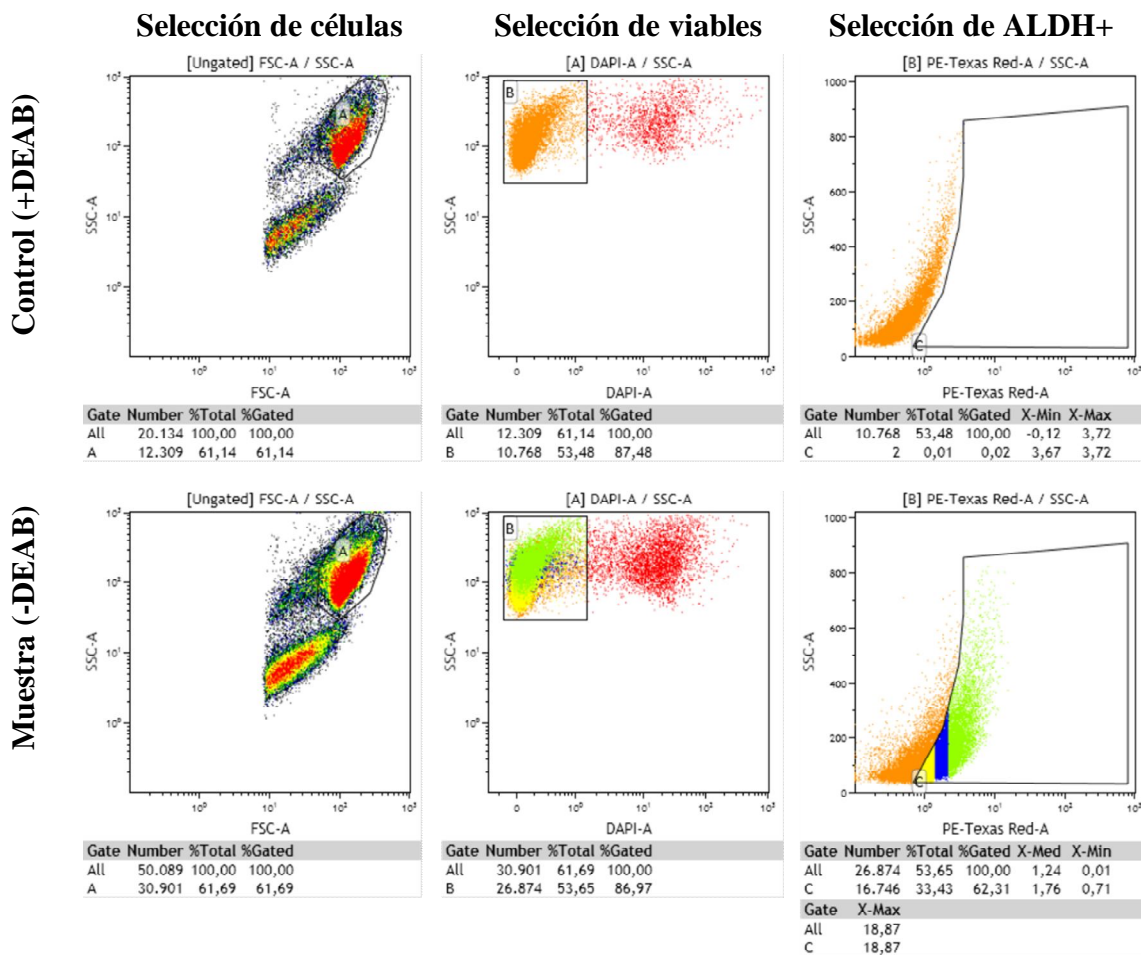


Figura 15: Pasos de análisis del análisis de ALDH.

## 7.8 Senescencia

El porcentaje de células senescentes en diferentes condiciones se determinó mediante tinción con 5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactopiranosido (X-Gal).

Para hacer esta medida las células en cultivo se fijan mediante una mezcla de formaldehído 1.85% y glutaraldehído 0.2%, previo lavado con PBS. Las células así fijadas se tiñen toda la noche mediante una disolución 5mM de ferricianuro de potasio, 5mM ferrocianuro de potasio, 2mM cloruro de magnesio, 150mM cloruro de sodio filtrada con un 2.45mM X-Gal en buffer citrato/fosfato pH 6.0.

Las células ya teñidas son lavadas y montadas entre porta y cubre con medio de montaje Fluoroshield (Sigma-Aldrich, San Luis, Misuri, Estados Unidos) que incluye DAPI. Aprovechando la localización de los núcleos y número de células mediante esta segunda tinción con DAPI y el número de senescentes con la primera tinción se determina el porcentaje de células senescentes empleando el macro para el software libre ImageJ (Schneider et al., 2012) desarrollado al efecto (Lozano-Gerona and García-Otín, 2018) (ejemplo en la Figura 16). El macro se publicó en el artículo que se muestra en el

Anexo II.

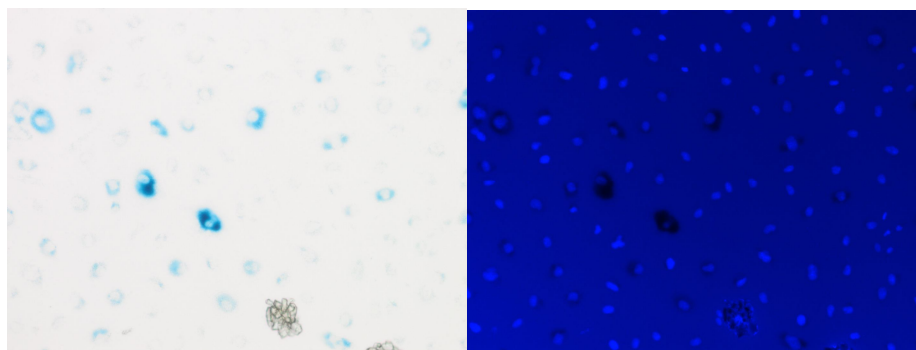


Figura 16: Ejemplo de la pareja de imágenes obtenidas para el análisis de senescencia.

Debido a la variación de la técnica se tomaron 5 imágenes por cubre preparado y se emplea la media. Los datos se muestran como porcentaje de las células con tinción positiva para senescencia.

Se define la senescencia como el estado en el que la célula detiene su ciclo celular y entra en un estado anómalo en el que cumple sus funciones con una menor eficiencia (Campisi, 2005), habitualmente producto del estrés o de haber sufrido una acumulación importante de mutaciones tras numerosas divisiones. Para determinar la cantidad de células en esta situación se aprovechó que una de las características de este estado es la acumulación de  $\beta$ -galactosidasa en los lisosomas de las células afectas, siempre que no sean líneas tumorales o inmortalizadas (Dimri et al., 1995).

Se siguió el procedimiento descrito por Debacq-Chainiaux et al. (Debacq-Chainiaux, 2009), que se ha venido empleando para diversas líneas primarias como buena aproximación del número de células senescentes.

No obstante la  $\beta$ -galactosidasa lisosomal aumenta su concentración cuando la confluencia celular es alta (Severino et al., 2000), por lo que se intentó hacer las medidas antes de alcanzar una alta confluencia en placa.

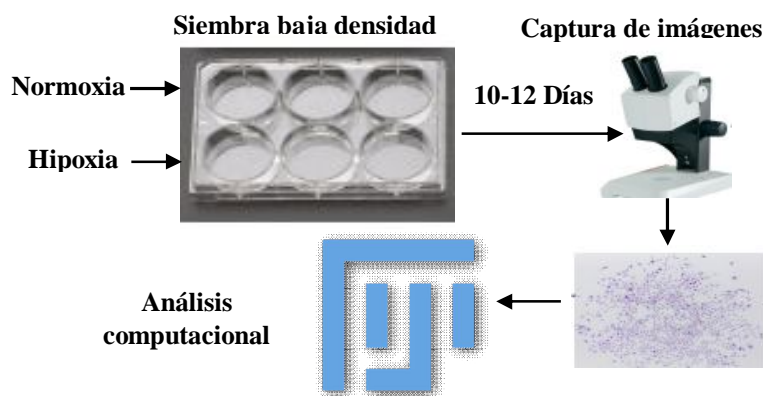
## 7.9 Clonogenicidad

Se testó la capacidad de las células para formar colonias de gran tamaño en diferentes condiciones. Dado que en sangre circulan de forma casi aislada esta propiedad es otra aproximación para determinar su potencial utilidad terapéutica.

Como las colonias debían surgir a partir de una única célula, se recurrió a una siembra muy diluida, poniendo entre 7 y 15 células por  $\text{cm}^2$ . El número de células así sembradas

es muy aproximado, pues es tan bajo que exige una serie de diluciones que, inevitablemente, llevan asociado un error alto. Por ello no nos interesamos en el número de colonias formadas, sino en la extensión de las mismas, medido como el número de células por colonia y hallando la distribución de estos números para todas las colonias formadas en cada condición testada.

Tras un período de crecimiento de entre 10 y 15 días cambiando el medio cada 5 días las células se fijan con glutaraldehído al 1% previo lavado con PBS. Las células así fijadas se tiñen con cristal violeta y se procede a la búsqueda visual de las colonias empleando una lupa LEICA EZ4 HD y fotografiado de las mismas. Estas colonias fotografiadas se contabilizan mediante una serie de instrucciones (macro que se incluye en el Anexo I.) desarrolladas al efecto en el software libre ImageJ (ver Figura 17).



**Figura 17: Proceso del ensayo clonogénico.**

Los datos se muestran como la distribución de los diferentes tamaños de colonias obtenidos para cada línea y pase comparando las condiciones testadas. Se muestra tanto una representación en histograma para ver la distribución de las colonias por tamaños así como por cuartiles para facilitar la comparación entre las condiciones. Para el cálculo de diferencias significativas se ha empleado el test de Kolmogorov-Smirnov, dado que las distribuciones no seguían la normalidad, empleando el programa de análisis estadístico SPSS v15 de IBM (Armonk, Nueva York, Estados Unidos). Se han separado los datos según pases e ignorando las agrupaciones celulares de menos de 25 células siguiendo el criterio de Ingram et al. (Ingram, 2004).



## 7.10 Western-Blot

En un intento de comprobar el papel de HIF1 y HIF2 en la respuesta a hipoxia observada se pensó en medir la concentración proteica del mismo mediante Western-Blot. Dado que el principal procedimiento de regulación del mismo es la destrucción de la proteína traducida la detección directa parecía la más apropiada.

### 7.10.1 Obtención de proteína

Para la extracción de la proteína se trabajó en frío y añadiendo 200  $\mu$ M  $\text{CoCl}_2$  sobre todos los reactivos. Se hizo un lavado con PBS, seguido del tampón de lisis RIPA (Wako Pure Chemicals, Osaka, Japón) con inhibidores de proteasas cOmplete™, Mini, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail (Merck, Darmstadt, Alemania). La superficie se raspa y el contenido es homogeneizado y centrifugado a 14.000g, 15min a 4°C para precipitar todo el material insoluble, principalmente lípidos. El sobrenadante se alícuota y congela a -80°C.

Para la obtención de la proteína se empleó un protocolo algo más complejo al habitual debido a que la proteína a medir (HIF) es extraordinariamente sensible a la presencia de oxígeno si no se añaden inhibidores. Se estima que su supervivencia es de unos 10 minutos antes de ser indetectable por completo (Berra et al., 2001). Por lo tanto la placa con las células creciendo en las condiciones a testar se llevó rápidamente a la campana de trabajo donde se mantuvo en hielo a lo largo de todo el proceso y se trabajó con celeridad (todo el procedimiento hasta la obtención de la muestra debe durar menos de esos 10 minutos).

Se incluyó el  $\text{CoCl}_2$  por ser un inhibidor de las proliil-hidroxilasas que inician el procedimiento que queremos detener, tal y como se ha explicado en los apartados 5.4.3 Respuesta a Hipoxia y 5.4.4 Inductores Químicos de Hipoxia. El RIPA se añadió a tan sólo 6-7 $\mu$ L de tampón de lisis por  $\text{cm}^2$  de cultivo con el objetivo de lograr una alta concentración en la muestra final.

Tras algunos intentos infructuosos comenzamos además a concentrar las muestras de proteína aún más en filtros microcon de exclusión molecular que elimina con el disolvente las proteínas menores a 30KDa, Amicon Ultra-30KDa (Merck, Darmstadt, Alemania). La proteína que nos interesa, HIF1 $\alpha$ , tiene un peso molecular en torno a los 120KDa.

### 7.10.2 Medida de la concentración de proteína

La concentración de las muestras proteicas así obtenidas no pudo hacerse mediante el protocolo de Bradford, habitual en estos casos, al tener las muestras los detergentes del buffer RIPA que afectan a la medida. Se recurrió a un kit comercial de ácido biquinónico (BCA), Micro BCA Assay kit (ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos) siguiendo las instrucciones del kit. La técnica del BCA adolece de una relación lineal algo peor pero es más resistente a los reactivos empelados. Esta medida se realizó en espectrofotómetro midiendo absorbancia a 562 nm.

### 7.10.3 Incubación con anticuerpos

Tras un procedimiento de electroforesis en gel de poliacrilamida y transferencia a membrana PVDF, se procedió a la incubación con anticuerpos específicos.

Se recurrió a un sistema de anticuerpo primario específico para HIF1 $\alpha$  y secundario marcado con la enzima peroxidasa. Como las medidas no fueron exitosas se hicieron hasta 28 intentos, llegando a testar 3 anticuerpos primarios diferentes en combinación con 4 anticuerpos secundarios diferentes. Ambos a diferentes concentraciones. Asimismo se probaron diferentes concentraciones de detergente en las soluciones de lavado, tanto con base de PBS como TBS, y aplicando diferentes números de lavados de diferentes tiempos. También se empleó en diversas pruebas tanto leche desnatada en polvo diluida como disoluciones de albúmina sérica bovina como solución de bloqueo. La concentración de proteína total cargada también fue una de las variables modificadas en estos ensayos.

Todos estos intentos resultaron en resultados no concluyentes. No obstante, estamos bastante convencidos de la idoneidad de los procedimientos testados pues se incluyó en varios casos un control positivo comercial de extracto proteico de células HeLa expuestas a hipoxia que proporcionó una intensa señal positiva, vendido como lisado nuclear ab180880 por Abcam (Cambridge, Reino Unido).

Asimismo también se emplearon anticuerpos frente a HIF2 $\alpha$  para la búsqueda de esta otra proteína. Empleando los mismos anticuerpos secundarios, se hicieron pocas medidas en este caso, se muestra la más representativa. Se escogieron anticuerpos frente a Actina como control en todas las medidas mencionadas. Esta proteína sí se detectó con facilidad.

Los anticuerpos empleados y sus características se encuentran expuestos en el

Anexo III.

## 7.11 Formación de túbulos sobre matriz basal

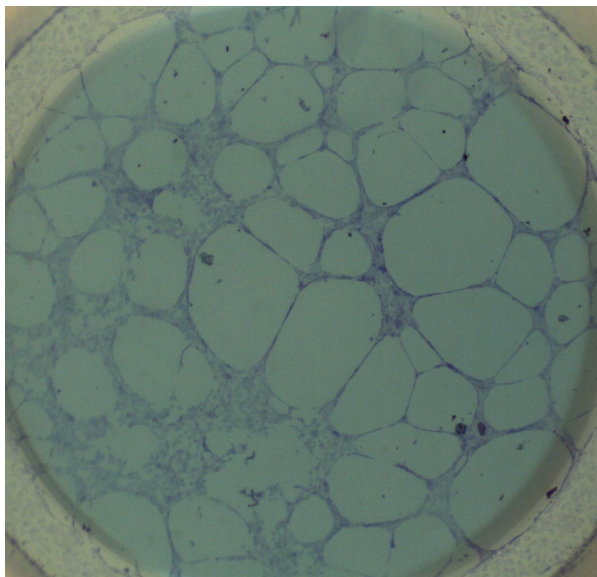
Las células de tipo endotelial forman estructuras tubulares cuando se siembran sobre matrices similares al medio extracelular. Se cuantificó la complejidad de dichas estructuras como aproximación de la utilidad de las ECFC en procesos de angiogénesis.

Para la realización de estos ensayos, en este estudio se empleó una matriz basal, denominada comercialmente “Basement Membrane Extract Cultrex” (Bio-Techne, Minneapolis, Minesota, Estados Unidos). Se trata de un extracto de la membrana basal de la línea tumoral Engelbreth-Holm-Swarm que incluye, entre otros compuestos, colágeno IV, laminina, entactina y heparán sulfato. Por encima de los 10°C esta matriz gelifica de forma irreversible.

Para realizar esta prueba primero se preparó el cultrex sobre pocillos de  $\mu$ -angiogénesis (Ibidi, Martinsried, Alemania). Se deja solidificar a 37°C durante 1 hora. A continuación se siembran 7.500 células con el medio y las condiciones que se desean observar. Tras 18 horas se procede a fijar las estructuras formadas con paraformaldehído al 3% durante 30 minutos previo lavado con PBS. Como estas estructuras se van formando por pérdida selectiva de las células adheridas, con más tiempo las estructuras formadas se degradan. Las células así fijadas se vuelven a lavar y se tiñen con colorante Cultrex (Bio-Techne, Minneapolis, Minesota, Estados Unidos). Se tomaron imágenes entonces de las estructuras empleando una lupa LEICA EZ4 HD (Leica Biosystems, Wetzlar, Alemania). Estas imágenes se procesaron con el software libre ImageJ (Schneider et al., 2012).

Como indicadores de complejidad de la estructura formada se cuantificaron los siguientes valores: Número de brazos pertenecientes a las estructuras formadas que no correspondan a células sueltas, número de uniones de dichos brazos y número de uniones donde tres de estos brazos se unen. Estas tres variables están relacionadas entre sí y son representativas del número de nodos independientes de unión en la estructura formada.

Todos estos valores se ofrecen normalizados al área de estructura analizada porque, como se ve en la Figura 18 no es aprovechable el 100% de la imagen y según el caso debe recurrirse a parte de la misma. Esto hace que los resultados se muestran en unidades arbitrarias adimensionales.



**Figura 18:** Ejemplo típico de la formación de una estructura vascular por parte de las ECFC sobre una superficie de Cultrex (teñido).

Muchas células modifican su comportamiento cuando se siembran sobre matrices de mayor similitud a las que se encuentran *in vivo* respecto del que muestran sobre superficies más comunes como plástico o colágeno. En el caso particular de las ECFC en cultivo este comportamiento se traduce en una detención de la proliferación y reestructuración para formar una red compleja, creándose importantes luces en la capa de células (ver Figura 18).

Se acepta generalmente (Arnaoutova et al., 2009) que la complejidad de esta red de túbulos es proporcional a la utilidad biológica de las células capaces de formar capilares, pues es mediante esta reestructuración que tienen esta capacidad cuando son inyectadas en los ensayos *in vivo*.



## 8 Resultados

### 8.1 Obtención de las líneas celulares

La primera meta del proyecto fue necesariamente la obtención de las líneas celulares a caracterizar. Tratándose de líneas primarias fue necesario el perfeccionamiento del procedimiento de aislamiento según la procedencia de la muestra, perfeccionar el cultivo e identificar las células obtenidas como ECFC.

#### 8.1.1 Aislamiento de las ECFC

Para la obtención de las células de este trabajo se partió de muestras de sangre humana, tanto, tanto periférica de donantes adultos como de cordón de neonatos. Para su aislamiento se siguió el protocolo ya descrito en la metodología.

Este procedimiento ya había sido llevado a cabo con éxito por parte del grupo a la hora de tratar muestras de adulto. El aislamiento de todas ellas se realizó en Normoxia empleando la fracción de MNC restante del fraccionado de una bolsa de donación. El éxito del proceso superó el 95% de las muestras recibidas, pero debe tenerse en cuenta que el material de partida era el equivalente a una bolsa de donación, habitualmente 450 mL.

De las líneas resultantes a lo largo de los ensayos que se muestran a continuación se emplearon un total de 9 líneas diferentes enumeradas como:

B16, B27, B29, BH8, BH10, BH20, BH48, BH53 y BH54.

En cuanto a las muestras de neonatos se recibieron un total de 5 bolsas de sangre de cordón umbilical con un volumen entre 30 y 50 mL por muestra. El procedimiento seguido en cada una fue similar al descrito, pudiendo según el caso ignorar el paso preliminar de dilución:

La muestra 1 procedió de un parto natural que resultó positivo en la detección de estreptococos. Se obtuvieron  $312.625 \times 10^6$  MNC. Se sembraron sobre 2 placas (157 cm<sup>2</sup> en total). Se obtiene una colonia que se pasa 22 días tras la siembra pero que no deriva en una línea estable. 25 días tras la siembra se pasan otras 3 colonias. Una no resulta en una línea estable, pero las otras 2 dieron lugar a las líneas C1.2 y C1.4.

La muestra 2 procedió de un parto por cesárea. Se obtienen aproximadamente  $8 \times 10^8$  MNC, de las cuales se siembran  $2 \times 10^8$  en 4 placas (314.15 cm<sup>2</sup> en total). Dio lugar a las

líneas C2.1 y C2.1.1, donde la línea C2.1.1 procedió de un recrecimiento de las células restantes de la colonia de la que se obtuviera la línea C2.1.

El resto de la muestra se congela en criotubos a  $-80^{\circ}\text{C}$ . De ellos se descongelan  $2 \times 10^8$  MNC tras 1284 días, pero no aparecieron colonias ECFC tras tenerlo en cultivo durante más de 24 días.

La muestra 3 procedió de un parto por cesárea. Se obtienen aproximadamente  $4 \times 10^8$  MNC, de las cuales se siembran  $3.76 \times 10^8$  en 94 pocillos de placas de 24 ( $178.6 \text{ cm}^2$  en total). Fue necesario pasar las células a superficies de mayor extensión para permitir que las colonias se extendieran hasta un tamaño apreciable. Surgieron 7 colonias, pero sólo 1 de ellas derivó en una línea viable, denominada C3. Todas las colonias se pasaron 28 días tras la siembra.

Recibimos una muestra de sangre de cordón de una cesárea problemática. Llegó con más dilación que en otros casos al laboratorio y no logramos obtener líneas de la misma.

La muestra 4 procedió de un parto natural pero cuyo cordón era demasiado corto para emplearse en trasplante. Se obtienen aproximadamente  $3.252 \times 10^8$  MNC. Se reparten todas las células sobre 12 pocillos de placas de 6 ( $115.2 \text{ cm}^2$  en total). Resulta en una colonia que no derivó en una línea estable, obtenida tras 28 días de cultivo, y otras 5 colonias que sí resultan en líneas celulares. Las líneas se enumeraron como C4.2, obtenida tras 28 días, C4.3, obtenida tras 38 días, C4.4, obtenida tras 38 días, C4.5, obtenida tras 41 días y C4.6, obtenida tras 41 días.

La muestra 5 procedió también de un parto natural pero cuyo cordón era demasiado corto para emplearse en trasplante. Se obtuvieron aproximadamente  $1.37 \times 10^8$  MNC. Se repartieron la mitad de las células sobre los pocillos de una placa de 6 ( $57.6 \text{ cm}^2$  en total) que se mantuvo en Normoxia y la otra mitad en otra placa de 6 pocillos ( $57.6 \text{ cm}^2$  en total) mantenida en hipoxia 5%. De Normoxia obtenemos la línea C5.1 pasados 16 días tras la siembra. Posteriormente los restos de esa colonia recrecen y resultan en la línea C5.3 que se pasó 23 días tras la siembra. De hipoxia 5% obtuvimos la línea C5.2 pasados 16 días tras la siembra (si bien era una colonia algo menor que la que produjo la línea C5.1). Tal y como ocurriera en Normoxia los restos de la colonia recrecieron y nos permitieron sacar una nueva línea que denominamos C5.4 pasados 23 días tras la siembra.

Las células provenientes de las muestras de sangre de cordón umbilical presentaban en general un tamaño menor que aquellas provenientes de muestras de sangre periférica de adulto en el momento de su aislamiento.

### 8.1.2 Cultivo de las ECFC

Para el cultivo de las ECFC se empleó medio EGM-2. Sin embargo, como se ha descrito en la metodología, se realizó una medida preliminar de acuerdo a publicaciones previas sobre el efecto de la hidrocortisona en el medio (Kang et al., 2017).

Se llevaron a cabo pruebas de proliferación a tiempo corto con o sin hidrocortisona añadida en el medio. Las células provenientes de cordón mostraron un ligero detrimento en presencia del compuesto que se muestra en la Figura 19. Por lo tanto, a lo largo de todo el proyecto, no se añadió este componente cuando se trabajó con ECFC procedentes de sangre de cordón umbilical, mientras que sí se incluyó sobre las líneas de adulto, donde este efecto perjudicial no tiene lugar.

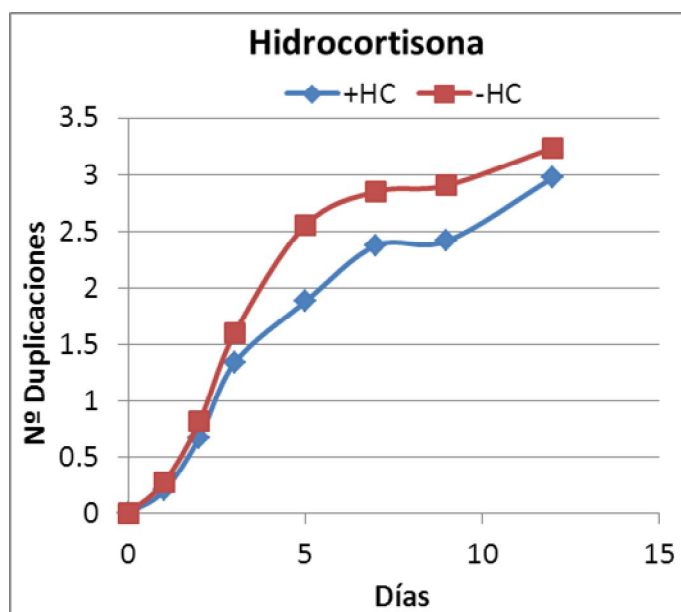


Figura 19: Prueba de crecimiento de ECFC procedentes de sangre de cordón umbilical en medio con (+HC en azul) y sin (-HC en rojo) hidrocortisona.

### 8.1.3 Caracterización de las ECFC

Como se ha explicado en la introducción la identificación de las ECFC resulta problemática, por lo que se llevaron a cabo todas las pruebas descritas en el apartado 7.1.3 Caracterización de ECFC. Esto incluye; morfología, formación en el tiempo esperado de la colonia original, marcaje de superficie, unión a lectina y captación de



LDL-acetilado tal. Se determina que se trata de ECFC en todos los casos dando los resultados esperados. Estas medidas, por ser todas similares, no se muestran aquí.

Además se estudió la proliferación de las líneas obtenidas como una de las medidas para caracterizarlas. Cuando atendemos a su crecimiento continuado en las condiciones habituales de cultivo, esto es Normoxia, se obtuvieron los siguientes resultados resumidos en la Tabla 1. Más adelante se muestran estos ensayos de crecimiento en mayor detalle (ver Figura 21).

**Tabla 1: Resumen del crecimiento en condiciones control (Normoxia) para las diferentes líneas que se han empleado a lo largo del estudio.**

Línea	Fecha inicio	Fecha final	Máximo número duplicaciones	Pase inicio	Pase final	Tiempo de duplicación en fase exponencial	Observaciones
C1.2	20170318	20140422	7.819936	4	11	45.28302	
C1.2	20180219	20180321	7.920942	7	13	66.31666	
C1.4	20140310	20140519	25.99716	4	19	11.01726	
C2.1	20140320	20140516	28.74024	2	14	27.26653	
C2.1	20140522	20140613	13.45664	6	11	33.63229	No alcanza senescencia
C2.1	20150130	20150327	6.597026	9	18	11.8087	
C2.1.1	20140327	20140414	12.38993	3	7	28.45962	No alcanza senescencia
BH10	20170515	20170613	9.769806	6	12	55.86592	
C4.2	20151123	20151223	6.048136	5	11	21.33523	
C4.3	20151130	20151221	5.832004	5	9	19.96506	No alcanza senescencia
BH20	20140114	20140221	11.35136	2	10	12.1599	
C5.1	20161118	20161214	7.562917	0	4	67.5866	No alcanza senescencia
C5.2	20161118	20161212	8.122538	0	4	81.57716	No alcanza senescencia
B29	20170208	20170303	4.975708	1	4	57.66458	No alcanza senescencia
BH54	20170925	20171009	6.084195	1	4	53.47594	No alcanza senescencia
BH20	20171107	20171222	16.34221	1	10	45.54944	No alcanza senescencia

Como ocurre al trabajar con cualquier línea primaria, hay una variación importante. No obstante, si atendemos a al tiempo de duplicación que cada línea muestra en su fase de crecimiento exponencial, escogiendo en todo caso los pases tempranos, se obtiene la distribución que se puede ver en Figura 20 B. Aquí se observa que, salvo excepciones, las líneas procedentes de la sangre de cordón umbilical poseen unos tiempos de duplicación menores que aquellos procedentes de sangre periférica de adulto. Del mismo modo, atendiendo al número de pases que se alcanzan, en aquellos ensayos donde se llega al límite, se puede observar que las líneas procedentes de de la sangre de cordón umbilical

alcanzan generalmente pases mayores que aquellos procedentes de sangre periférica de adulto (ver Figura 20 A).

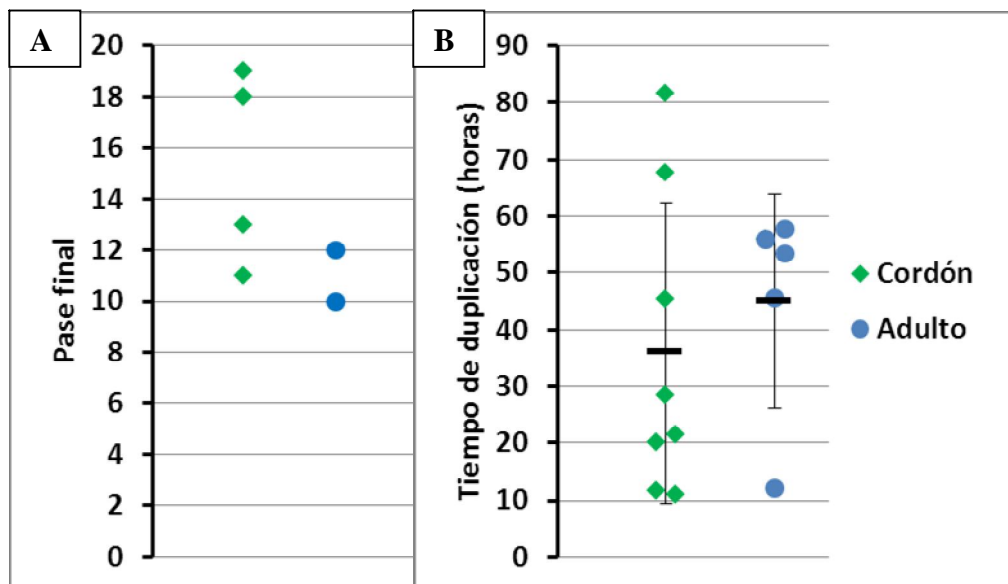
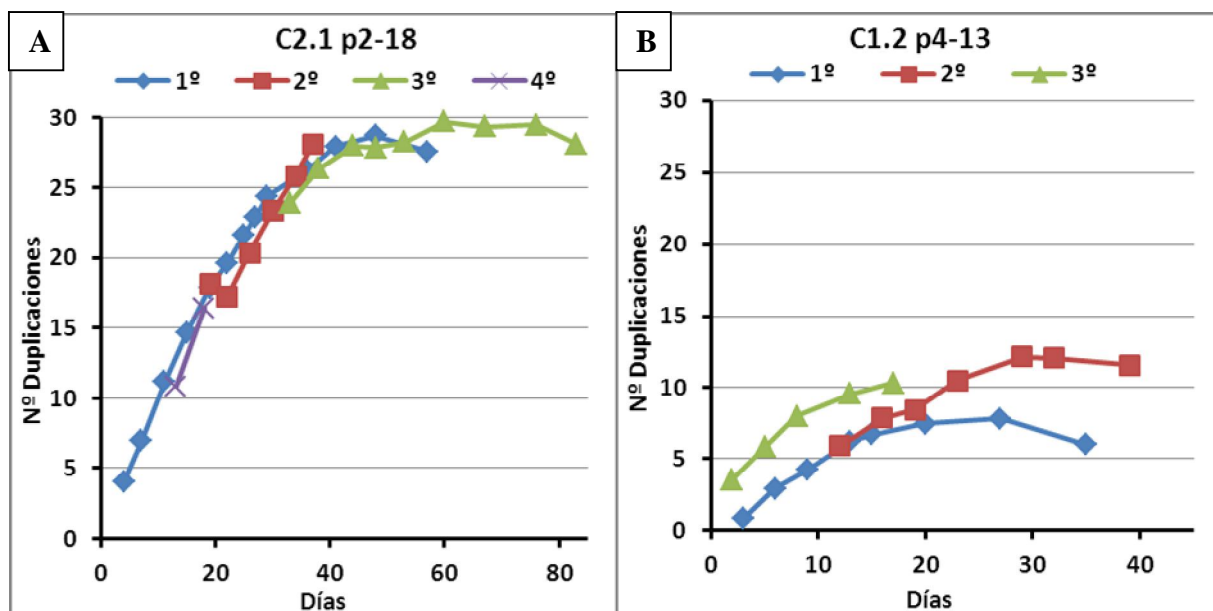


Figura 20: A) Pase final alcanzado, si se alcanzó, por las líneas. B) Tiempos de duplicación en fase exponencial obtenidos para cada línea en condiciones control. Se muestra en verde las líneas provenientes de cordón y en azul las provenientes de adulto

Algunas de estas líneas presentan varias entradas en la Tabla 1 debido a que, una vez obtenida la línea, parte de las células se congelaran en nitrógeno líquido. Más adelante, para la realización de diversas comparaciones se repitieron las correspondientes curvas de crecimiento control en Normoxia que se muestran. Una representación gráfica del crecimiento de todas las muestras proporciona los siguientes detalles en la Figura 21:



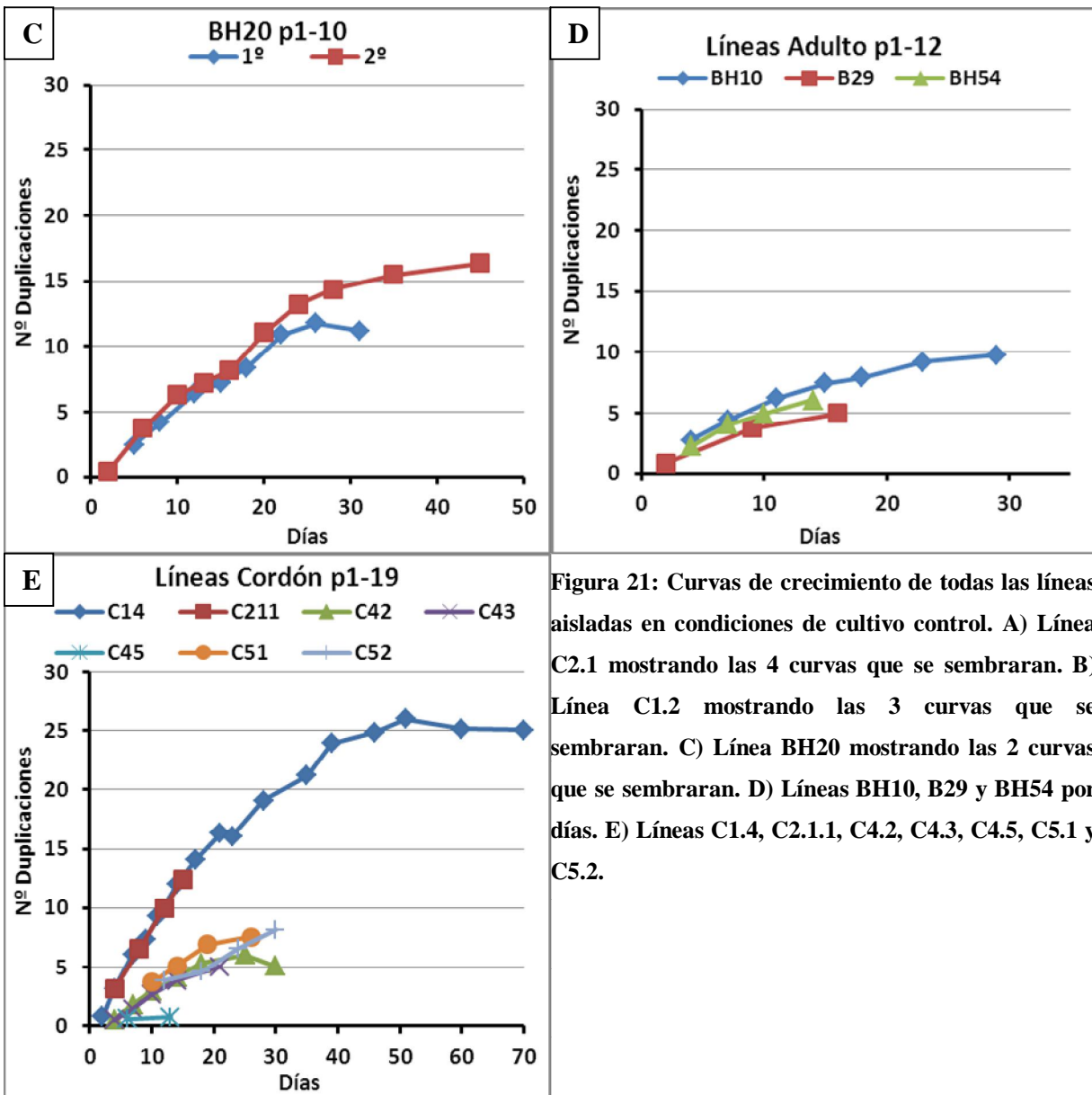


Figura 21: Curvas de crecimiento de todas las líneas aisladas en condiciones de cultivo control. A) Línea C2.1 mostrando las 4 curvas que se sembraron. B) Línea C1.2 mostrando las 3 curvas que se sembraron. C) Línea BH20 mostrando las 2 curvas que se sembraron. D) Líneas BH10, B29 y BH54 por días. E) Líneas C1.4, C2.1.1, C4.2, C4.3, C4.5, C5.1 y C5.2.

Se puede observar, especialmente en el caso de la línea celular C21, que los valores obtenidos en estas pruebas de crecimiento no varían significativamente cuando se trata de una misma línea aunque haya permanecido meses en nitrógeno líquido. Siempre que se maneje con los protocolos apropiados.

También queda patente lo que se introducía antes, que hay una gran variación entre líneas, con tendencia a un crecimiento mayor por parte de las células procedentes de cordón.

### 8.1.4 Medida de ALDH

Empleando la línea de adulto BH20 se hizo una medida a lo largo de los pases 4, 6 y 9 para determinar el nivel de actividad ALDH. La presencia de esta enzima se correlaciona con bajos niveles de diferenciación, es decir, si el cultivo mantiene propiedades de célula madre. El resultado se expone en la Figura 22.

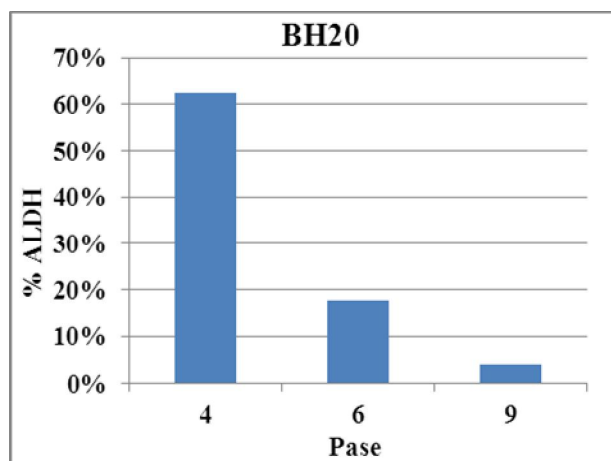


Figura 22: Nivel de actividad de ALDH en los pases 4, 6 y 9 de la línea BH20.

Conforme transcurren los pases, el porcentaje de células que mantienen actividad de ALDH disminuye de forma importante.

## 8.2 Desarrollo de modelo individualizado de angiogénesis

Dentro de las varias utilidades que pueden tener las ECFC, una de interés es su empleo como modelo del endotelio. Esto se debe a que su comportamiento en cultivo es similar a aquel pero, gracias a su elevada proliferación, se puede obtener líneas de un paciente concreto, con el amplio abanico de posibilidades que eso supone.

Nuestra aproximación consistió en el desarrollo de un modelo de angiogénesis personalizada. Para ello se recurrió a un modelado tridimensional mediante el empleo de esferoides de las ECFC en cultivo. Adaptando el procedimiento empleado en otras líneas celulares se siguió la metodología descrita en el apartado 7.2 Manejo de los Esferoides.

Los esferoides formados mediante el procedimiento de gota colgante se formaron correctamente y sin complicaciones de importancia. Fue posible formarlos tanto a 1.500 células en un volumen final de 50  $\mu$ L como máximo hasta 500 células en un volumen final de 10  $\mu$ L. Es posible que sea posible crear esferoides más grandes, pero buscábamos

un volumen lo más pequeño posible para reducir costos de los posibles ensayos que se fueran a desarrollar.

### 8.2.1 Control mediante nanopartículas ferromagnéticas

Un problema que deriva del uso de esferoides en ensayos de tipo tridimensional es la necesidad de hacer muchas repeticiones para que la localización del esferoide en el medio sea idónea. Se consideró que este obstáculo sería minimizable si fuese posible controlar de forma indirecta la posición exacta de los esferoides al inicio del ensayo.

La solución planteada fue la internalización de nanopartículas ferromagnéticas por parte de las ECFC a testar. Esto permitiría posteriormente controlar con imanes el esferoide. Sin embargo en la mayoría de los casos las nanopartículas que pueden ser internalizadas por las células tienen efectos perjudiciales sobre el crecimiento celular.

Se testó en cultivo esta posibilidad. Efectivamente, el crecimiento celular se veía reducido bajo el microscopio y los valores de apoptosis aumentaron de forma dependiente a la concentración como se muestra en la Figura 23.

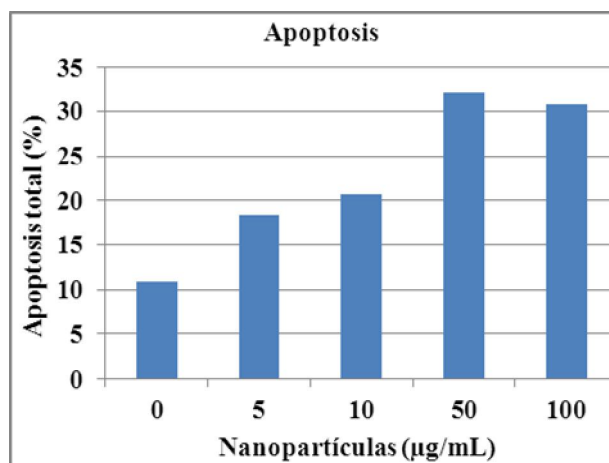
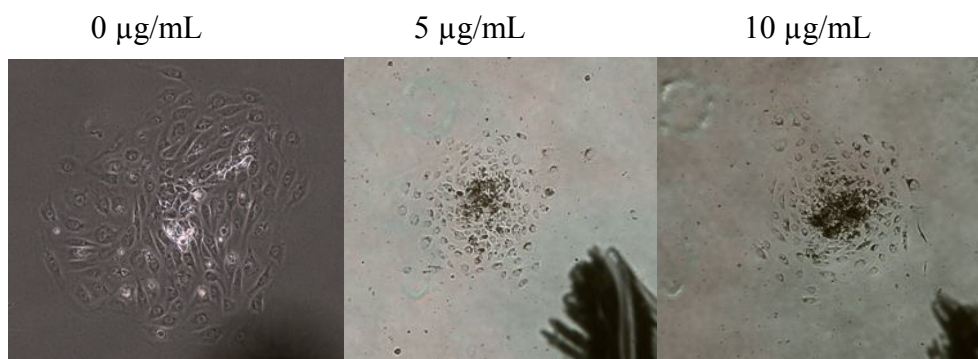


Figura 23: Efecto de las nanopartículas sobre la apoptosis

Observado el efecto se decidió testar si las concentraciones más bajas (5 y 10 µg/mL) afectan a la formación de esferoides, pero no hubo problemas en su formación. Se comprobó también que las células que los conformaban eran viables resembrando los esferoides sobre placas de cultivo con recubrimiento de colágeno y comprobando que se formaba una colonia a partir de los esferoides (Figura 24).



**Figura 24: Colonias de la resiembra de esferoides.**

Se comprobó además en este mismo ensayo que los esferoides formados habían internalizado las nanopartículas, pues mediante un imán fue posible moverlos por la placa antes de permitir que derivaran en la colonia. No obstante los esferoides con nanopartículas formaron colonias más pequeñas y sólo con éxito 24 horas tras la formación del esferoide, mientras que la condición control llegó a formar una colonia manteniendo el esferoide en la gota colgante hasta 72 horas.

Para poder reducir en la medida de lo posible la necesidad de exponer las células a las nanopartículas con claros efectos perjudiciales se decidió hacer una serie de pruebas con dos poblaciones celulares. Una de las poblaciones se cultivaría con nanopartículas mientras que la otra se cultivaría sin ellas para posteriormente combinarlas en un solo esferoide mezcla. De esta forma se mantendría el control de la posición mediante imanes y a un tiempo mantener un importante porcentaje de las células del esferoide inmunes a sus efectos negativos.

Fue posible condicionar magnéticamente la posición del esferoide con un porcentaje de hasta tan sólo el 20% de las células cultivadas durante 24 horas con 5 µg/mL. Esta fue la condición más diluida testada y, si bien fue exitosa, el movimiento era ya tenue, por lo que mayores diluciones probablemente no sean recomendables.

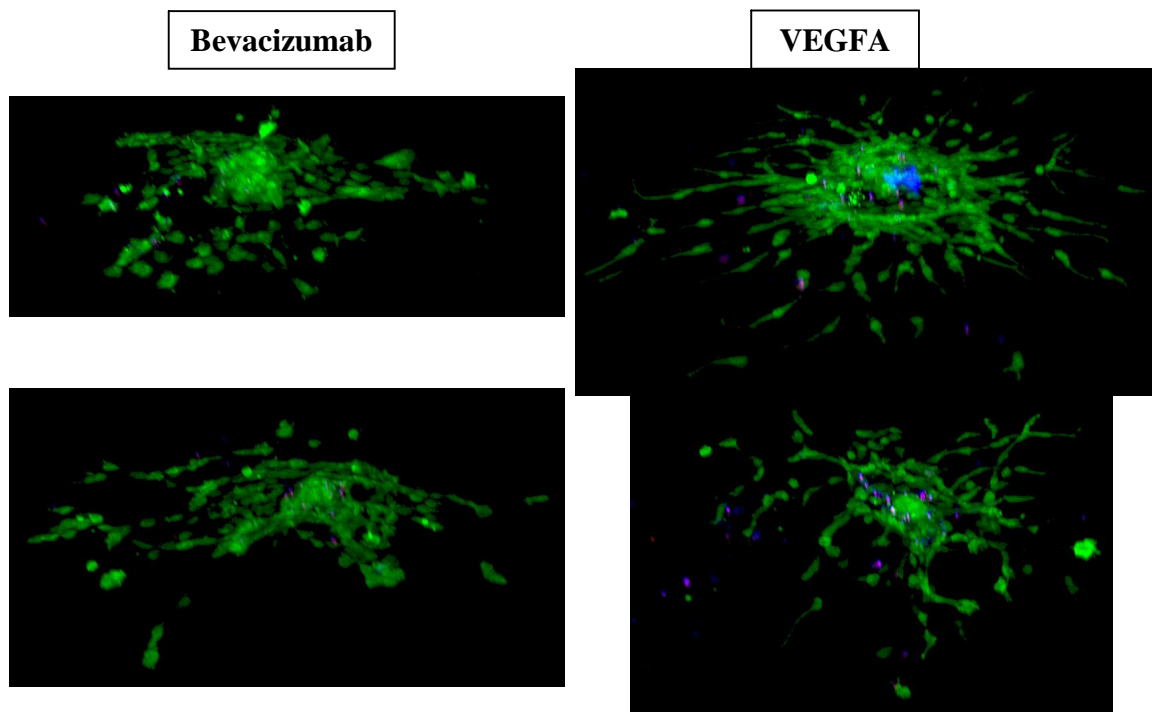
### **8.2.2 Pruebas de angiogénesis tridimensional**

Siguiendo el procedimiento descrito en 7.2.3 Angiogénesis tridimensional se hicieron varias pruebas para determinar las condiciones más apropiadas en las que realizar el ensayo. Dichas pruebas se hicieron sobre placas de 96 pocillos empleando la línea C2.1 en pase 6 y BH20 en pase 9.

En cuanto a la matriz se encontró que el colágeno mostraba mayores diferencias que el matrigel. La concentración que más facilitó la formación de las extensiones buscadas fue

de 0.8 mg/mL. Estas condiciones parecían ser apropiadas tanto para las ECFC procedentes de cordón como las procedentes de adulto.

Determinadas estas condiciones se pasó a realizar ensayos sobre placas de Ibidi de menor superficie, empleando ahora células de la línea C2.1 modificada para expresar GFP que se muestra más adelante en el apartado 8.3.1 Comprobación de la eficacia. Se tomaron imágenes mediante microscopía confocal de fluorescencia y se reconstruye la imagen tridimensional formada. De las obtenidas se muestran las 2 más representativas de cada condición en la Figura 25.



**Figura 25: Reconstrucción del modelo de angiogénesis tridimensional. Las reconstrucciones guardan proporción entre sí.**

Se observa que la extensión del esferoide es mayoritariamente en el plano transversal a partir del esferoide central. No obstante se aprecian importantes diferencias, con extensiones formadas en gran número en el caso que incluyó VEGFA en el medio, mientras que la condición que incluyó Bevacizumab presenta una extensión menos pronunciada que además es continua sin las estructuras típicas de la angiogénesis.

Todo ello da idea de que el modelo de angiogénesis tridimensional es exitoso con las ECFC y puede adaptarse al modelizado individual que se desea.

### 8.3 Modificaciones terapéuticas de las ECFC

Como se ha explicado en la introducción de este trabajo, un obstáculo grave del uso de las ECFC en terapia celular es que, conforme se conoce en mayor profundidad su función, se ha comprobado que ésta está reducida en gran número de las patologías donde su actuación se hace necesaria (Fadini et al., 2012; Fu et al., 2015). Una de las alternativas que se ha planteado es la modificación de las ECFC aisladas del paciente para aumentar algunas de sus características antes de la reintroducción (Goto et al., 2016; Ye, 2015).

Siguiendo este razonamiento se comprobó la posibilidad de emplear vectores lentivirales para este fin. Su empleo, explicado en el apartado 7.3 Transducción de la metodología, es relativamente sencillo y rápido para la introducción de genes funcionales en líneas eucariotas.

Primeramente se comprobó que el medio necesario para la internalización de los lentivectores permitiera la supervivencia de las ECFC. Como debe retirarse el suero para mejorar la eficiencia, se empleó el medio OptiMEM complementado con insulina, transferrina y selenio. Se llevó a cabo una curva de crecimiento a tiempo muy corto tomando valores a tiempos 0, 1, 15 y 24 horas comparando este medio frente al EGM-2 con suero habitual.

El resultado, que se muestra en la Figura 26, indica que las ECFC testadas no proliferan con el medio OptiMEM, pero hasta pasadas al menos 15 horas tampoco disminuye su número respecto de las originales. Como el procedimiento de transducción seguido sólo requería que las células permanecieran en este medio durante 7 horas se procedió con el mismo como se ha descrito en la metodología.

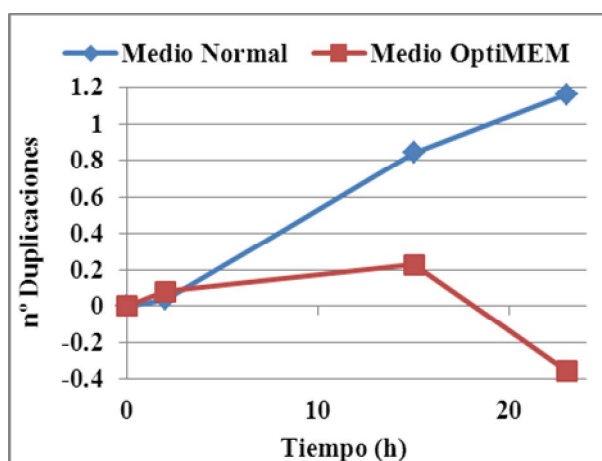


Figura 26: Medio EGM-2 vs medio OptiMEM sobre las ECFC.



### 8.3.1 Comprobación de la eficacia

Comprobada la posibilidad de llevar cabo la modificación el siguiente paso consistió en determinar la eficacia del mismo. Se empleó la línea procedente de cordón C2.1 en su pase 6 y la línea procedente de adulto B29 en su pase 3. Siguiendo el procedimiento de transducción descrito, se introdujo la proteína fluorescente verde.

Posteriormente las células modificadas se analizaron mediante microscopía de fluorescencia así como citometría de flujo. En la Figura 27 se muestra las observaciones de fluorescencia en microscopía (con DAPI) mostrando una clara señal verde. También se muestra un valor cuantificado de las células mediante citometría de flujo inmediatamente tras la transducción así como 2 pases tras la transducción.

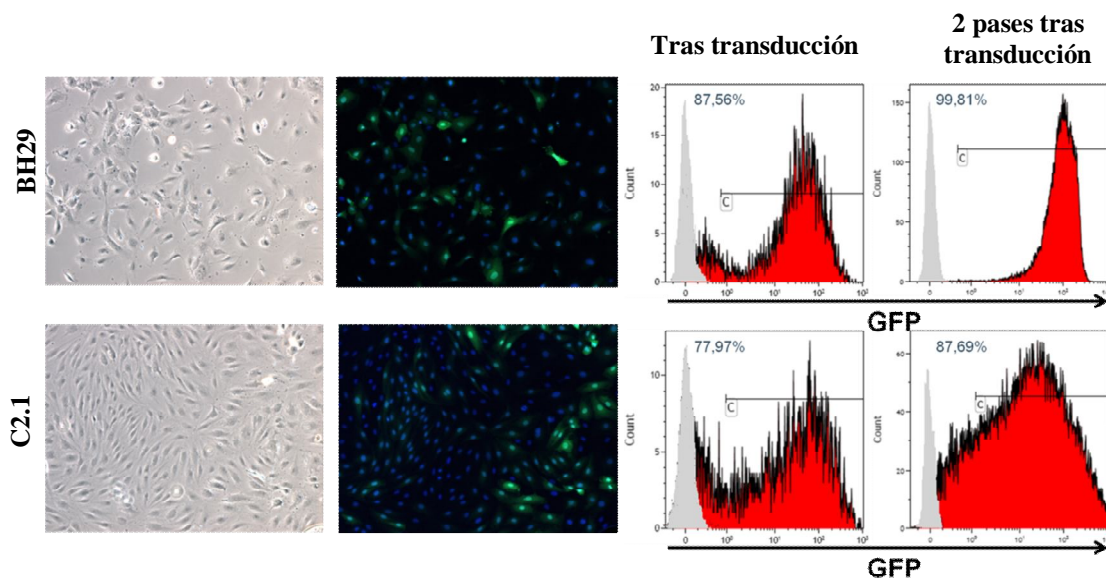


Figura 27: Medidas de microscopía (izquierda) y citometría (derecha) de las líneas transducidas con GFP.

De estas medidas queda claro que el éxito en la transducción es casi completa en la línea de adulto (99.81% de las células emiten señal GFP) y también muy alta en la de cordón (87.69%) pudiéndose concluir que la técnica empleada para la modificación genética de las células es exitosa.

### 8.3.2 Transducción de factores proangiogénicos

Finalmente se probó a introducir genes codificantes de péptidos proangiogénicos también sobre la línea C2.1 pase 6 y la línea B29 pase 3. Se obtuvieron un total de 4 sublíneas a partir de cada una; una línea control sin ningún gen introducido, una línea con el gen de la AM, otra con el gen de la PPAM y otra más con el gen FGF2. Líneas modificadas sobre

las que se realizaron una serie de ensayos comprobando si cambiaban sus características con respecto al control.

### 8.3.3 Proliferación en pases sucesivos

Como se ha indicado en la metodología, la proliferación se midió tanto a tiempos largos en pases sucesivos como a tiempos cortos observando un pase concreto.

Realizando un seguimiento de las líneas transducidas en los pases que se mantuvieron en cultivo se obtuvo la curva de crecimiento que puede observarse en la Figura 28.

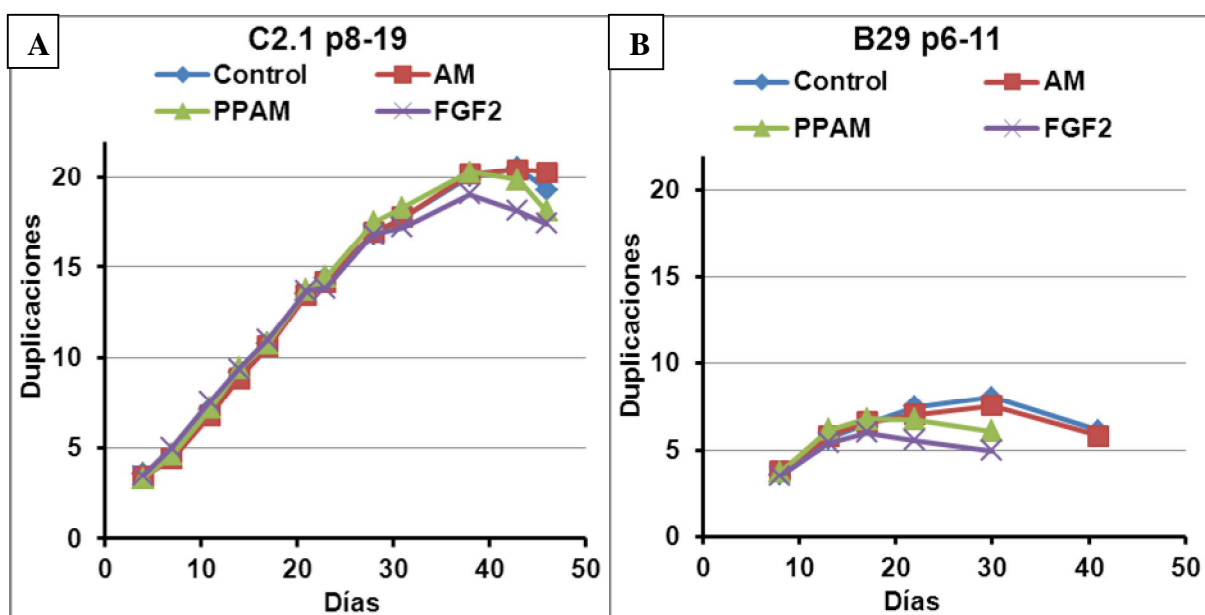


Figura 28: Curva de crecimiento en pases sucesivos de las líneas C2.1 (A) y BH20 (B) transducidas con los genes AM, PPAM, FGF2 y control.

La línea de cordón también se mantuvo en crecimiento sin pasar por el proceso de transducción, en ese caso se mantuvo desde el pase 8 hasta el pase 19 antes de que nos deshicieramos de ellas, si bien en el pase 18 su crecimiento ya se había detenido. Esto supone un número de pases similares a la línea con la modificación génica. No hubo tampoco grandes diferencias entre las diferentes líneas transducidas salvo una parada más temprana del crecimiento para las líneas con FGF2 y PPAM.

La línea de adulto creció sensiblemente menos que su equivalente de cordón. Desde el pase 6 hasta el pase 11 en el caso de las líneas control y AM pero sólo hasta el pase 10 en el caso de las líneas PPAM o FGF2. No podemos en este caso comparar con la línea sin el proceso de transducción dado que no se mantuvo en crecimiento hasta su límite. En este caso la menor viabilidad a largo plazo de las líneas con los genes PPAM o FGF2 en

comparación con las líneas control o AM parece ser aún más acusada que en el caso de las líneas de cordón.

Tomando los valores de la zona exponencial de la curva obtenemos los valores de tiempos de duplicación promedio para todo el tiempo que estuvieron en crecimiento mostrados en la Tabla 2:

**Tabla 2: Tiempos de duplicación del crecimiento a pases sucesivos.**

C2.1	Control	AM	PPAM	FGF2
Tiempo duplicación (horas)	12.880	12.600	12.440	13.729
ptos usados	10	10	10	10
B29	Control	AM	PPAM	FGF2
Tiempo duplicación (horas)	22.550	27.447	24.691	35.529
ptos usados	5	5	4	4

### 8.3.4 Proliferación a tiempos cortos

Se realizó un ensayo de la cinética de crecimiento de las diferentes líneas transducidas. Se realizó sobre el pase 8 de las líneas de C2.1 y el pase 6 de las líneas B29. Como se puede apreciar en la Figura 29 no hubo diferencias sustanciales en el crecimiento a tiempo corto aparte de una ligera tardanza por parte de las muestras FGF2 de B29 y control de C2.1 en alcanzar el ritmo de crecimiento del resto de las muestras. Vemos una fase de adaptación, tenue en el caso de las muestras PPAM y FGF2 de C2.1, seguido de una fase de crecimiento exponencial. La fase de estabilización no parece alcanzarse en el tiempo testado.

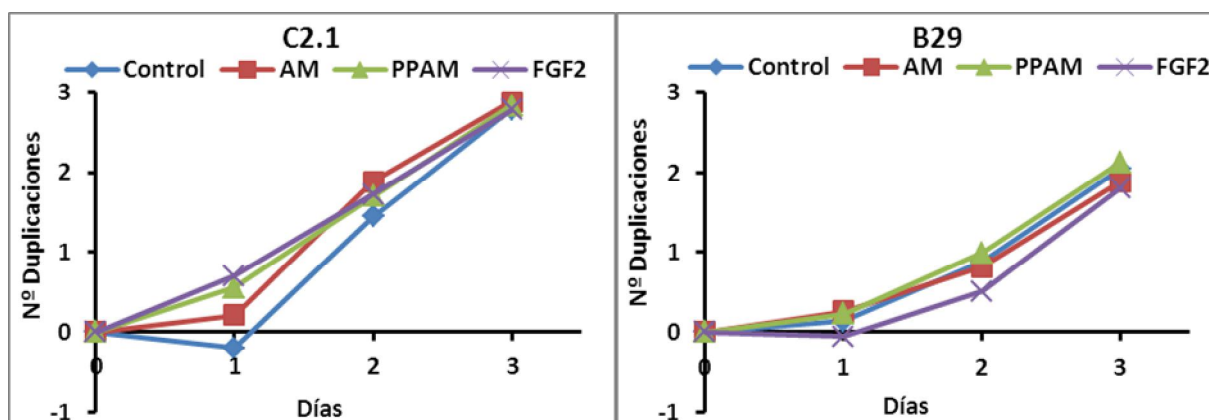


Figura 29: Crecimiento de las células transducidas. Línea C2.1 en su pase 8 y B29 en su pase 6.

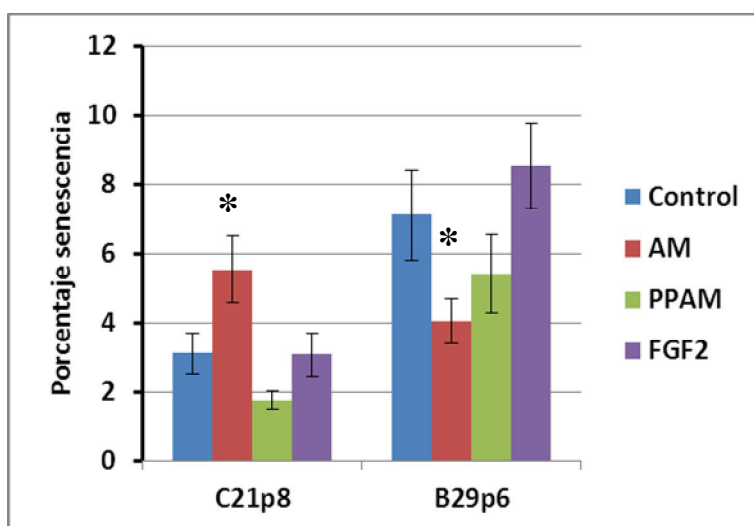
Si extraemos la pendiente de la zona exponencial, esto es ignorando el primer punto, se obtienen los valores de la Tabla 3. Los valores para los tiempos de duplicación de B29 no difieren significativamente de aquellos vistos en la curva de crecimiento de pases sucesivos (ver Tabla 2) con excepción de la línea B29 transducida con el gen FGF2, que a los 2 pases comienza a decaer aumentando mucho el valor de tiempo de duplicación promedio. Por contra a tiempos cortos el valor de tiempo de duplicación para las líneas transducidas de C2.1 es bastante mayor para los 4 casos comparados con aquellos de pases sucesivos.

**Tabla 3: Tiempos de duplicación obtenidos de la línea C2.1 en su pase 8 y la línea B29 en su pase 6.**

C21	Control	AM	PPAM	FGF2
Tiempo duplicación (horas)	16.097	17.967	21.090	23.088
Ptos usados	3	3	3	3
B29	Control	AM	PPAM	FGF2
Tiempo duplicación (horas)	25.192	29.520	25.308	25.851
Ptos usados	3	3	3	3

### 8.3.5 Ensayo de senescencia

En el mismo pase que se hiciera el ensayo de proliferación a tiempo corto, pase 8 para las líneas de C2.1 y pase 6 para las de B29, se hizo un ensayo para medir la senescencia observada (ver Figura 30) sembrando 10.000 células por pocillo y manteniendo en cultivo 24 horas.



**Figura 30: Senescencia en las líneas transducidas de C2.1 (pase 8) y B29 (pase 6). Las medidas cuyas diferencias son significativas respecto del control aparecen indicadas con un asterisco.**

La principal diferencia a reseñar es la línea transducida con el gen AM en cordón es la que muestra un mayor grado de senescencia (5.55% de las células), una diferencia significativa al comparar con cualquier otra condición. El equivalente AM de adulto, por contra, es el que menos senescencia muestra (4.05% de las células), en este caso también la diferencia llega a ser significativa. La significancia en este caso está calculada con el test de Student al ser la distribución normal e independiente entre grupos.

Como las líneas de C2.1 alcanzaron un número de pases viables importante, este ensayo se repitió en el pase 18 de las mismas (ver Figura 31). Como era de esperar tras 10 pases en cultivo, el porcentaje de células senescentes en todas las líneas aumentó significativamente. En este pase, era el gen AM el que presenta un menor grado de senescencia (14.90%) y FGF2 el que más (41.60%), significativamente más que el control. Reseñable es también es que la línea de control se ha mantenido a un nivel de senescencia comparable al de la línea AM.

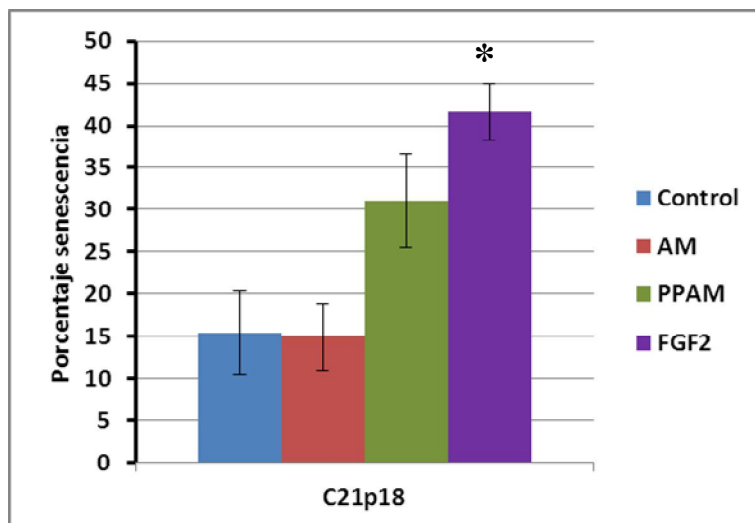


Figura 31: Senescencia en la línea transducidas de C2.1 (pase 18). Las medidas cuyas diferencias son significativas respecto del control aparecen indicadas con un asterisco.

### 8.3.6 Ensayo Clonogénico

Se realizaron ensayos clonogénicos en las líneas transducidas en los pases 8 y 9 para las de C2.1 y los pases 6, 7 y 8 para las de B29. No obstante los datos para este último pase de las líneas B29 no se muestran debido a que los tamaños de las pocas colonias formadas eran tan bajos que ninguna superaba el límite escogido de 25 células. Los detalles en los valores obtenidos se muestran en la Tabla 4.

**Tabla 4: Características de los ensayos clonogénicos sobre células transducidas. Se muestra el número de colonias (más de 25 células) y agrupaciones (menor o igual a de 25 células). Los valores media, mediana, máximo y mínimo están calculados sólo teniendo en cuenta las colonias, no las agrupaciones.**

Línea	Pase	Transducción	Días	Céls sembradas	>25	≤25	Media	Mediana	Máx	Mín
C2.1	8	Control	11	300	72	19	291.667	214	1340	27
C2.1	8	AM	11	300	109	48	332.073	158	2730	27
C2.1	8	PPAM	11	300	63	20	199.143	110	1418	31
C2.1	8	FGF2	11	300	69	32	255.768	156	1162	28
C2.1	9	Control	7	600	1046	72	238.908	174	1985	26
C2.1	9	AM	7	600	135	28	112.437	93	424	28
C2.1	9	PPAM	7	500	187	20	128.032	116	883	26
C2.1	9	FGF2	7	600	581	25	235.809	176	1861	26
B29	6	Control	10	600	65	113	60.754	47	242	26
B29	6	AM	10	600	27	88	58.889	49	125	28
B29	6	PPAM	10	600	192	135	83.557	55	814	26
B29	6	FGF2	10	600	12	60	59.250	47	168	31
B29	7	Control	12	600	12	5	252.833	164.5	640	26
B29	7	AM	12	600	26	13	167.346	111	614	27
B29	7	PPAM	12	600	87	4	711.046	399	4512	26
B29	7	FGF2	12	600	76	12	301.553	166	2446	28

Como se ha indicado en el apartado 7.9 Clonogenicidad, el número de colonias por condición no proporciona información. De hecho en una de las condiciones el número de colonias no encaja con las células sembradas, problema derivado de las diluciones seriadas necesarias para la técnica.

**Tabla 5: Número de colonias por condición de las células transducidas.**

Línea	Pase	Control	AM	PPAM	FGF2
C2.1	8	72	109	63	69
C2.1	9	1046	135	187	581
B29	6	65	27	192	12
B29	7	12	26	87	76

El reparto en formato de histograma (ver Figura 32) indica que en el caso de la líneas de adulto la línea PPAM presentaba un mayor porcentaje de colonias grandes que el resto, seguido de la línea FGF2 y siendo las colonias de AM las más pequeñas en general. En el caso de las de cordón por contra, la línea control presenta mayor porcentaje de colonias grandes, seguido de la línea FGF2.

Esto se puede ver con mayor claridad si se hace la representación por distribución (cuartiles) como se muestra en la Figura 33.

Debe notarse que las diferencias importantes entre estos dos ensayos son causados principalmente a que las células provenientes de cordón estuvieron tan sólo 6 días en

cultivo mientras que las de adulto llegaron a estar 12 días. Las células de C2.1 estuvieron tan poco tiempo porque el alto número de colonias que se formaron junto con su rápido crecimiento amenazaba con hacer las colonias indistinguibles unas de otras.

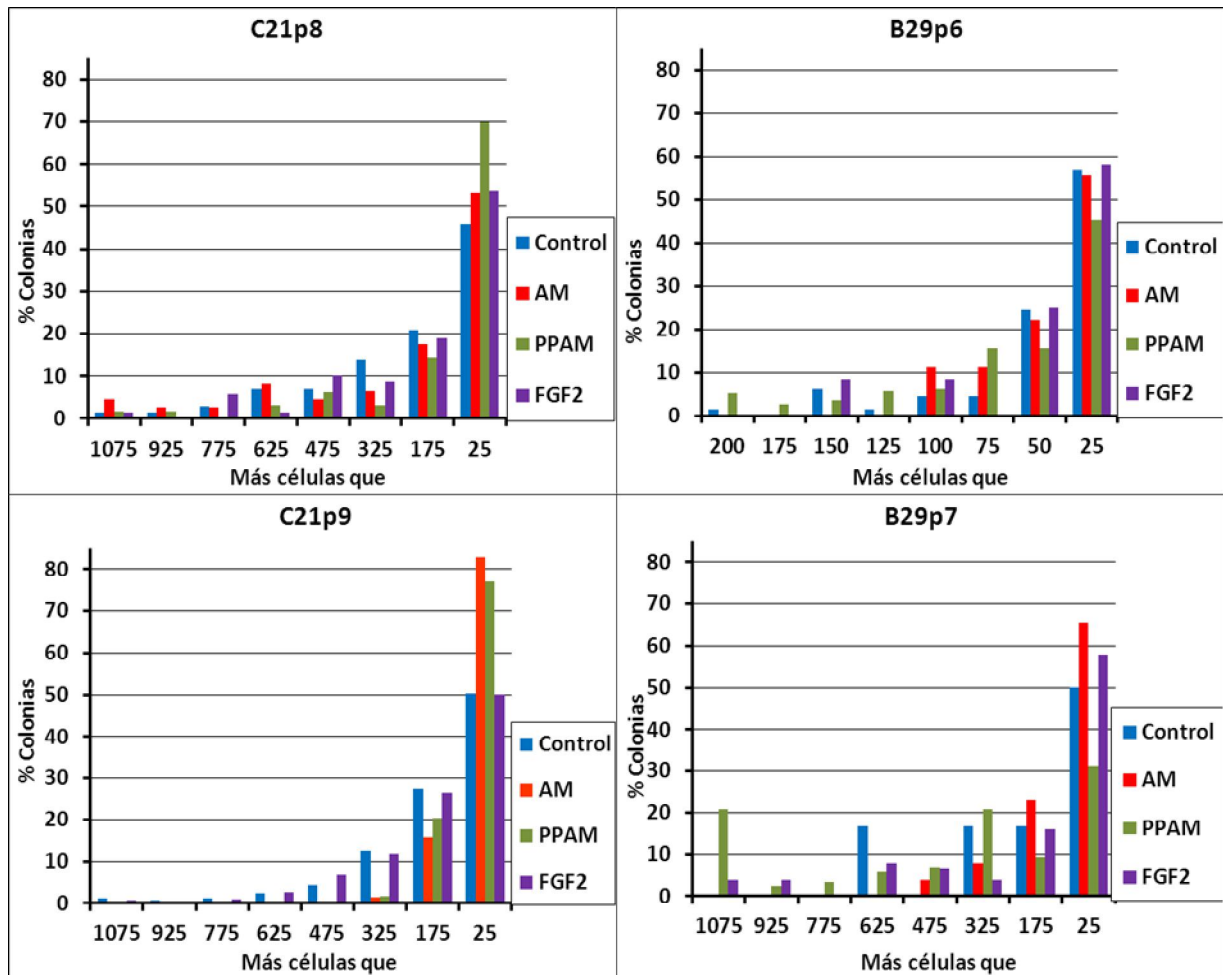


Figura 32: Histograma de los tamaños de colonias formados en el ensayo clonogénico con las líneas transducidas de C2.1 (pases 8 y 9) y B29 (pases 6 y 7).

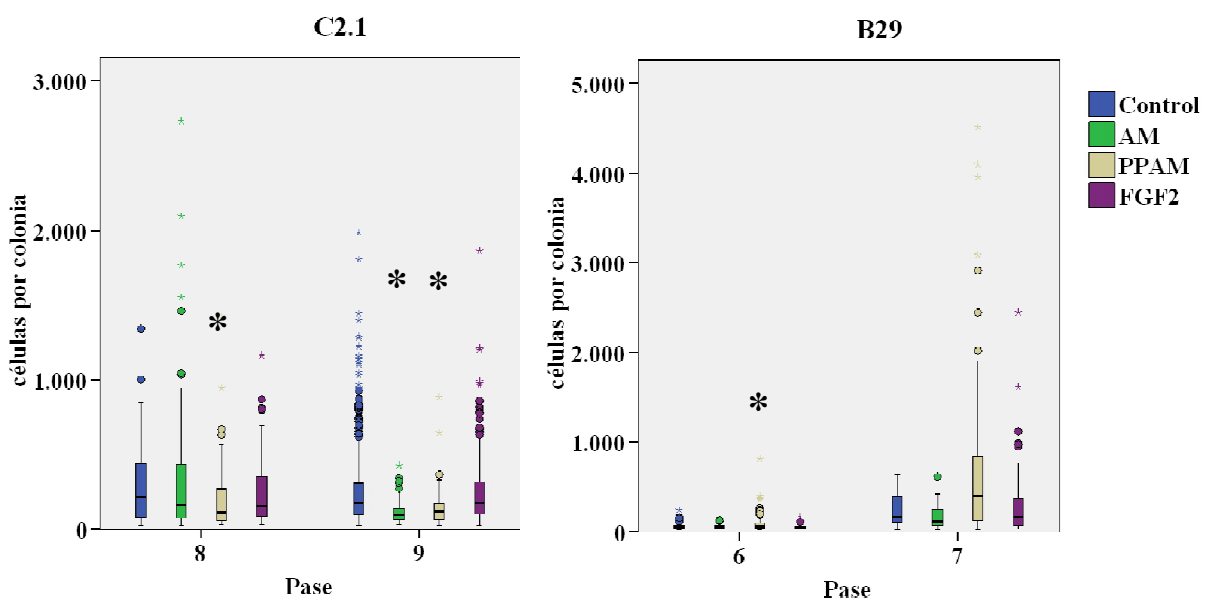


Figura 33: Representación por cuartiles del ensayo clonogénico sobre las líneas transducidas de C2.1 (pase 9) y B29 (pase 7). Aquellas muestran que difieren significativamente del control se indican con un asterisco.



### 8.3.7 Expresión genética

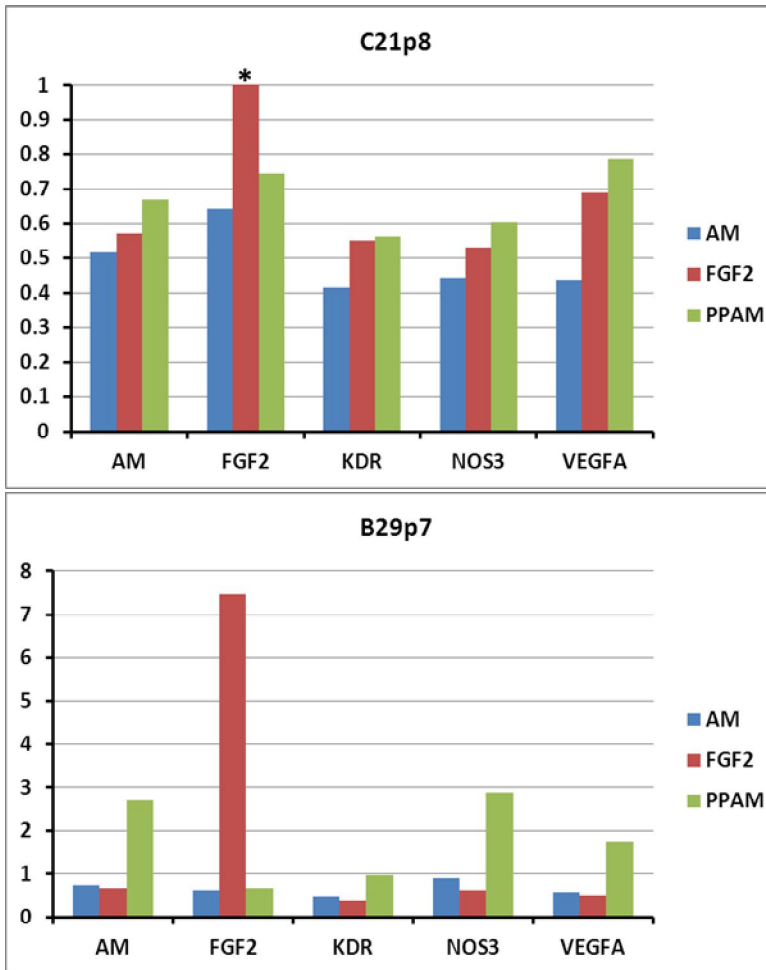


Figura 34: Expresión de qPCR de las líneas transducidas de B29 (pase 7) y C2.1 (pase 8). El valor indicado con un asterisco se corresponde a 186.5.

Se obtuvieron muestras del material genético de las líneas transducidas de C2.1 en su pase 8 y de B29 en su pase 7. El RNA se aisló, purificó y trató con DNAsa. Se analizó la expresión de los genes AM, FGF2, VEGFA, KDR y NOS3 (ver Figura 34).

La expresión de los genes testados se encuentra en general reducida respecto al control, salvo en el caso de

la línea PPAM donde se encuentra generalmente incrementada. Dado que se trata de diferencias de entre solamente la mitad al doble de expresión respecto del control, estas diferencias podrían ser debidas al error aleatorio. Sí se aprecia un importante aumento (186.5 veces en cordón, se sale de escala, y 7.5 veces en adulto) de expresión del gen FGF2 en las respectivas líneas transducidas con este gen.

Debe indicarse que la versión del gen AM introducida, o su forma inmadura PPAM, en estas líneas modificadas no es idéntica a la secuencia producida de forma endógena. Como se emplearon cebadores para la detección de la versión endógena no fue posible la detección del gen inducido, por lo que es esperable que no se aprecie un aumento en la expresión de este gen en las líneas modificadas con otra versión de AM. Consecuentemente, sólo podemos confirmar el éxito en la transducción de las líneas FGF2, tanto la de adulto como la de cordón, con un mayor éxito aparente en la de cordón.

Sí parece detectarse un ligero aumento de la producción endógena de los genes AM, NOS3 y VEGFA en la línea de adulto transducida con la preproadrenomedulina.

### 8.3.8 Formación de túbulos sobre matriz basal

Empleando una línea de adulto (ECFC) y una línea de cordón (C2.1.1) preparamos un ensayo de angiogénesis. Una vez estuvo preparado se expusieron las células que iban a formar los túbulos al medio recogido de las líneas transducidas. La idea era observar si había una modificación en la capacidad angiogénica con los factores expresados. Los resultados (ver Figura 35) se representan en este caso solamente como el número de brazos en la estructura normalizado a la extensión de dicha estructura (sin unidades) como indicación de la complejidad de dicha estructura. Se ha decidido representar sólo este valor en lugar de representar además nodos y puntos triples dado que las tres variables muestran variables muy similares y este ensayo incluía muchas condiciones. Se indican con asterisco aquellos valores con una diferencia significativa según la prueba de t de Student.

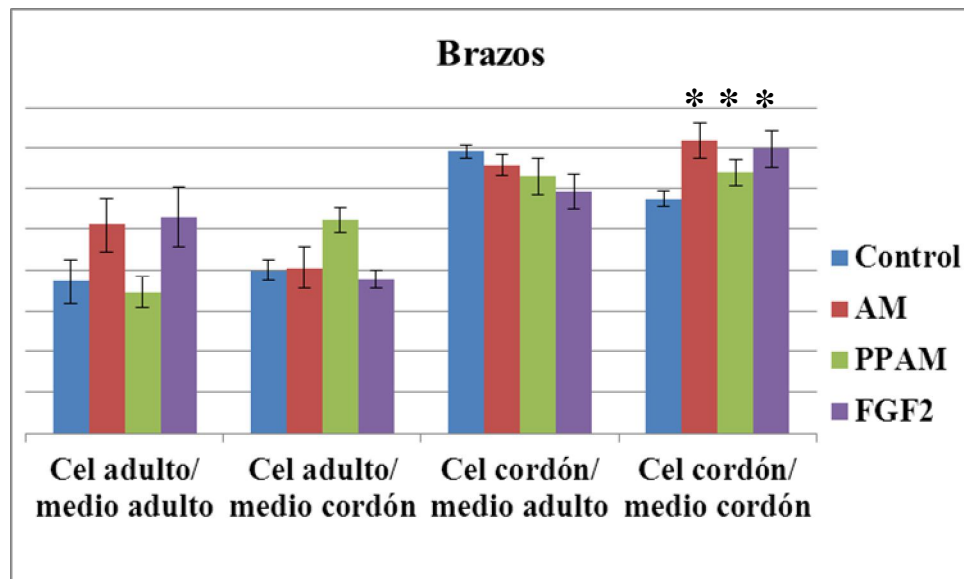
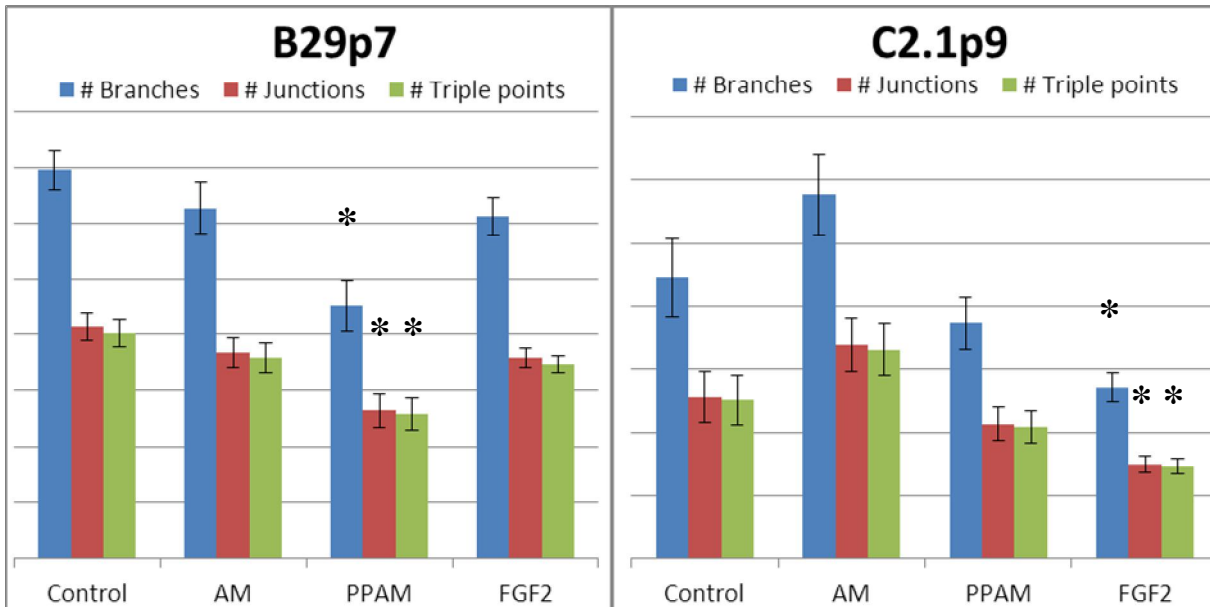


Figura 35: Número de brazos con respecto del área (adimensional) de la estructura formada por ensayo de angiogénesis en células de adulto (ECFC) o cordón (C2.1.1) expuestas a medio de las líneas transducidas (Control, AM, PPAM, FGF2) de adulto (B29) o cordón (C2.1).

Dado que las líneas FGF2 y PPAM eran de proliferación más lenta de acuerdo a los ensayos de proliferación, sería de esperar que el medio condicionado obtenido de dichas líneas estuviese menos agotado. Sin embargo, en este experimento todas las líneas

parecen ofrecer en alguno de los ensayos mejoras respecto al control en la formación de túbulos. Esto da idea de una participación real de los genes introducidos.

Se hizo también un ensayo sobre matriz basal sembrando las propias líneas transducidas. Empleando las líneas de B29 en su pase 7 y las de C2.1 en su pase 9 (ver Figura 36).



**Figura 36:** Ensayo de angiogénesis con las células de las líneas B29 (pase 7) y C2.1 (pase 9) transducidas con los genes Control, AM, PPAM y FGF2. Se muestran en valores normalizados adimensionales.

En este caso se observa una reducción en la capacidad de formación de túbulos significativa para la línea transducida con el gen PPAM en adulto y la línea transducida con el gen FGF2 en cordón. De los ensayos de proliferación a tiempos largos eran precisamente las líneas transducidas con FGF2 y PPAM las que presentaban una proliferación afectada. Esto indica que el mismo motivo que afecta a su proliferación impide una formación normal de los túbulos.

## 8.4 Caracterización del efecto de la Hipoxia en las ECFC

Finalmente, se estudió el efecto que induce la hipoxia sobre las ECFC *in vitro*. Se tomaron 3 diferentes aproximaciones a la hora de intentar caracterizarlo.

Por una parte se emplearon químicos inductores de hipoxia, comparando con células en medio sin estos aditivos el resultado de diversos ensayos, la intención era tanto buscar las

respuestas más tempranas, especialmente de expresión genética, como una comparación del efecto global que los tres compuestos tienen sobre las ECFC en cultivo.

También se hicieron experimentos donde se modificó realmente la concentración de oxígeno ambiental. Las condiciones a comparar fueron normoxia control frente a una hipoxia moderada del 5% de oxígeno.

Más adelante se posibilitaría rehacer varias de las medidas a nuevas concentraciones de oxígeno, repitiéndose varios de los ensayos en las condiciones de normoxia control frente a hipoxia aguda con un 3% de oxígeno en el aire e hipoxia extrema con un 1% de oxígeno en el aire.

#### **8.4.1 Ensayos con inductores químicos de Hipoxia**

Los compuestos testados fueron Cloruro de Cobalto, Deferoxamina, y Dimetiloxalilglicina. Los dos primeros comparados frente a un control sin compuestos añadidos al medio de cultivo habitual, mientras que el tercero se comparó frente a un control que incluía el disolvente DMSO en el que se diluye el DMOG. Se hizo así porque la inevitable cantidad añadida de DMSO tiene un cierto efecto citotóxico (Lee and Park, 2017).

##### **8.4.1.1 Búsqueda del IC50**

Es de esperar que los inductores de hipoxia tengan un efecto perjudicial sobre el crecimiento de las células. Para poder cuantificarlo se hicieron una serie de medidas de proliferación a tiempo 0 y 24 horas tras añadir los compuestos, comparando diferentes concentraciones de los mismos. El objetivo era comprobar cómo evoluciona este efecto y cuál sería la concentración donde su extensión es de un 50% sobre el crecimiento (denominado en este trabajo como IC50).

La primera de las medidas se realizó sobre la línea BH54 en su fase 3 con las condiciones Control, DMSO (1% volumen), 25, 100, 200, 300, 400 y 500  $\mu\text{M}$   $\text{CoCl}_2$ , así como 5, 10, 25, 50, 100 y 200  $\mu\text{M}$  DFO, y también 250, 500, 1000, 1500, 2000 y 2500  $\mu\text{M}$  DMOG (con 1% DMSO) (Figura 37).

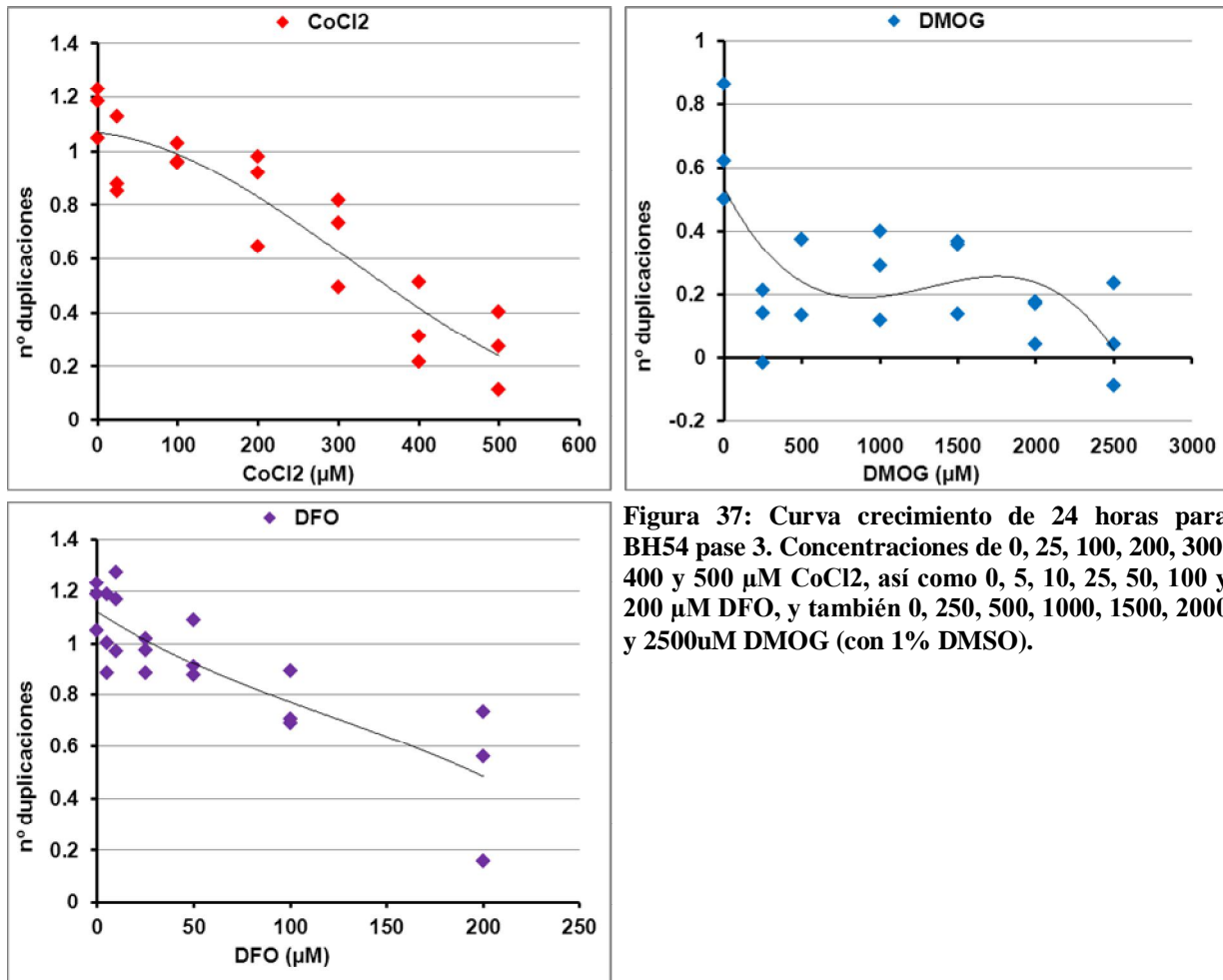


Figura 37: Curva crecimiento de 24 horas para BH54 pase 3. Concentraciones de 0, 25, 100, 200, 300, 400 y 500 μM CoCl<sub>2</sub>, así como 0, 5, 10, 25, 50, 100 y 200 μM DFO, y también 0, 250, 500, 1000, 1500, 2000 y 2500uM DMOG (con 1% DMSO).

De este primer ensayo vemos que, efectivamente, se reduce la proliferación según aumenta la concentración testada. No obstante, las concentraciones que se consideraron en un principio parecen no incluir un rango lo suficientemente amplio como para apreciar la extensión del mismo. Por ello el ensayo se repite en esta misma línea, BH54, en su pase 5 modificando las concentraciones para intentar incluir toda la zona donde el crecimiento se modifique de forma importante: Control, DMSO (1% volumen), 25, 100, 300, 500, 700 y 900 μM CoCl<sub>2</sub>, así como 5, 25, 100, 300, 500 y 700 μM DFO, y también 25, 100, 250, 750, 1500 y 2500 μM DMOG (con 1% DMSO) (Figura 38).

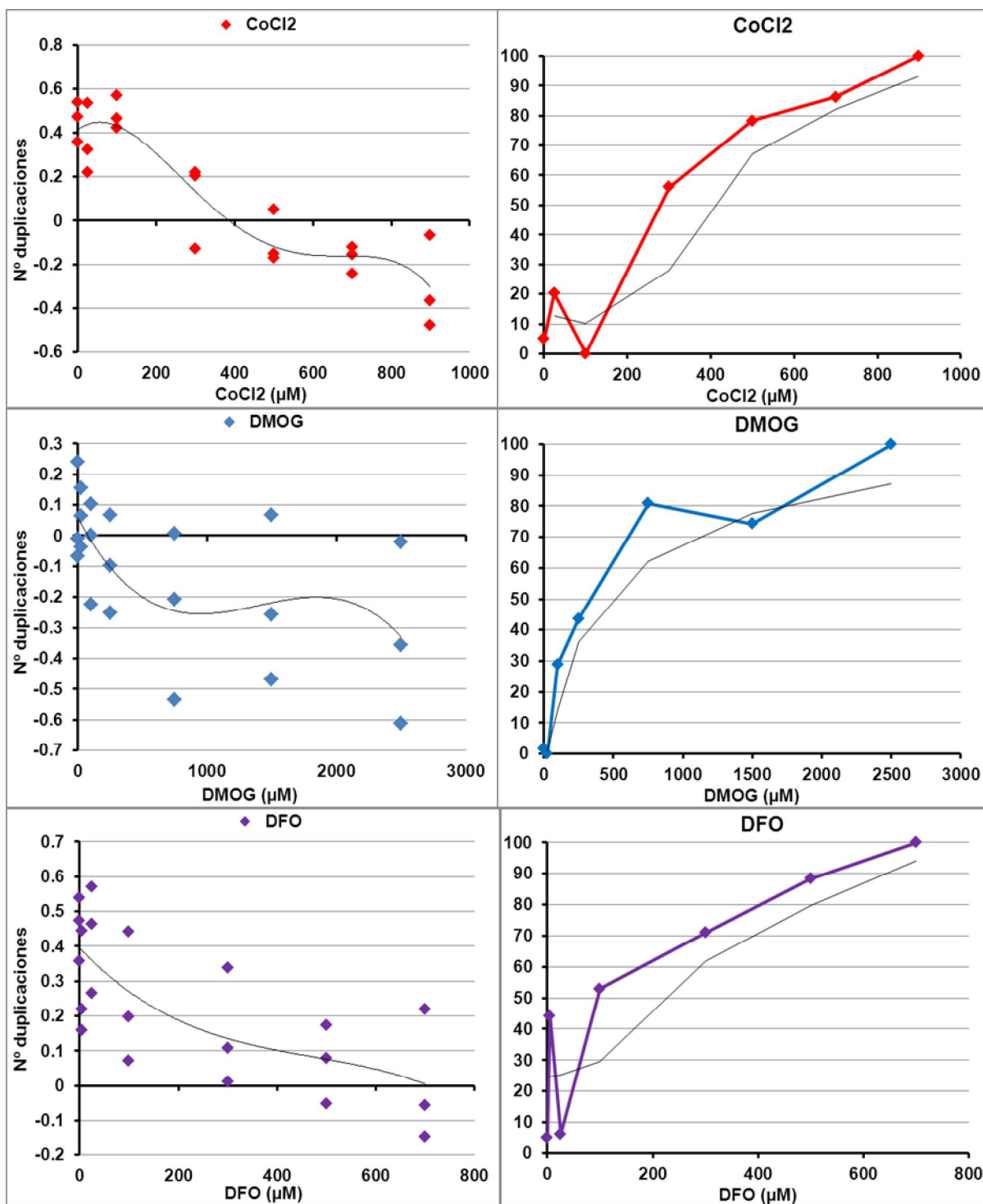


Figura 38: Curva crecimiento de 24 horas para BH54 en su fase 5. Concentraciones de 0, 25, 100, 300, 500, 700 y 900  $\mu\text{M}$  CoCl<sub>2</sub>, así como 0, 5, 25, 100, 300, 500 y 700  $\mu\text{M}$  DFO y también 0, 25, 100, 250, 750, 1500 y 2500  $\mu\text{M}$  DMOG (con 1% DMSO). Se muestran en nº de duplicaciones (izquierda) así como porcentaje del efecto perjudicial (derecha) considerando como 100% el efecto observado a la máxima concentración empleada.

Del mismo modo se realiza el ensayo sobre la línea C1.2 en su fase 7 para comprobar si la extensión del efecto es similar. Se emplean las concentraciones del último ensayo realizado sobre la línea de adulto para poder incluir el rango mayor. Las condiciones

fueron por tanto: Control, DMSO (1% volumen), 25, 100, 300, 500, 700 y 900  $\mu\text{M}$   $\text{CoCl}_2$ , así como 5, 25, 100, 300, 500 y 700  $\mu\text{M}$  DFO, y también 25, 100, 250, 750, 1500 y 2500  $\mu\text{M}$  DMOG (con 1% DMSO). El resultado se muestra en la Figura 39.

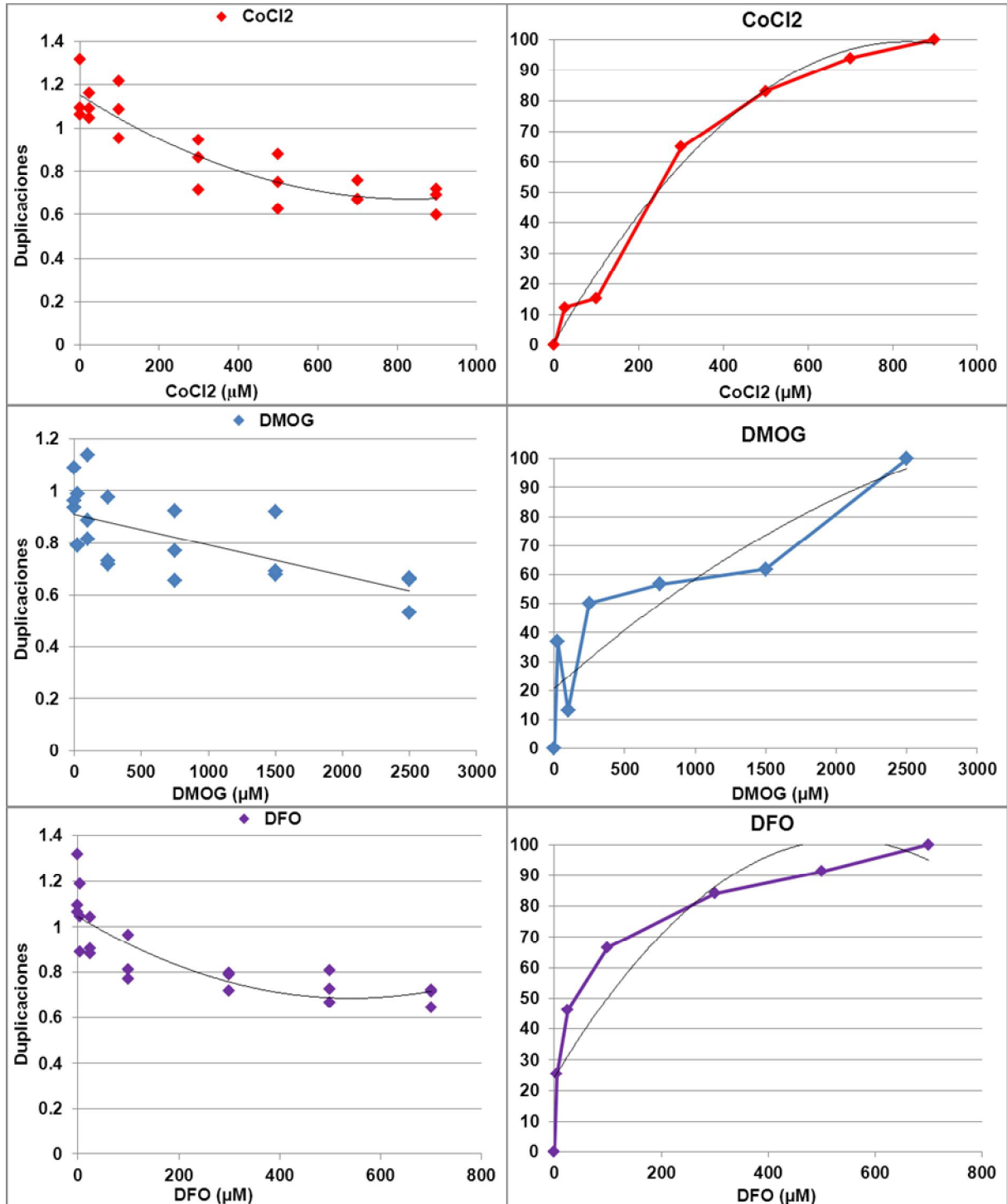


Figura 39: Curva crecimiento de 24 horas para C1.2 en su pase 7. Concentraciones de 0, 25, 100, 300, 500, 700 y 900  $\mu\text{M}$   $\text{CoCl}_2$ , así como 0, 5, 25, 100, 300, 500 y 700  $\mu\text{M}$  DFO y también 0, 25, 100, 250, 750, 1500 y 2500  $\mu\text{M}$  DMOG (con 1% DMSO). Se muestran en n° de duplicaciones (izquierda) así como porcentaje del efecto perjudicial (derecha) considerando como 100% el efecto observado a la máxima concentración empleada.

A partir de estas medidas se determina que el efecto perjudicial sigue una progresión que se puede aproximar a una función exponencial. De aquí se obtiene que la concentración que provoca el 50% del efecto negativo, considerando el 100% como el efecto causado por la concentración testada más alta, sería de 300  $\mu\text{M}$  para el  $\text{CoCl}_2$ , 500  $\mu\text{M}$  para el DMOG y 50  $\mu\text{M}$  para el DFO en la línea de adulto y de 230  $\mu\text{M}$  para el  $\text{CoCl}_2$ , 470  $\mu\text{M}$  para el DMOG y 35  $\mu\text{M}$  para el DFO en el caso de la línea de cordón.

#### **8.4.1.2 Proliferación a tiempos cortos**

Observado que, efectivamente, existe un efecto perjudicial sobre el crecimiento al añadir los compuestos inductores de hipoxia no tenía sentido testar la proliferación en pases sucesivos. Por lo que ese ensayo no se llevó a cabo en estas condiciones, sólo se llevaron a cabo algunas pruebas a tiempos ligeramente superiores, hasta 3 días, con los diferentes inductores de hipoxia.

Testamos el crecimiento a diferentes concentraciones de  $\text{CoCl}_2$  sobre las líneas C2.1 en su pase 5, ECFC en su pase 7 y B29 en su pase 7 a las concentraciones de 0, 50, 100 y 200 nM (ver Figura 40).



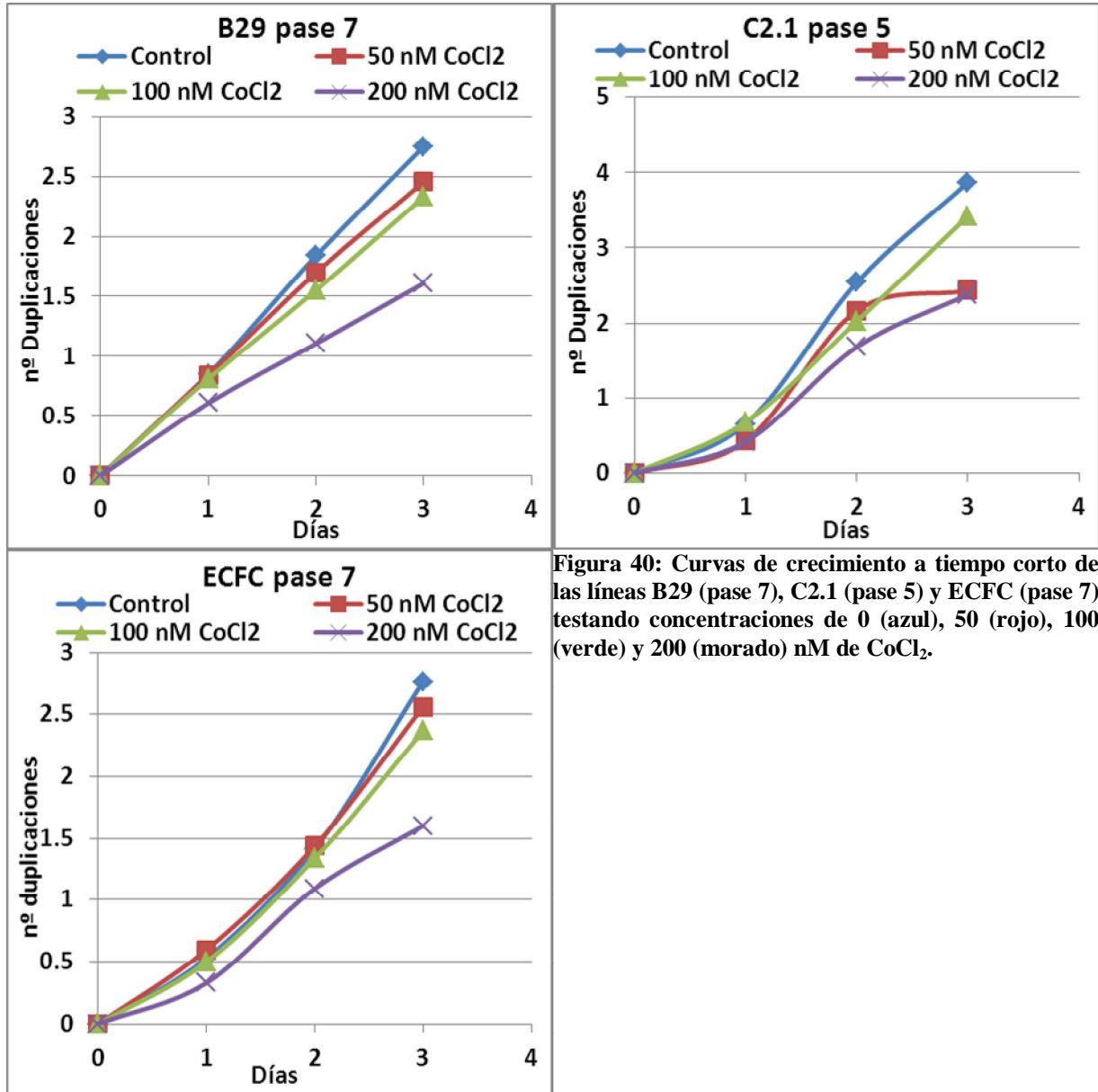


Figura 40: Curvas de crecimiento a tiempo corto de las líneas B29 (pase 7), C2.1 (pase 5) y ECFC (pase 7) testando concentraciones de 0 (azul), 50 (rojo), 100 (verde) y 200 (morado) nM de CoCl<sub>2</sub>.

También se testó el crecimiento a diferentes concentraciones de DFO sobre las líneas C1.2 en su pase 7 y la línea BH8 en su pase 3 a las concentraciones de 0, 50  $\mu$ M, 100  $\mu$ M, 250  $\mu$ M y 500  $\mu$ M de DFO (Figura 41).

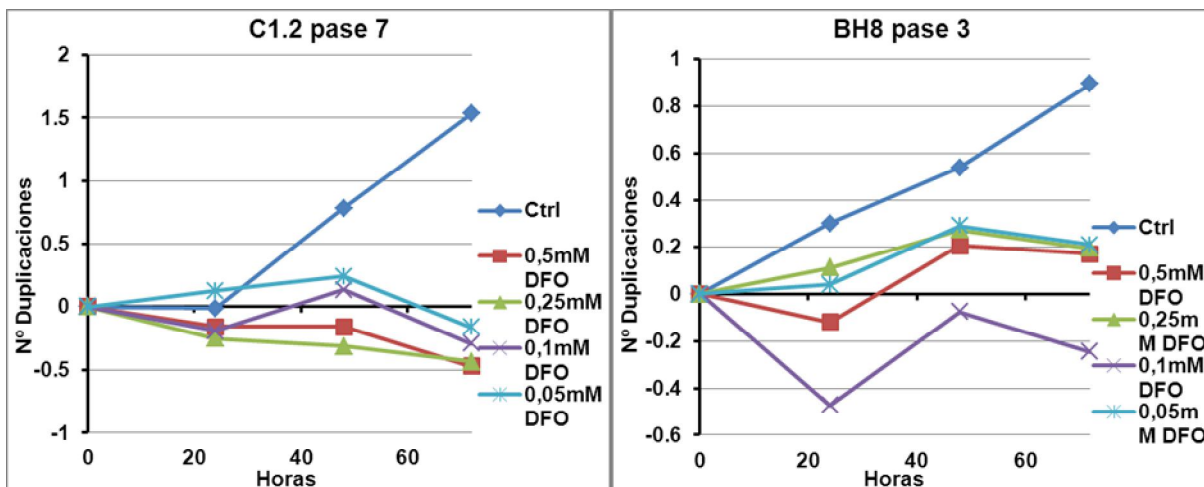


Figura 41: Curva crecimiento de 3 días con DFO a concentraciones 0.5; 0.25; 0.1 y 0.05 mM para las líneas C1.2 (en su pase 7) y BH8 (en su pase 3).

Por último, se realizaron medidas de crecimiento a tiempos cortos sobre las líneas C2.1 en su pase 7 y BH10 en su pase 5 testando simultáneamente todos los inductores de hipoxia, empleando las condiciones Control, CoCl<sub>2</sub> (200 μM), Control DMSO (0.4% volumen) y DMOG (1 mM y 0.4% DMSO). Se tomaron en este caso medidas a tiempos 1, 2 y 3 días (Figura 42).

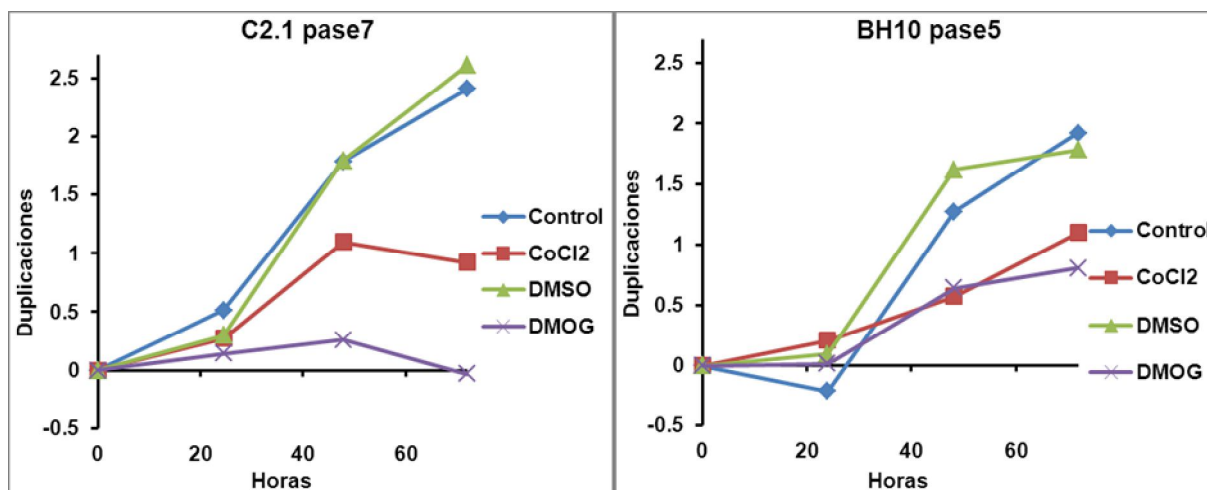


Figura 42: Curva crecimiento de 3 días con CoCl<sub>2</sub> y DMOG para C2.1 pase 7 y BH10 pase 5.

En general se aprecia un efecto continuado de los compuestos conforme avanzan los días, sin adaptación clara por parte de las ECFC que mantienen en todo momento una pendiente reducida que incluso se reduce conforme pasan más tiempo expuestas a los compuestos.

### 8.4.1.3 Senescencia

Se realizaron medidas de senescencia tanto en una línea de adulto (BH10) en su pase 5 como una línea de cordón (C2.1) en su pase 7 en presencia de los inductores químicos de hipoxia. En el caso del ensayo de la línea de adulto no se pudo obtener datos por el bajo número de células teñidas.

En el ensayo de cordón se obtiene el resultado que se muestra en la Figura 43. En este caso se emplean las concentraciones de  $\text{CoCl}_2$  200  $\mu\text{M}$  y DMOG 1 mM.

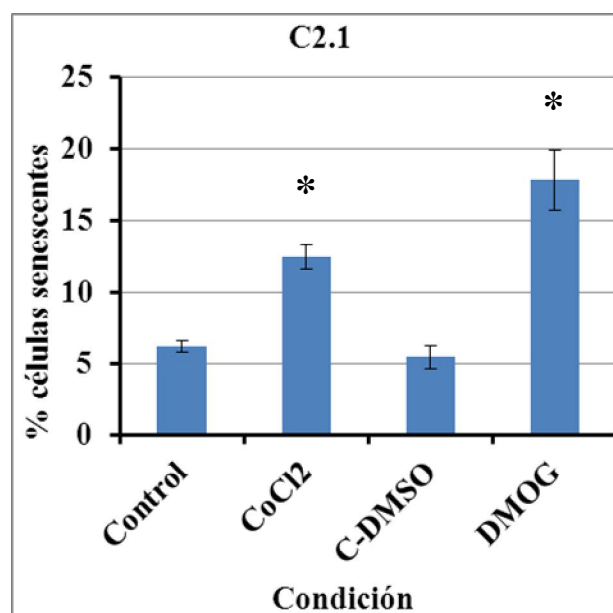


Figura 43: Ensayo de senescencia sobre la línea C2.1 en pase 7 con los inductores de hipoxia  $\text{CoCl}_2$  y DMOG y sus respectivos controles, medio normal y con DMSO respectivamente.

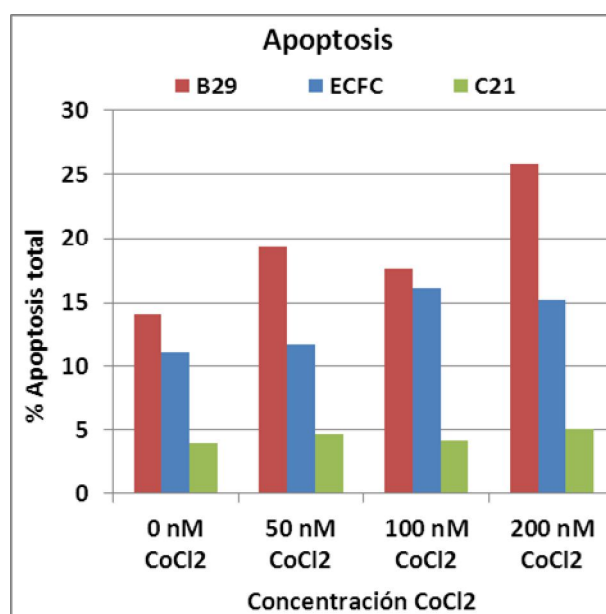
Este ensayo muestra cómo, en la línea de las pruebas de proliferación, los inductores químicos de hipoxia son perjudiciales para las células, en este caso induciendo senescencia. Del mismo modo, se observa que el DMSO empleado como control para el DMOG no tiene un efecto importante respecto del medio habitual en la línea de cordón.

### 8.4.1.4 Apoptosis

Como comprobación inicial se hizo una medida de apoptosis con concentraciones crecientes de  $\text{CoCl}_2$  sobre dos líneas de adulto (ECFC en pase 8 y B29 en pase 7) y una de cordón (C2.1 en pase 5). Se compararon las concentraciones de 0, 50, 100 y 200 nM de  $\text{CoCl}_2$ . El resultado se muestra recogido en la Tabla 6. Por facilidad también se representa la suma de las condiciones de muerte y se representan en la Figura 44.

**Tabla 6: Valores de apoptosis observados para concentraciones crecientes de CoCl<sub>2</sub>.**

ECFC				
	0 nM CoCl <sub>2</sub>	50 nM CoCl <sub>2</sub>	100 nM CoCl <sub>2</sub>	200 nM CoCl <sub>2</sub>
Necrosis	2.5	3.5	3.6	1.5
Muertas	6.6	6	9.3	9.8
Vivas	89	88.3	84	84.8
Apoptosis	2	2.2	3.2	3.9
B29				
	0 nM CoCl <sub>2</sub>	50 nM CoCl <sub>2</sub>	100 nM CoCl <sub>2</sub>	200 nM CoCl <sub>2</sub>
Necrosis	0.4	0.3	0.4	0.4
Muertas	10.5	14.3	11.9	18.9
Vivas	85.9	80.7	82.3	74.2
Apoptosis	3.2	4.7	5.3	6.5
C21				
	0 nM CoCl <sub>2</sub>	50 nM CoCl <sub>2</sub>	100 nM CoCl <sub>2</sub>	200 nM CoCl <sub>2</sub>
Necrosis	0.2	0.5	0.3	0.3
Muertas	2.8	3	2.2	3.4
Vivas	95.9	95.4	95.8	94.8
Apoptosis	1	1.2	1.7	1.4



**Figura 44: Muerte celular a condiciones crecientes de CoCl<sub>2</sub> (0, 50, 100 y 200 nM) para las líneas B29 en pase 7, ECFC en pase 8 y C2.1 en pase 5.**

#### 8.4.1.5 Ciclo celular

Sobre las mismas líneas de la medida anterior (ECFC en pase 8, B29 en pase 7 y C2.1 en pase 5) se midió también el porcentaje de células en cada fase del ciclo celular. Los

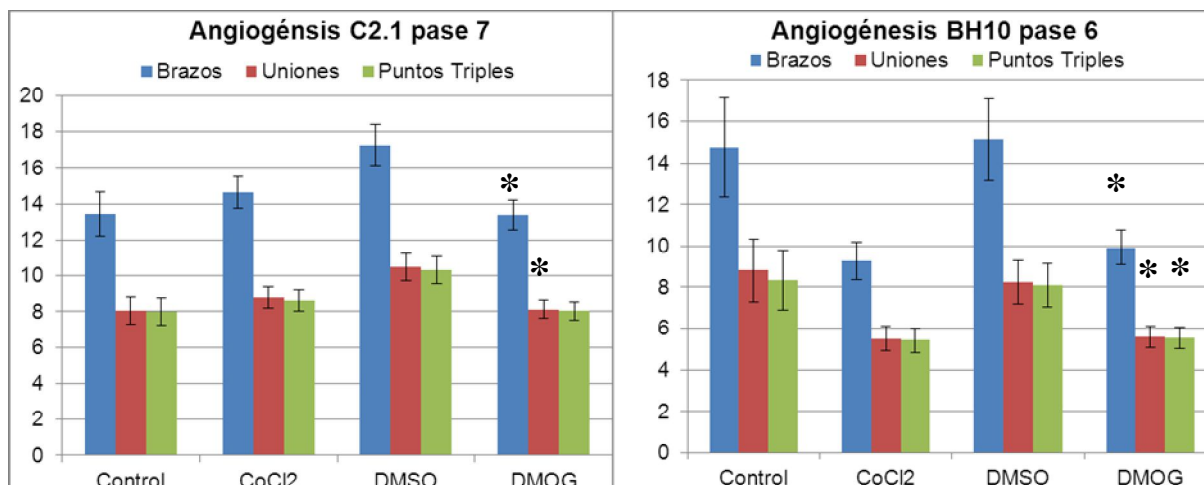
resultados se muestran en la Tabla 7. De forma coherente con las medidas anteriores a mayor concentración de  $\text{CoCl}_2$  testado menor es el índice de proliferación observado. Es lo esperable teniendo en cuenta que es un compuesto con efecto tóxico conocido.

**Tabla 7: Porcentaje de células en cada fase del ciclo celular a concentraciones crecientes de  $\text{CoCl}_2$  (0, 50, 100 y 200 nM  $\text{CoCl}_2$ ). Líneas ECFC en fase 5, C2.1 en fase 5 y B29 en fase 7.**

ECFC				
Fase	0 nM $\text{CoCl}_2$	50 nM $\text{CoCl}_2$	100 nM $\text{CoCl}_2$	200 nM $\text{CoCl}_2$
G0-G1	41.59	49.77	47.12	58.42
G2-M	13.93	19.99	18.79	8.84
S	44.49	30.24	34.09	32.74
IP	0.584	0.502	0.529	0.416
C21				
Fase	0 nM $\text{CoCl}_2$	50 nM $\text{CoCl}_2$	100 nM $\text{CoCl}_2$	200 nM $\text{CoCl}_2$
G0-G1	42.18	45.2	47.37	53.88
G2-M	17.56	15.68	15.06	17.17
S	40.26	39.12	37.57	28.95
IP	0.578	0.548	0.526	0.461
B29				
Fase	0 nM $\text{CoCl}_2$	50 nM $\text{CoCl}_2$	100 nM $\text{CoCl}_2$	200 nM $\text{CoCl}_2$
G0-G1	50.65	53.23	54.62	55.61
G2-M	13.45	14.01	11.14	7.45
S	35.9	32.76	34.24	36.93
IP	0.494	0.468	0.454	0.444

#### 8.4.1.6 Formación de túbulos sobre matriz basal

Sobre cultrex se testó la complejidad de la estructura que formarían las células mediante análisis de fotografías tomadas con el programa ImageJ. El experimento se realizó tanto sobre una línea de cordón como una de adulto, testando en ambas el efecto de  $\text{CoCl}_2$  200  $\mu\text{M}$  y DMOG 1 mM respecto de sus controles (ver Figura 45). Se observa un ligero aumento de  $\text{CoCl}_2$  frente a su control y una reducción de DMOG frente a su control con DMSO. La reducción provocada por DMOG alcanzó significancia en todas las variables consideradas en la línea de adulto así como 2 de las consideradas en cordón.



**Figura 45: Medidas de angiogénesis de las líneas C2.1 en fase 7 (izquierda) y BH10 en fase 6 (derecha). Se representan el número de brazos, uniones y puntos de unión triple respecto del área analizada (adimensional).**

El efecto observado es más acusado en la línea de adulto que en la de cordón, vemos más variables significativas para el DMOG y un cambio importante en CoCl<sub>2</sub>, donde en cordón no lo había. Esto hace pensar que se debe al efecto nocivo de los compuestos, a los que la línea de adulto sería más sensible por envejecida.

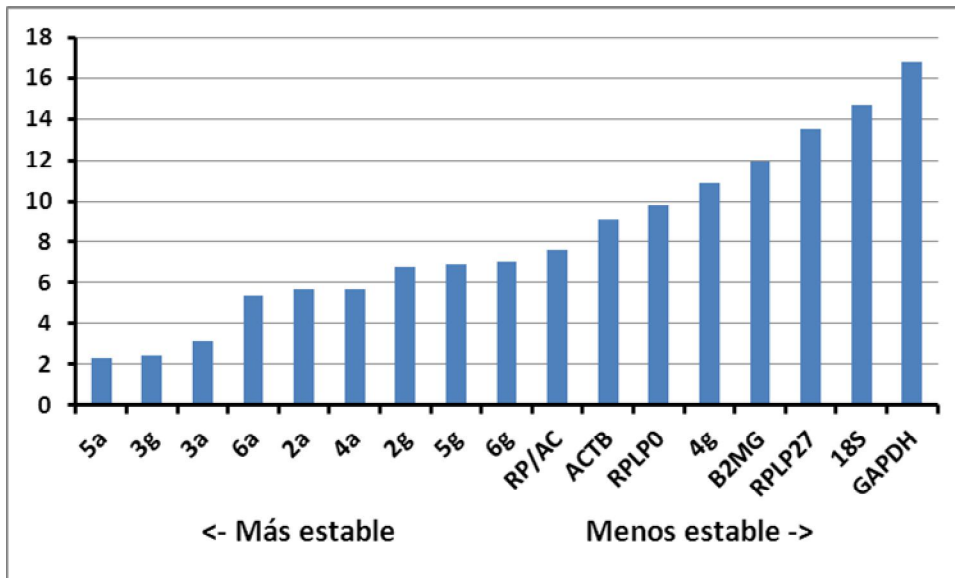
#### 8.4.1.7 Expresión genética

Inicialmente se buscaron aquellos genes cuya expresión permaneciese lo más estable posible entre las condiciones que se consideran normoxia e hipoxia.

Para ello se obtuvieron muestras de cDNA a partir del extracto de la línea BH10 en su fase 5 incubado a diferentes tiempos (0, 6, 24 y 48 horas) con CoCl<sub>2</sub> 200 μM o DMOG 1000 μM así como de sus respectivos controles. Se hicieron medidas de la señal medida en el termociclador a tiempo real para los genes RPLP0, GAPDH, TFRC, ACTB, B2MG, RPLP27 y 18S. Se empleó el software libre online “Reffinder” (Xie et al., 2012) que proporciona valores adimensionales de estabilidad para clasificar las posibilidades desde la más (valor más bajo) a la menos estable (valor más alto).

El resultado fue que el promedio geométrico de los genes RPLP0, ACTB y B2MG (en la Figura 46 la opción enumerada como 3g) proporcionaba los valores más estables entre las diferentes condiciones. Técnicamente una mezcla de RPLP0, ACTB, B2MG, 18S y RPLP27 resultaba más estable, pero es poco práctico emplear 5 genes distintos sólo para la referencia en cada medida. Por lo tanto las medidas de expresión genéticas se llevaron

a cabo empleando estos 3 genes como los valores frente a los que normalizar el resto, tal y como se muestra en la Ecuación 3. También se probó a hacer divisiones entre los valores obtenidos en lugar de promedios, pero la estabilidad no mejoraba.

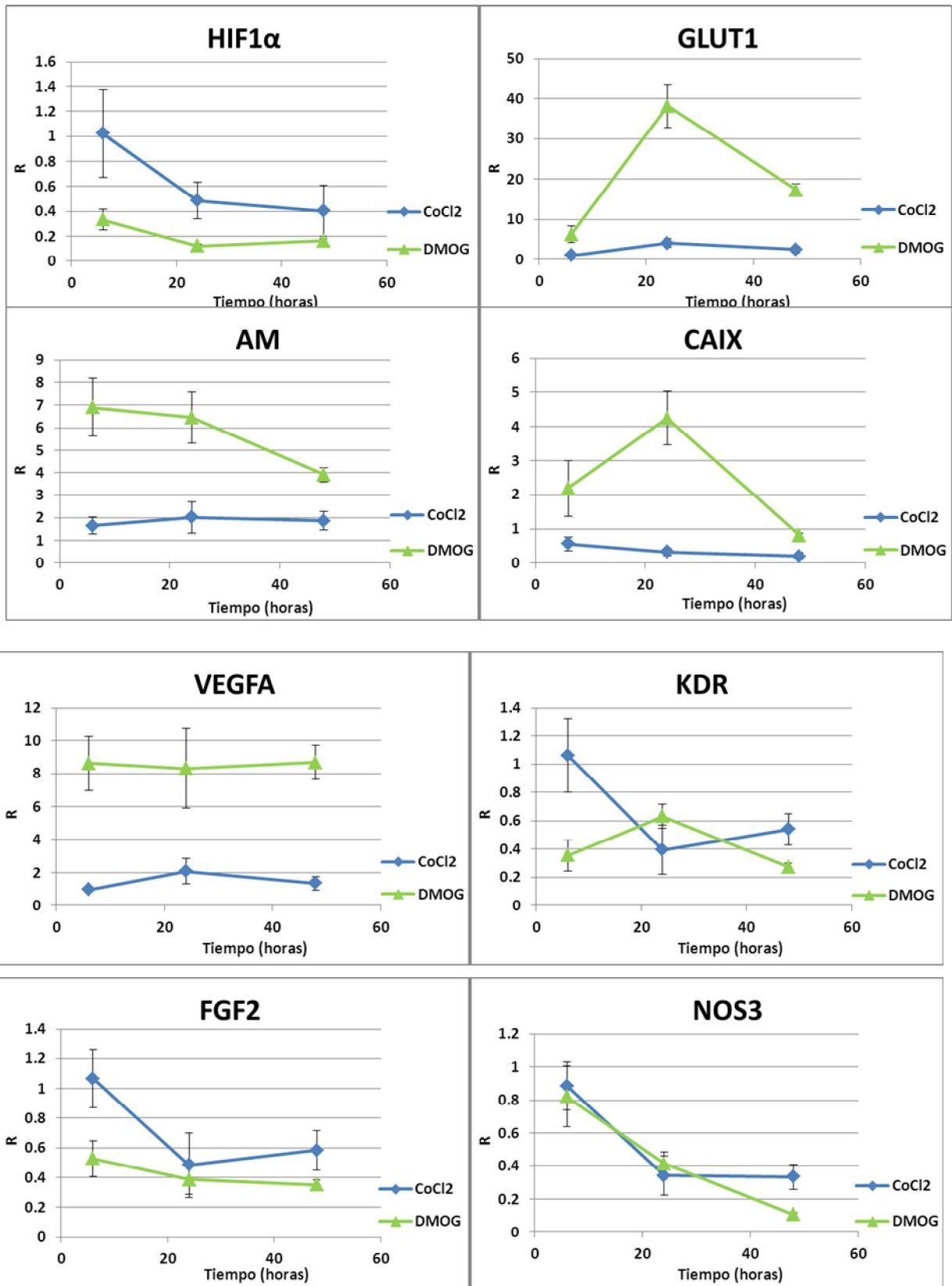


**Figura 46:** Estabilidad de diversos genes housekeeping o combinaciones. Las muestras nombradas como números indican el promedio, aritmético (a) o geométrico (g), de ese número de los genes más estables. El valor RP/AC es la división de los 2 más estables.

Una vez determinados los genes de referencia se procedió con las medidas propias del ensayo de expresión entre las diferentes condiciones.

Se hicieron las pruebas sobre la línea C2.1 en su pase 7 así como la línea BH10 en su pase 5 se sembraron placas T25 con 400.000 células. Tras 24 horas se les cambia el medio para incluir las condiciones Control, CoCl<sub>2</sub> 200μM, DMSO (0.4% volumen) y DMOG 1mM más 0.4% DMSO. Las concentraciones empleadas se escogieron aproximando de las curvas de proliferación preliminares a 72 horas que se hicieran sobre las ECFC, mostradas en la Figura 40, Figura 41 y Figura 42.

Se tomaron muestras del material genético tras 6, 24 y 48 horas. Tras obtener el cDNA de estas muestras se midieron los genes HIF1α, GLUT1, VEGFA, KDR, FGF2, AM, NOS3, CAIX, CDKN1A y CDKN2A. Se muestran los datos en la Figura 47 y la Figura 48 como valor de R comparando la condición de CoCl<sub>2</sub> frente al control sin aditivos y la condición DMOG frente a la condición con DMSO.





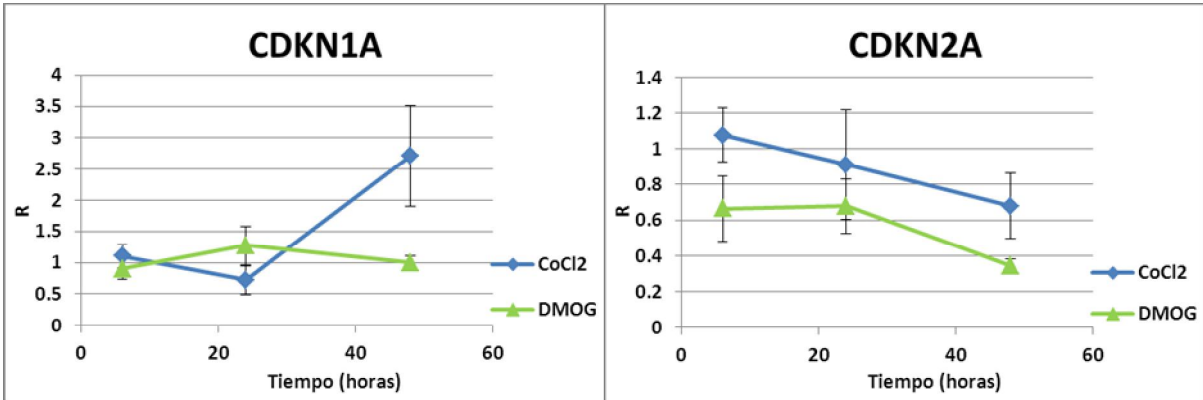
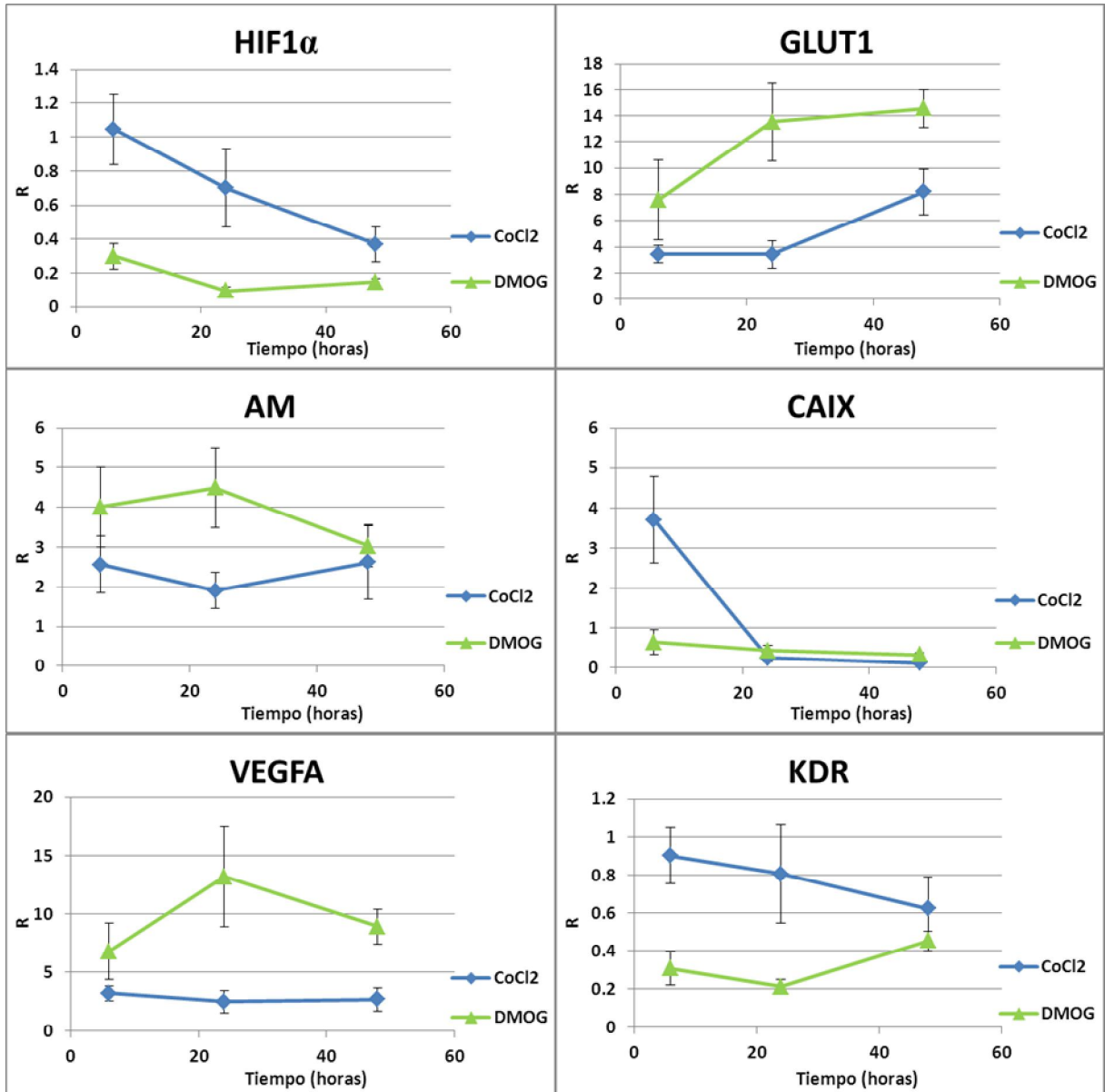


Figura 47: Expresión a las 6, 24 y 48 horas en la línea C2.1 pase 7 con inductores de hipoxia CoCl<sub>2</sub> y DMOG.



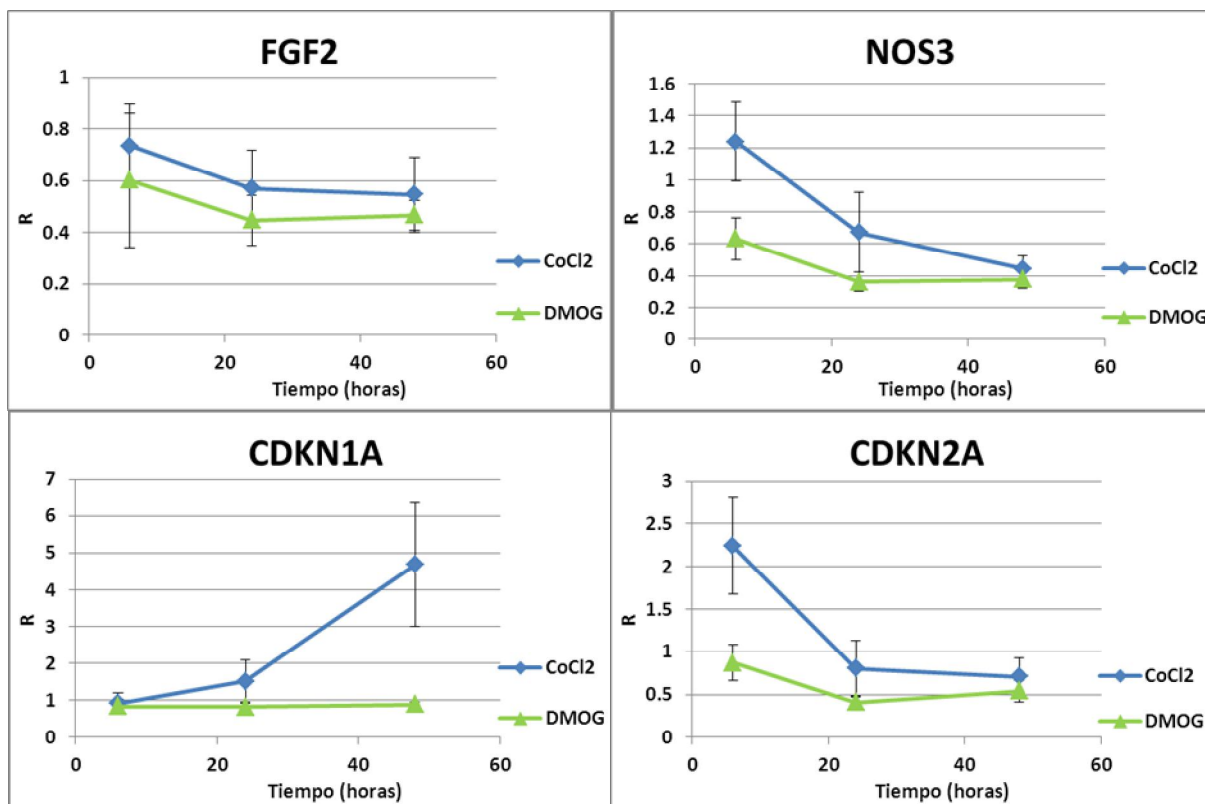
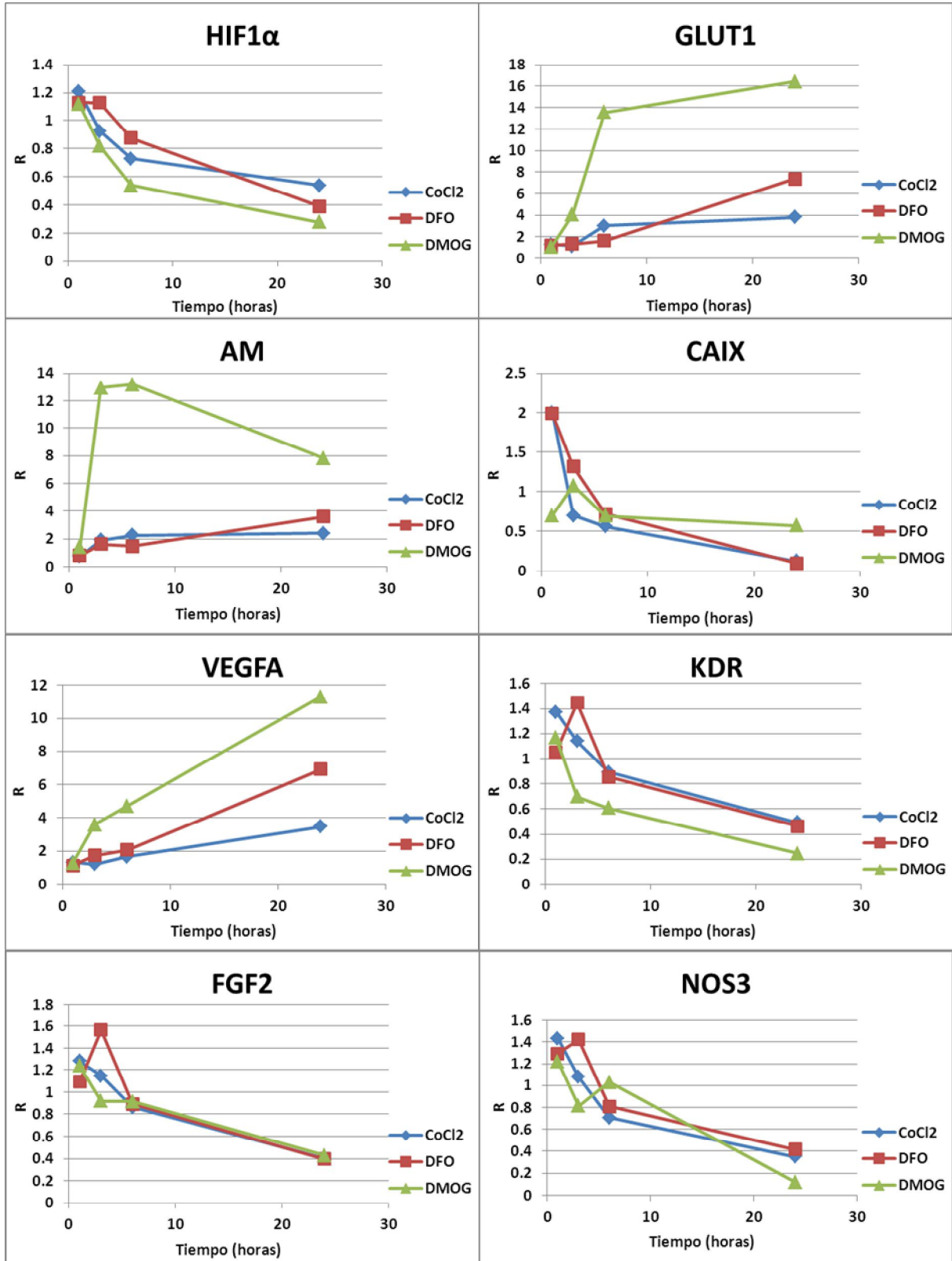


Figura 48: Expresión a las 6, 24 y 48 horas en la línea BH10 pase 5 con inductores de hipoxia CoCl<sub>2</sub> y DMOG.

Una vez se dispuso de los resultados de los ensayos de crecimiento a tiempo corto buscando el IC<sub>50</sub> (mostrado en la Figura 37, Figura 38 y Figura 39) se rehicieron las medidas. Buscando esta vez las respuestas más tempranas, por lo que las medidas se tomaron en este caso a tiempos 1, 3, 6 y 24 horas tras añadir los compuestos.

La medida también se realizó sobre la línea C1.2 en su pase 7. Esta vez se sembraron 55.000 células por pocillo de una placa de 6 pocillos. Tras 48 horas en crecimiento se procedió a añadir los compuestos. Las concentraciones empleadas fueron control, DMSO 0.188% en volumen, DFO 35  $\mu$ M, CoCl<sub>2</sub> 230  $\mu$ M y DMOG 470  $\mu$ M con un 0.188% DMSO como disolvente. De nuevo las condiciones COCl<sub>2</sub> se muestran normalizadas a la condición control, mientras que la condición que incluye DMOG se muestra normalizada a la condición que incluye su disolvente, DMSO (ver Figura 49). Buscando el efecto a tiempos más cortos



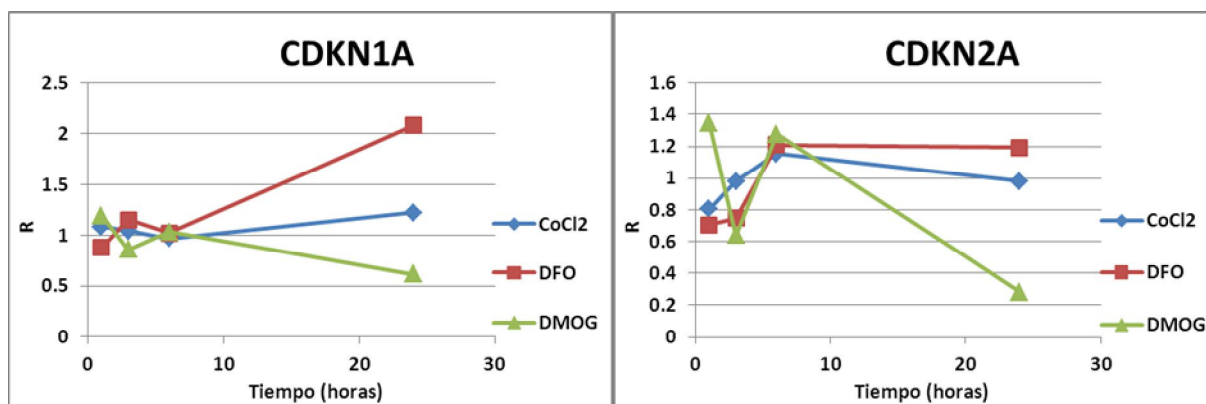
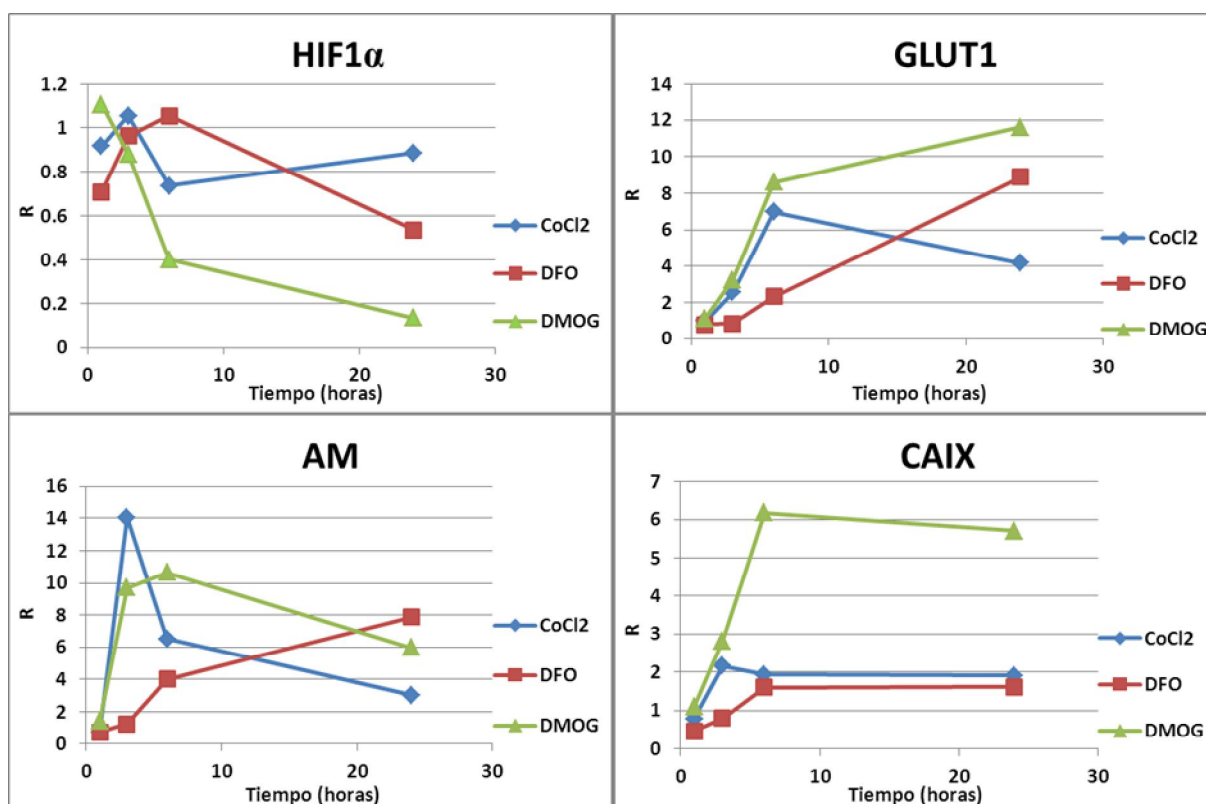


Figura 49: Expresión a las 1, 3, 6 y 24 horas en la línea C1.2 en su pase 7 con inductores químicos de hipoxia CoCl<sub>2</sub>, DFO y DMOG.

Asimismo se hizo una medida similar sobre una segunda línea procedente de adulto. En este caso se escogió la línea BH54 en su pase 5. Se sembraron 108.783 células en 21 pocillos de placas de 6 pocillos y, tras 24 horas de cultivo, se les cambió el medio a las siguientes condiciones; control, DMSO (0.2% en volumen), CoCl<sub>2</sub> 300 μM, DFO 50 μM y DMOG 500 μM con 0.2% DMSO. De nuevo las medidas se tomaron a tiempos 1, 3, 6 y 24 horas tras el cambio.



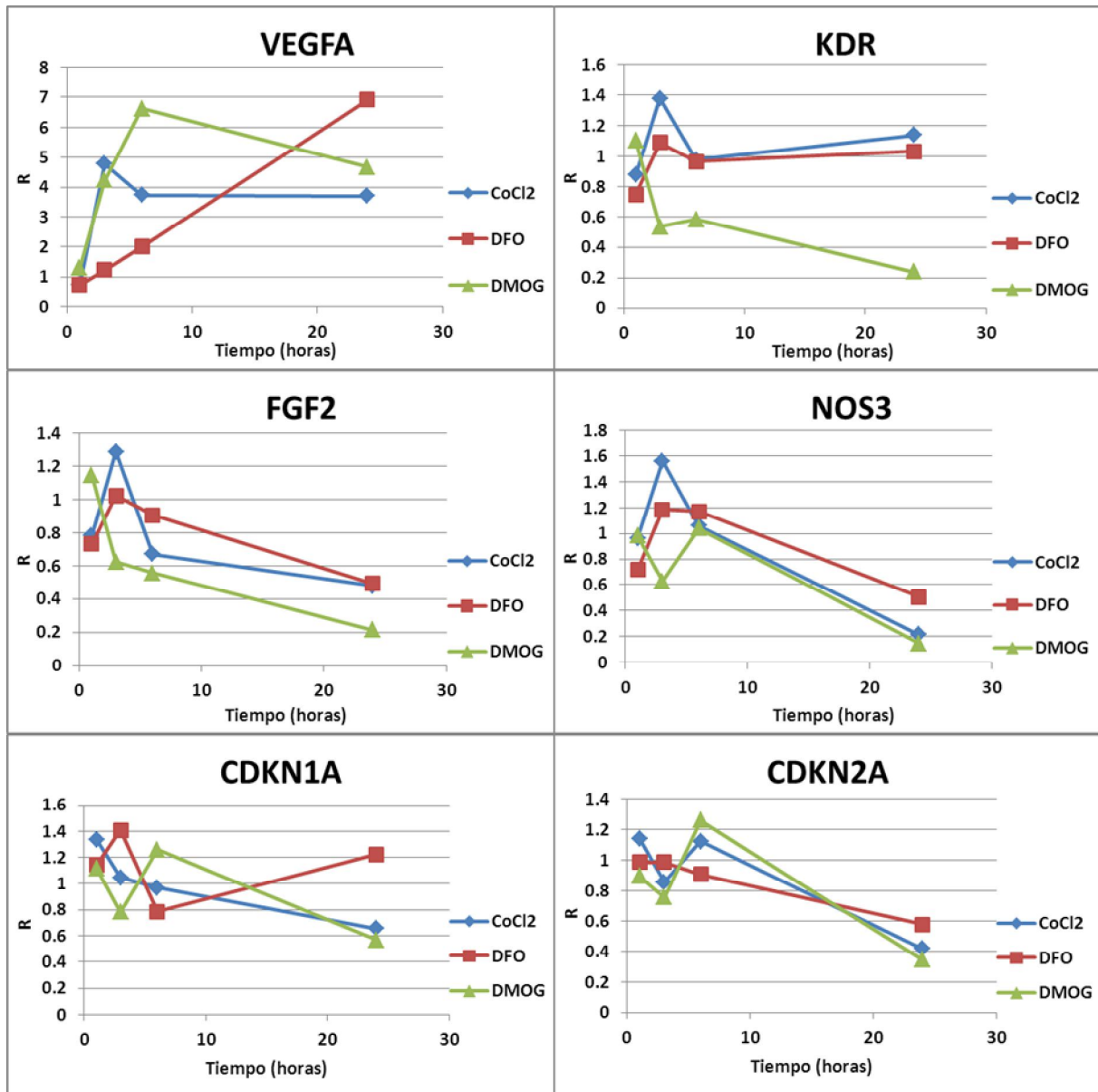


Figura 50: Expresión a las 1, 3, 6 y 24 horas en la línea BH54 en su pase 5 con inductores químicos de hipoxia CoCl<sub>2</sub>, DFO y DMOG.

En conjunto, de los 4 ensayo se observa que:

- HIF1 $\alpha$

Experimenta una reducción importante. Ésta puede apreciarse tan pronto como 6 horas tras añadir el DMOG. Con CoCl<sub>2</sub> o DFO hay que esperar a las 24 horas para ver una disminución equivalente, pero también se acaba produciendo.

- **GLUT1**

Gen de transporte de la glucosa aumenta significativamente. De nuevo se observa que el proceso es más temprano en las medidas de DMOG (con aumento importante ya visible en la medida de tan sólo 3 horas). Con DFO y CoCl<sub>2</sub> varía entre medidas, siendo necesario entre 3 y 24 horas para alcanzar un nivel de cambio equivalente. En todos los casos no obstante el aumento es pronunciado y se mantiene en el tiempo, siendo necesario esperar 24-48 horas para alcanzar una estabilización o reducción.
- **AM**

Hormona proangiogénica, tiene un comportamiento aún más temprano. Presenta un pico a las 3-6 horas que decae progresivamente al emplear DMOG. El aumento con CoCl<sub>2</sub> o DFO no es tan acusado y no permite ver esta evolución, manteniéndose simplemente aumentado respecto del control.
- **CAIX**

gen de remodelación de la matriz y control del pH, no arroja cambios coherentes entre las medidas. Las medidas indicaban un nivel de expresión basal más bajo que otros de los genes medidos, con el consiguiente riesgo de aumentar el error. De forma general parece apreciarse un aumento puntual en algunas de las medidas tan temprano como tras 1 o 3 horas seguido de una bajada temprana que mantiene su expresión por debajo del control.
- **VEGFA**

Uno de los principales inductores de angiogénesis, se sobreexpresa de forma continua ante los compuestos testados alcanzando un máximo sobre las 6-24 horas de exposición.
- **KDR**

Receptor del VEGFA, presenta el proceso contrario, con una progresiva reducción, tanto más acusada cuanto mayor es el aumento de VEGFA.
- **FGF2 y NOS3**

Hormona proangiogénica el primero y productor de NO el segundo, relacionada con la angiogénesis de forma indirecta, bajan de forma constante su expresión hasta alcanzar un plano a las 24 horas.

- CDKN1A y CDKN2A

También llamados p21 y p16 respectivamente, muestran un cierto aumento de CDKN1A a las 48 horas sólo cuando se emplea CoCl<sub>2</sub>, mientras que CDKN2A reduce su expresión tenuemente en la mayoría de medidas desde las 24 horas.

## **8.4.2 Normoxia frente a Hipoxia moderada**

En un principio se hicieron comparaciones entre las condiciones de Normoxia (nuestro control) e hipoxia moderada, es decir con un 5% de oxígeno en aire.

### **8.4.2.1 Proliferación en pases sucesivos**

El estudio a tiempo largo se realizó sobre 3 líneas procedentes de cordón así como una de adulto. Estas líneas fueron C1.4 (pases 4 a 19), C2.1 (pases 2 a 14) (en este caso un problema en la estufa impidió tomar medidas confiables en los pases 6 o 7), C4.2 (pases 7 a 11) y la línea BH20 (pases 2 a 10). Los resultados, que se muestran en la Figura 51, muestran que, salvo variaciones menores, las curvas de crecimiento eran prácticamente superponibles. Sólo la línea de adulto parecía lograr un tímido aumento en el número de duplicaciones acumuladas a largo plazo, pero no alcanzó más pases antes de detenerse.

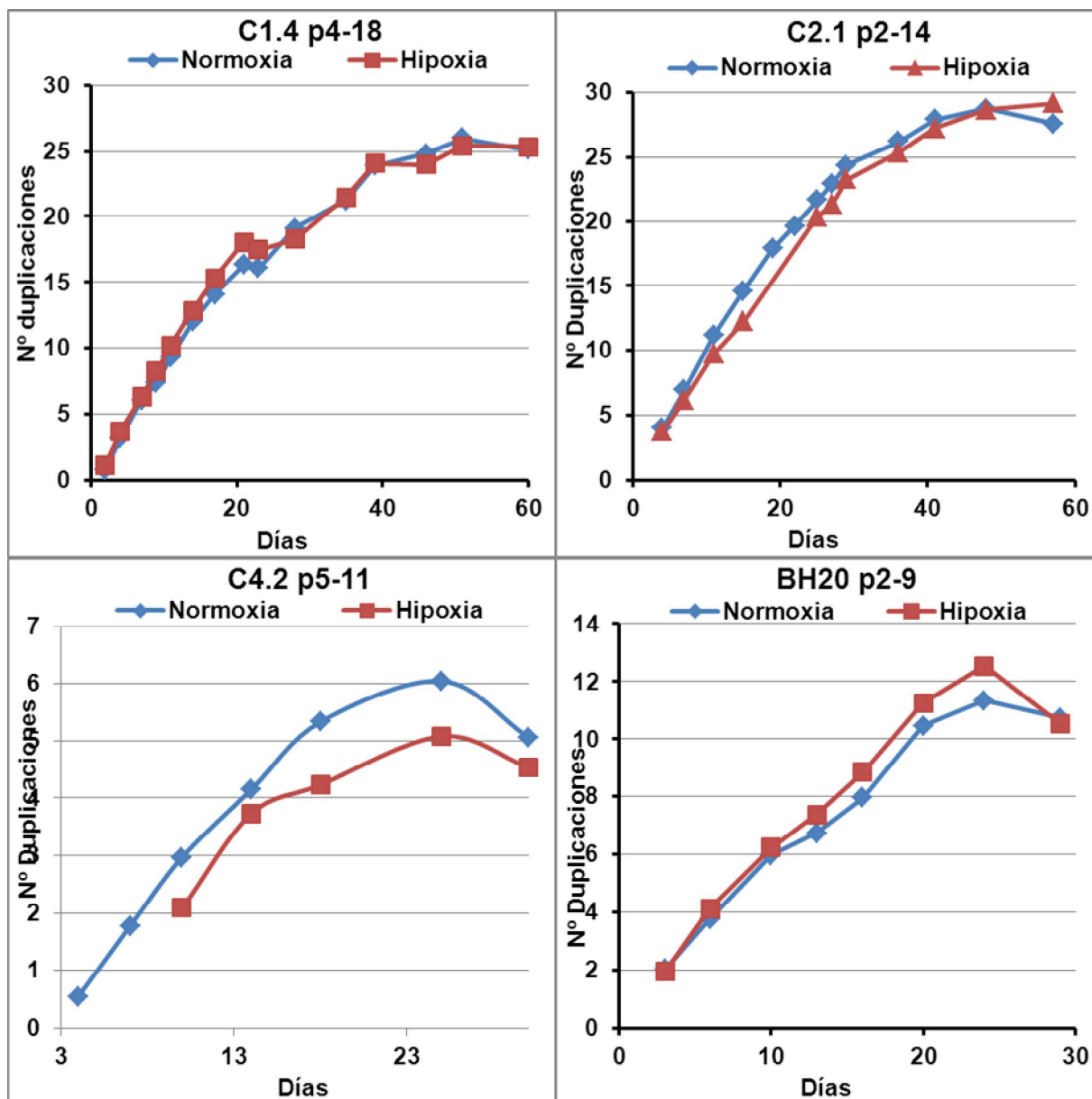


Figura 51: Proliferación en pases sucesivos en normoxia (21%) en azul, e hipoxia moderada (5%) en rojo, para las líneas C1.4, C2.1, C4.2 y BH20.

Al ver la manifiesta falta de diferencias entre las condiciones observadas, en contra de las ideas iniciales, se planteó una nueva prueba. Se consideró la posibilidad de que al sacar las placas fuera de la estufa para su manejo pudiese tener un efecto negativo no considerado en el que las células tuviesen que adaptarse cada vez a las nuevas condiciones. Para comprobarlo se hicieron algunos ensayos añadiendo a las condiciones Normoxia (control) e hipoxia al 5% de oxígeno una tercera condición que se mantuvo intermitentemente en hipoxia y Normoxia. Las placas de esta tercera condición se mantuvieron 1 día en cada estufa, alternando para forzar ese hipotético efecto negativo. De existir dicho efecto pernicioso derivado de su manejo al aire es de suponer que las



placas en condiciones intermitentes crecieran a un ritmo significativamente menor a aquellas en normoxia o hipoxia puras.

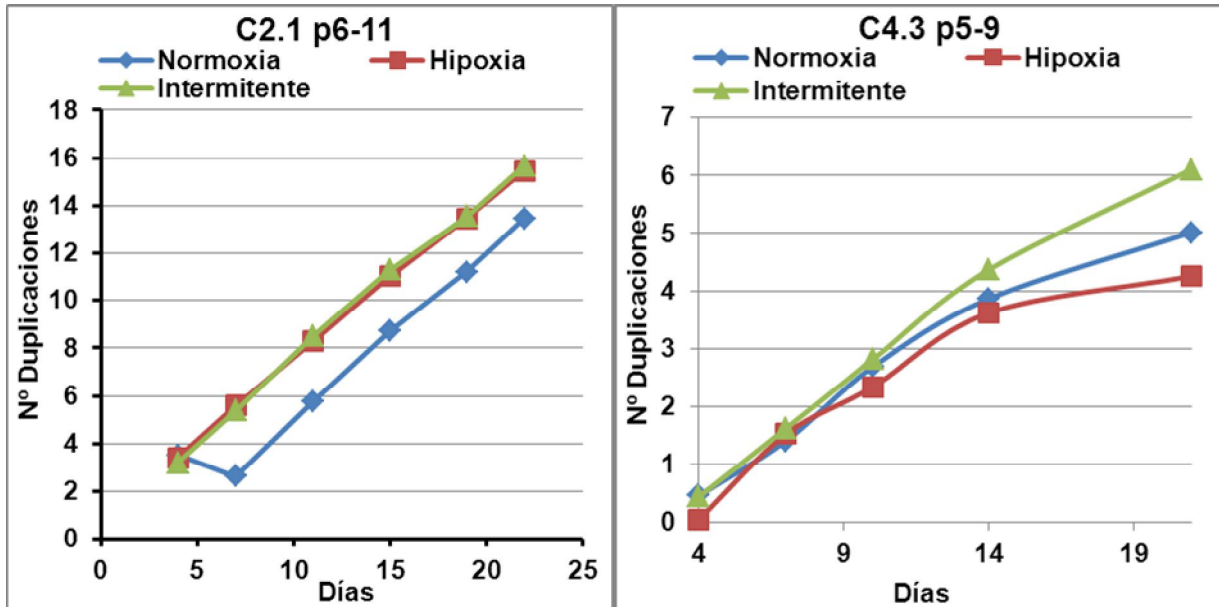


Figura 52: Proliferación en pases sucesivos en normoxia (21%) en azul, hipoxia moderada (5%) en rojo, y una condición intermitente entre las dos anteriores, en verde, de las líneas C2.1 y C4.3.

Este ensayo se testó sobre líneas de cordón, su crecimiento más rápido facilitaba el trabajo. Se emplearon las líneas C2.1 (pases 6 a 11) y C4.3 (pases 5 a 9). Salvo un problema que hubo en el primer pase de Normoxia de C2.1 y una cierta diferencia en el último pase de la línea C4.3, se puede considerar que prácticamente no hay diferencias en el crecimiento (ver Figura 52). En todo caso queda claro que no existe un efecto pernicioso directo del paso de una situación (Normoxia) a la otra (hipoxia). Esto confirma que la falta de diferencias es genuina en el ensayo anterior.

#### 8.4.2.2 Proliferación a tiempos cortos

Una línea de adulto (BH20) así como una línea de cordón (C1.4) se mantuvieron en expansión a lo largo de varios pases en condiciones de Normoxia (21% de oxígeno) o de hipoxia moderada (5% de oxígeno). Para varios de los pases se realizaron medidas de proliferación a tiempos cortos en esas mismas condiciones. Se sembraron para ello 5.000 células por pocillo en 2 placas de 24 pocillos, una para cada condición. La medida en la línea BH20, se repitió para los pases 2, 3, 4, 5 y 6 (ver Figura 53). La medida en la línea C1.4, se repitió para los pases 5, 7 y 9 (ver Figura 54).

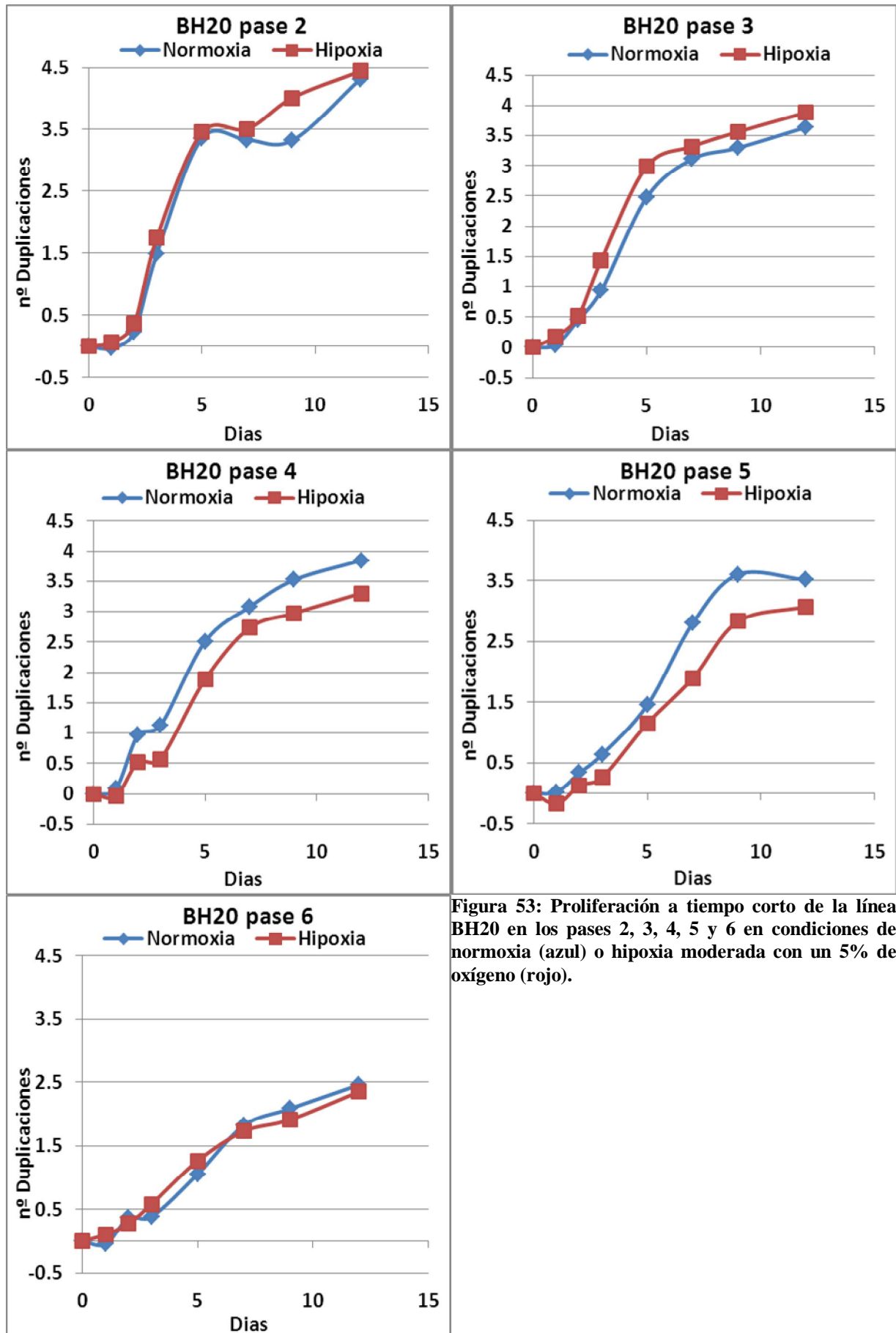


Figura 53: Proliferación a tiempo corto de la línea BH20 en los pases 2, 3, 4, 5 y 6 en condiciones de normoxia (azul) o hipoxia moderada con un 5% de oxígeno (rojo).

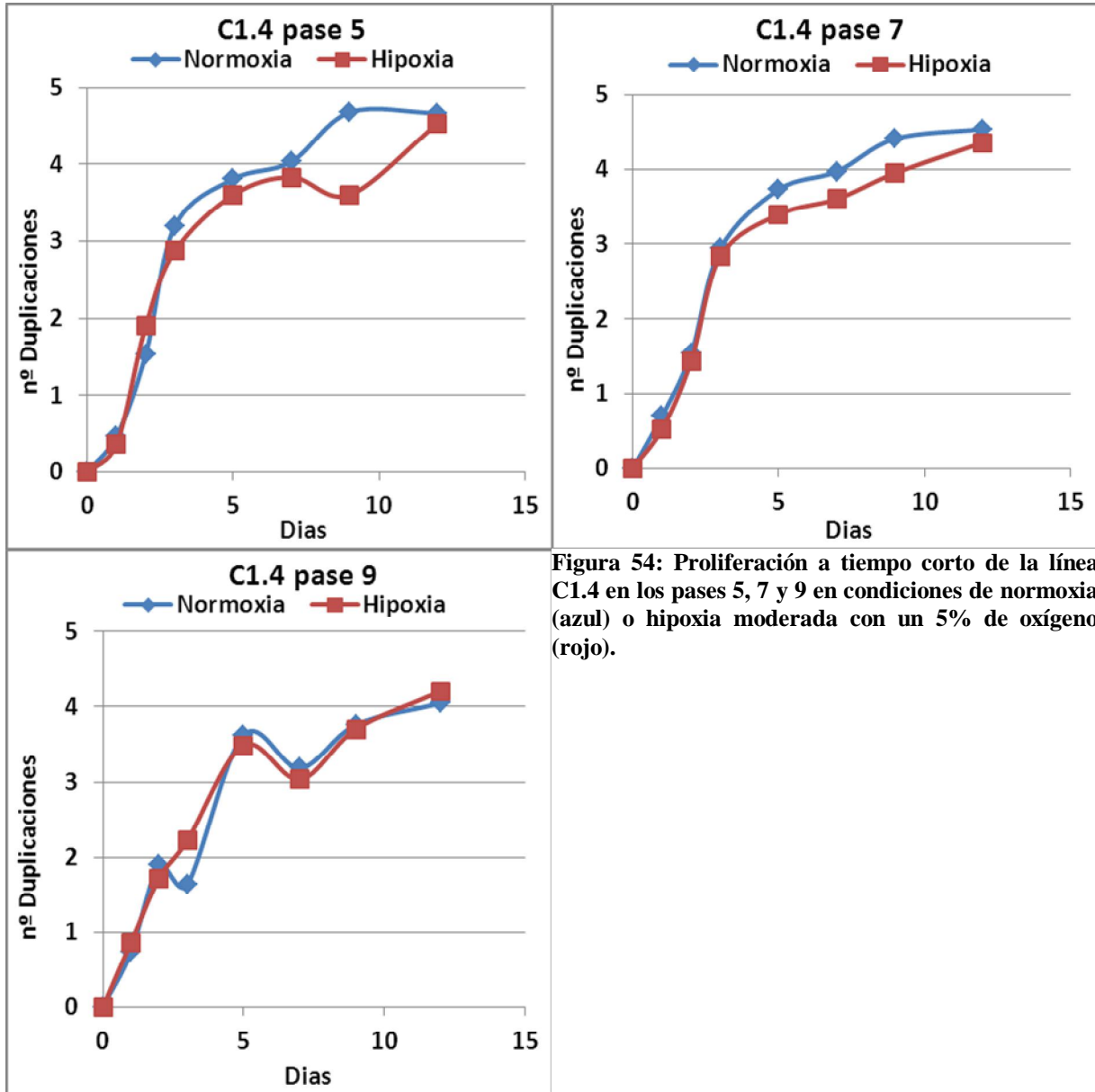


Figura 54: Proliferación a tiempo corto de la línea C1.4 en los pases 5, 7 y 9 en condiciones de normoxia (azul) o hipoxia moderada con un 5% de oxígeno (rojo).

El crecimiento de estas curvas de ECFC provenientes de adulto (Figura 53) y cordón (Figura 54) siguen la forma habitual de la proliferación celular; corta fase de adaptación inicial, fase de expansión exponencial y fase de latencia. Si consideramos la zona exponencial de las curvas podemos apreciar la evolución en los tiempos de expansión para las condiciones testadas tal y como se muestra en la Figura 55.

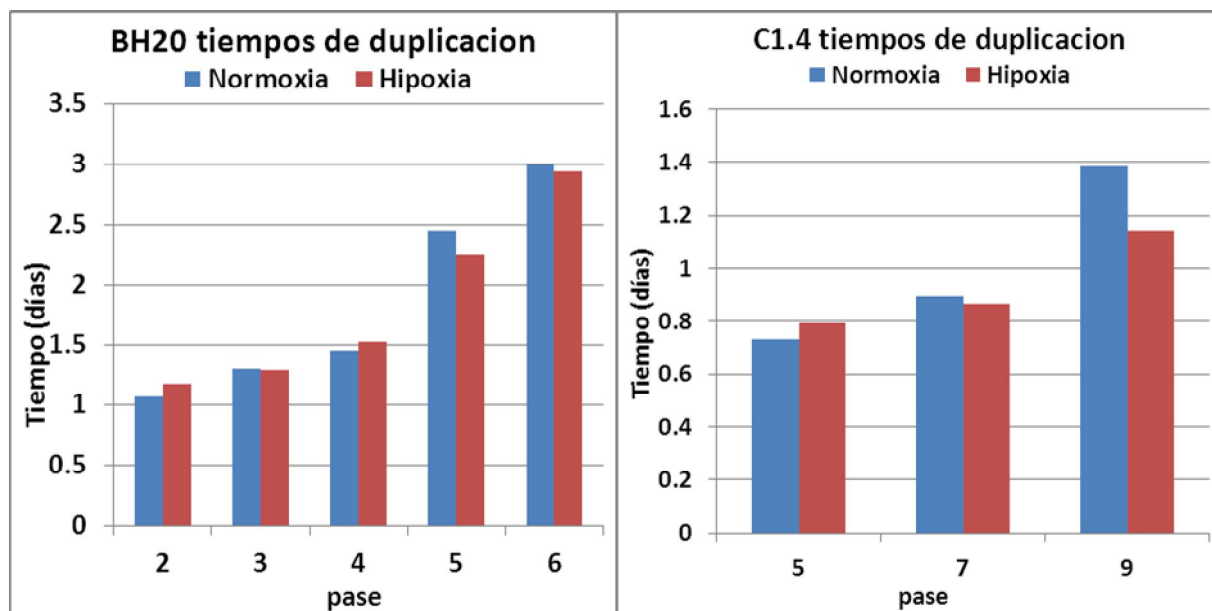


Figura 55: Evolución de los tiempos de duplicación para las líneas BH20 y C1.4 bajo condiciones de normoxia (azul) o hipoxia (rojo).

Por otra parte, comparando dos líneas que habían sido aisladas en condiciones de Normoxia (la línea C5.1 en sus pases 3 y 4) o hipoxia al 5% (la línea C5.2 en sus pases 3 y 4) se testó de nuevo el efecto de la hipoxia moderada sobre las curvas de crecimiento a tiempo corto. Se sembraron 5.000 células por pocillo y se tomaron medidas los días 0, 1, 2, 3, 5, 7, 9 y 12 tal y como se muestra en la Figura 56.

El resultado claro es que a pesar de las condiciones de aislamiento la proliferación no se ve modificada de forma importante. La ausencia de diferencias entre Normoxia e hipoxia 5% ya testada y confirmada es propia de las células ECFC en su conjunto, independientemente de las condiciones de aislamiento.

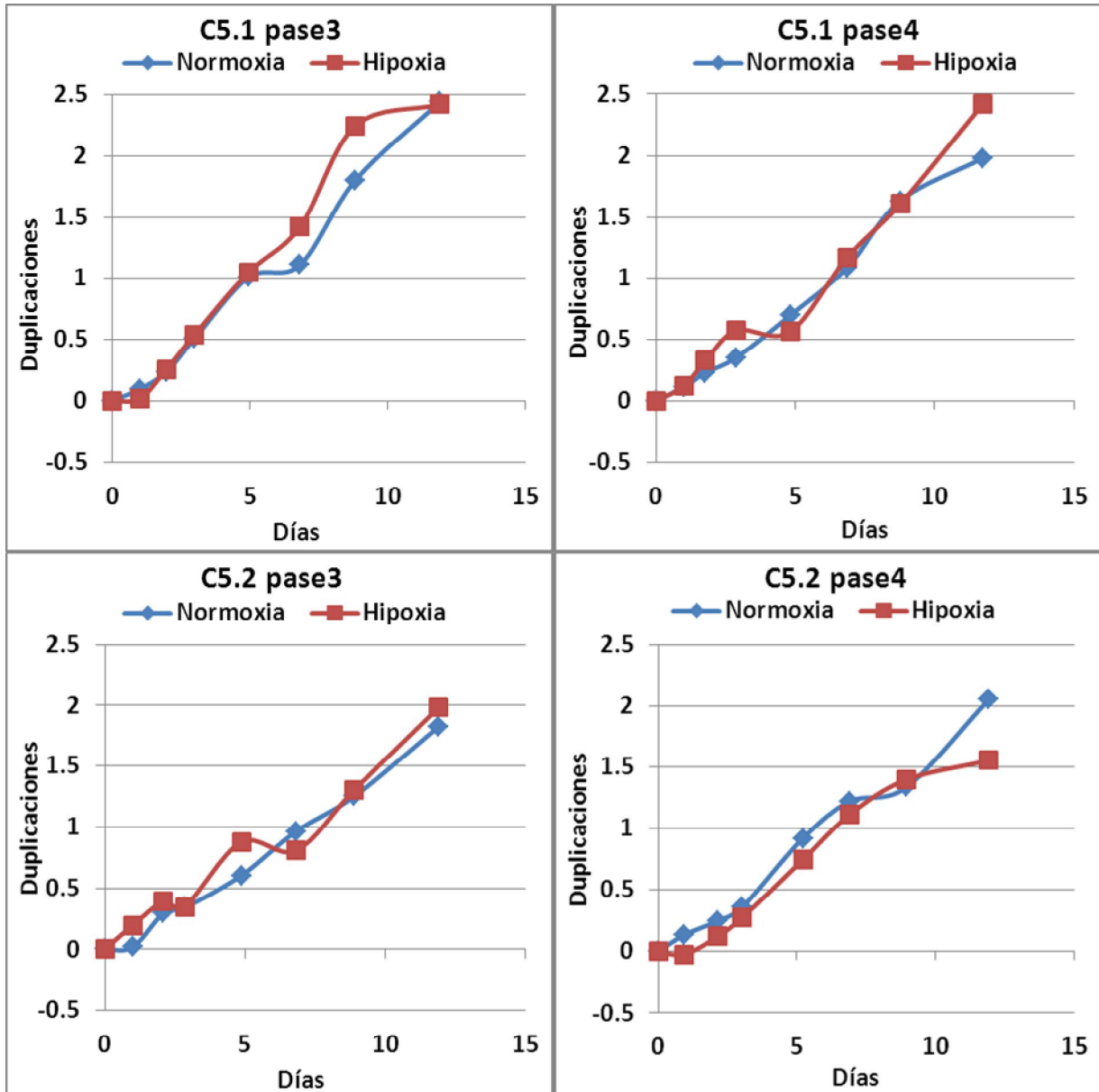


Figura 56: Proliferación a tiempo corto de la línea C5.1 (aislada en normoxia) en los pases 3 y 4 y la línea C5.2 (aislada en hipoxia 5%) en los pases 3 y 4, en condiciones de normoxia (azul) o hipoxia moderada (5% de oxígeno) (rojo).

#### 8.4.2.3 Ensayos clonogénicos

La Tabla 8 muestra los ensayos que se hicieron comparando Normoxia e hipoxia 5% sin más variables. Se indican la línea con la que se realiza el ensayo, el pase en el que se encuentra, la condición testada, los días que se mantuvieron creciendo las células, cuántas células se intentaron sembrar originalmente, cuántas colonias de más de 25 células se formaron, cuántas agrupaciones de 25 células o menos se localizaron, la media del tamaño de las colonias en células, la mediana del tamaño de las colonias en células,

cuántas células presentaba la colonia más grande y cuántas la más pequeña. Obsérvese que el mínimo nunca baja de las 26 células debido a que se desestimaron para los cálculos las agrupaciones de 25 células o menos siguiendo el criterio de otros autores (Ingram, 2004) tal y como se ha descrito en la metodología

El número de células sembradas varía entre ensayos debido a que se fue intentando perfeccionar para cada ensayo poner un número de células que permitiese obtener una cantidad de colonias apropiada para la comparación. Como la capacidad adherente varía enormemente entre pases y líneas se acabó optando por poner una cantidad de 50 células por pocillo de la placa de 6 a la hora de testar líneas de cordón en pases bajos y 100 en el resto de casos. Estas líneas generales, no obstante, se modificaron según se observara la evolución de la línea en el cultivo de expansión.

**Tabla 8: Detalles del ensayo clonogénico sobre las líneas C1.4 (pases 5, 7 y 9), ECFC (pases 3 a 5), BH20 (pases 2 a 4), C4.5 (pase 4), C5.1 (pase 1) y C5.2 (pase 1) en normoxia frente a hipoxia al 5% de oxígeno en aire.**

Línea	Pase	Condición	Días	Céls sembradas			Media	Mediana	Máximo	Mínimo
				>25	≤25					
C1.4	5	Normoxia	11	240	134	3	3932.746	2690.5	17574	34
C1.4	5	Hipoxia 5%	11	240	39	3	5471.3	3917.5	20026	30
C1.4	7	Normoxia	11	240	44	5	3013.841	1958	12000	26
C1.4	7	Hipoxia 5%	11	240	33	4	4578.485	4159	12774	28
C1.4	9	Normoxia	11	240	49	4	2839.531	1947	9000	32
C1.4	9	Hipoxia 5%	11	240	62	10	4266.371	4596	10000	51
C4.5	4	Normoxia	10	600	36	30	185.0556	80.5	1145	26
C4.5	4	Hipoxia 5%	10	600	33	30	368	234	1180	29
C5.1	1	Normoxia	10	300	56	6	333.6071	157	1485	28
C5.1	1	Hipoxia 5%	10	300	41	0	948.9756	466	7278	30
C5.2	1	Normoxia	10	300	54	2	471.1852	327	1685	26
C5.2	1	Hipoxia 5%	10	300	61	1	850.5574	720	3412	29
ECFC	3	Normoxia	10	600	77	33	165.3117	85	1150	27
ECFC	3	Hipoxia 5%	10	600	58	23	690.2414	264	4064	29
ECFC	4	Normoxia	10	600	18	63	61.44444	40	241	27
ECFC	4	Hipoxia 5%	10	600	66	46	158.6818	63	616	28
ECFC	5	Normoxia	10	600	17	69	61.11765	45	219	26
ECFC	5	Hipoxia 5%	10	600	30	63	76.9	40.5	664	26
BH20	2	Normoxia	14	600	114	50	1431.009	346.5	14231	29
BH20	2	Hipoxia 5%	14	600	95	61	1429.042	422	12735	27
BH20	3	Normoxia	14	600	49	46	456.2857	128	2688	28
BH20	3	Hipoxia 5%	14	600	30	43	782.8333	303	6409	30
BH20	4	Normoxia	14	600	3	9	112.6667	39	261	38
BH20	4	Hipoxia 5%	14	600	6	5	471	85	1705	28

Atendiendo al número de colonias surgidas por condición en cada línea, de nuevo, no hay tendencias de interés.

**Tabla 9: Número de colonias obtenidas en normoxia e hipoxia 5%.**

Línea	Pase	Normoxia	Hipoxia 5%
C1.4	5	134	39
C1.4	7	44	33
C1.4	9	49	62
C4.5	4	36	33
C5.1	1	56	41
C5.2	1	54	61
ECFC	3	77	58
ECFC	4	18	66
ECFC	5	17	30
BH20	2	114	95
BH20	3	49	30
BH20	4	3	6

El ensayo realizado sobre las líneas de cordón C5.1 (obtenida en Normoxia) y C5.2 (obtenida en hipoxia) buscaba averiguar si existían diferencias entre las condiciones de obtención de la línea, dado que procedían de la misma muestra de sangre. Pero si bien hubo alguna diferencia no llegaron a ser significativas.

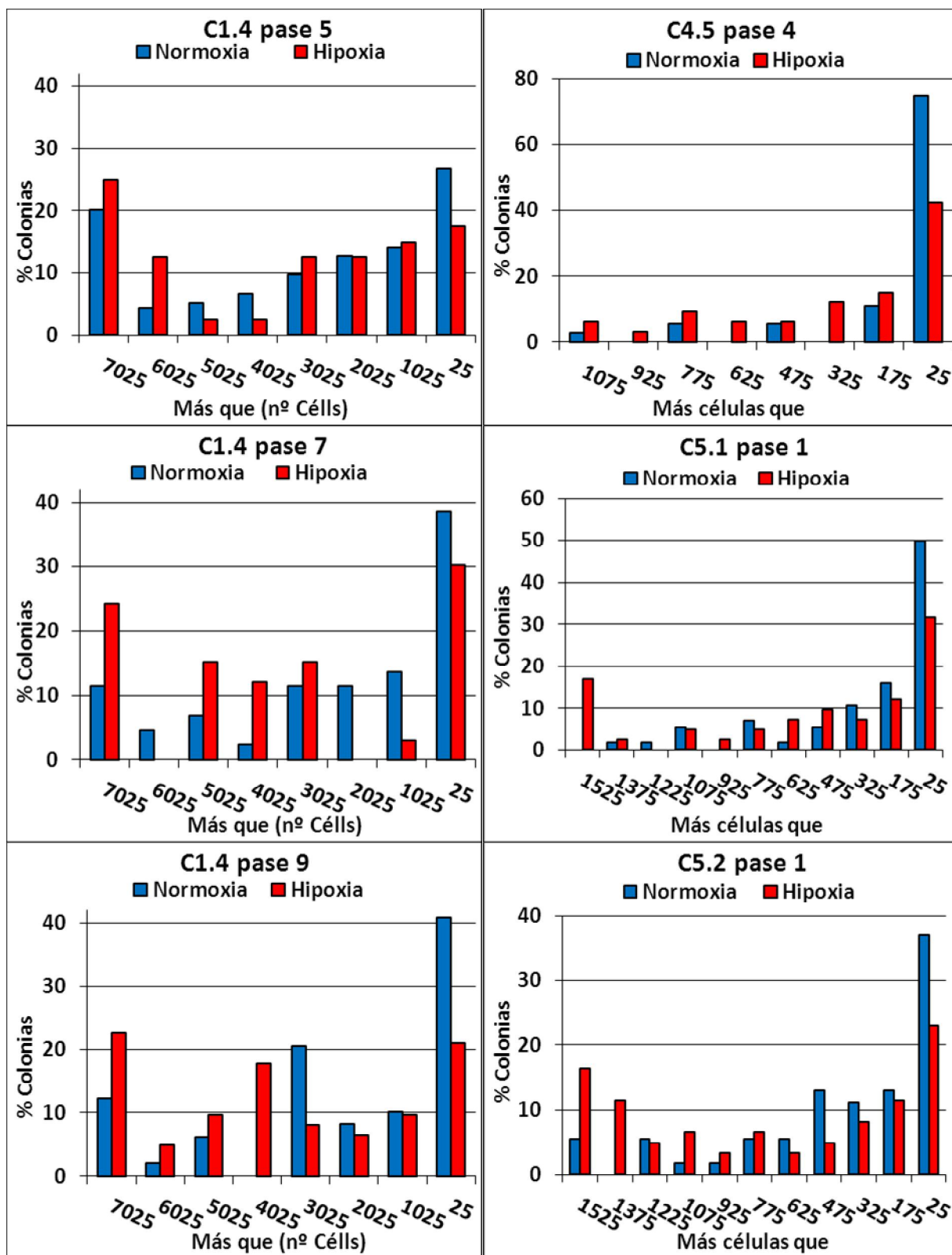


Figura 57: Histograma de los tamaños de las colonias formadas con las líneas procedentes de cordón testadas. Línea C1.4 en pases 5, 7 y 9, línea C4.5 fase 4, línea C5.1 fase 1 y línea C5.2 fase 1. Los resultados de normoxia (control) se muestran en azul y los de hipoxia (5% de oxígeno en aire) se muestran en rojo.



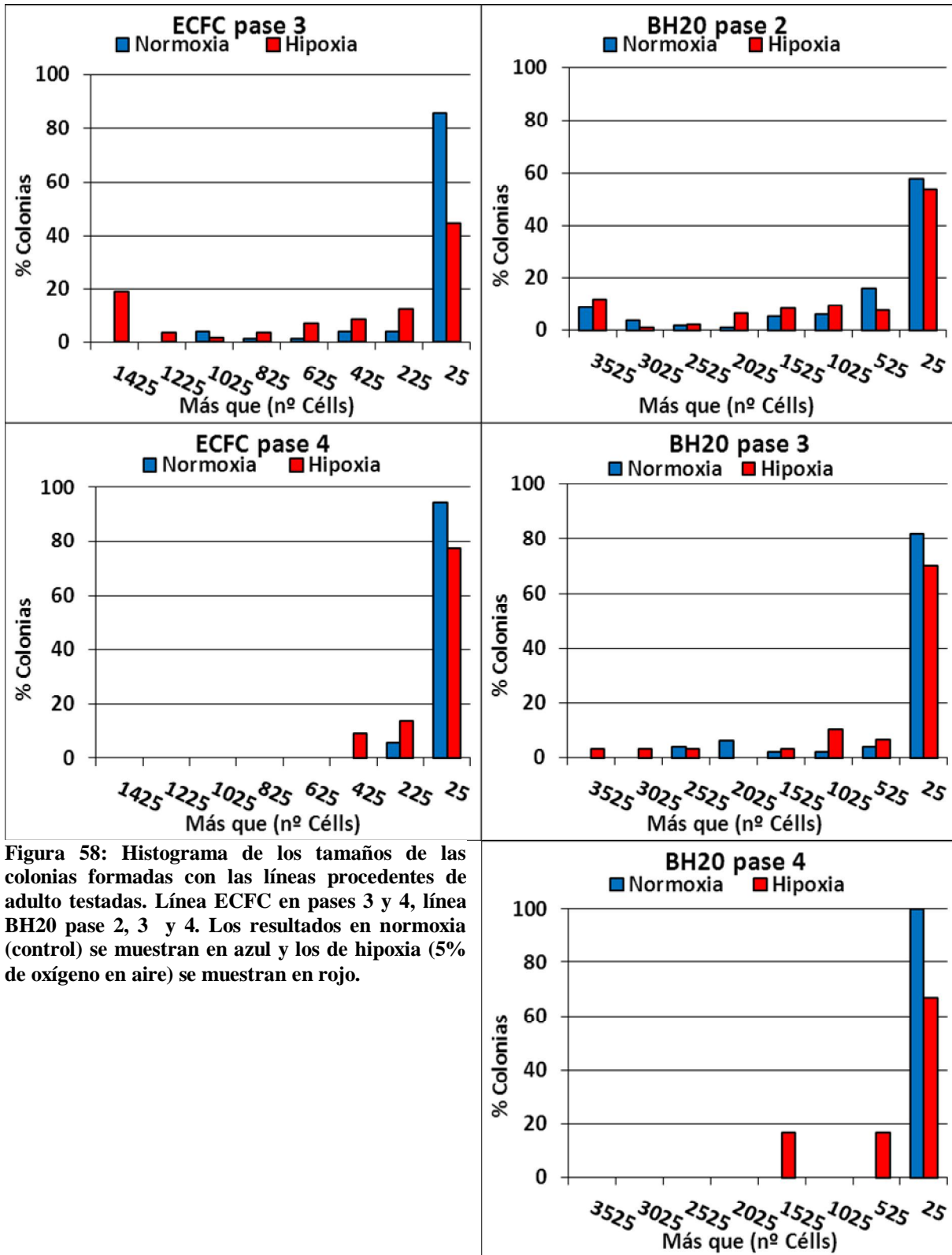
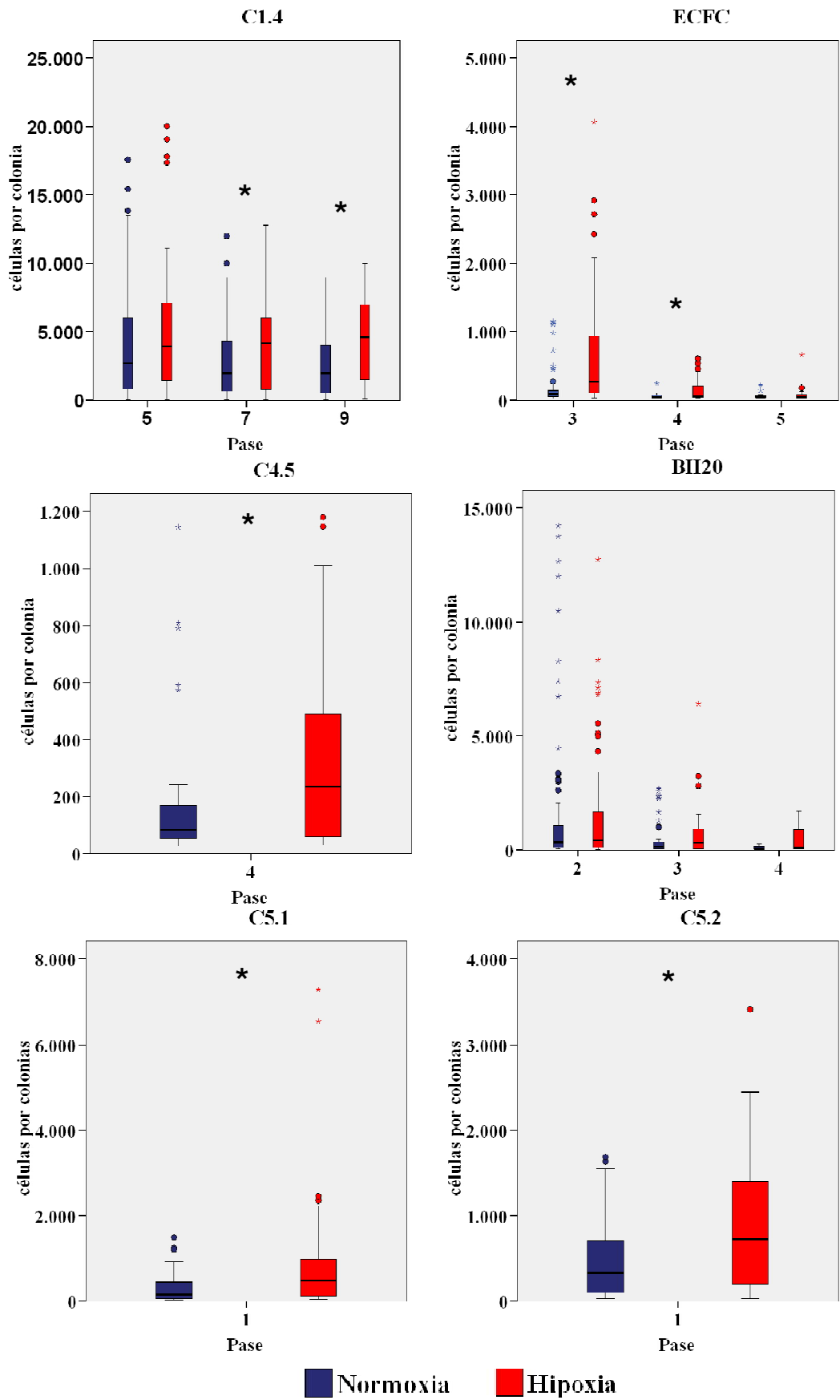


Figura 58: Histograma de los tamaños de las colonias formadas con las líneas procedentes de adulto testadas. Línea ECFC en pases 3 y 4, línea BH20 pase 2, 3 y 4. Los resultados en normoxia (control) se muestran en azul y los de hipoxia (5% de oxígeno en aire) se muestran en rojo.



**Figura 59: Representación por cuartiles del ensayo de clonogenia comparando normoxia (en azul) frente a hipoxia al 5% (en rojo) sobre las líneas de C1.4 (pases 5, 7 y 9), ECFC (pases 3, 4 y 5), C4.5 (pase 4), BH20 (pases 2, 3 y 4), C5.1 (pase 1) y C5.2 (pase 1). Se indica con un asterisco aquellos casos cuya diferencia resulte significativa según la prueba de Kolmogorov-Smirnov.**

#### 8.4.2.4 Apoptosis

Se comprobó el nivel de apoptosis por citometría de una línea de cordón (C1.4 pase 8) y una línea de adulto (BH20 pase 3) comparando Normoxia frente a hipoxia moderada (5% oxígeno). De la línea de adulto se hicieron 2 medidas del mismo pase, se muestra el promedio. Los resultados se muestran en la Tabla 10. No se apreciaron diferencias de importancia.

**Tabla 10: Valores de apoptosis en hipoxia moderada frente a normoxia para las líneas BH20 y C1.4**

BH20	Normoxia	Hipoxia		C1.4	Normoxia	Hipoxia
Necrosis	0.7%	0.55%		Necrosis	0.4%	0.2%
Muertas	9.3%	7.75%		Muertas	9.5%	7.2%
Vivas	86.15%	86.85%		Vivas	86%	87.8%
Apoptosis	3.8%	4.85%		Apoptosis	4.1%	4.8%

#### 8.4.2.5 Ciclo Celular

Se estudia el porcentaje de células en cada estadio del ciclo celular. Igual que en el ensayo anterior sobre una línea de cordón (C1.4 pase 8) y una línea de adulto (BH20 pase 3) comparando Normoxia frente a hipoxia moderada (5% oxígeno).

Se observa en ambos ensayos una tendencia a la reducción del índice de proliferación en hipoxia respecto de Normoxia. Sin embargo, resultó bastante más llamativo que las células de cordón mostraban casos con el doble de señal de la esperable. Esto se explicó como la demostración de la existencia de una importante población aneuploide con doble número de cromosomas. Los resultados se muestran en la Tabla 11.

**Tabla 11: Porcentaje de células en diferentes fases del ciclo celular en normoxia e hipoxia moderada para las líneas BH20 y C1.4. Se muestran la cantidad de células que presentaban aneuploidía en la medida de cordón.**

BH20		
Fase	Normoxia	Hipoxia
G0-G1	61.135%	63.56%
G2-M	21.94%	22.57%
S	16.925%	13.87%
IP	0.389	0.364

C1.4					
Diploide			Aneuploide		
Fase	Normoxia	Hipoxia	Fase	Normoxia	Hipoxia
G0-G1	41.78%	48.01%	G0-	47.29%	56.94%
G2-M	34.97%	22.62%	G2-	14.8%	11.08%
S	23.25%	29.36%	S	37.91%	31.98%
IP	0.582	0.520	IP	0.527	0.431

Total	Normoxia	Hipoxia
Diploide	59.17%	45.34%
Aneuploide	40.83%	54.66%

#### 8.4.2.6 Expresión de proteínas de superficie

Como se ha indicado, para que las células aisladas se consideraran ECFC se estudió que fueran positivas para el marcaje con anticuerpos frente a CD31, CD34, CD146, VEGFR2 y CXCR4 así como negativas para CD14 y CD45 aplicando anticuerpos y midiendo por citometría de flujo.

Además se estudió la evolución de otros marcadores a lo largo de diversos pases de las ECFC procedentes de la línea de cordón C1.4 en los pases 6, 8 y 10, en condiciones de Normoxia (21%) e hipoxia (5%). Se emplearon anticuerpos para CD3, CD13, CD14, CD29, CD31, CD34, CD45, CD54, CD62E, CD62P, CD73, CD90, CD105, CD106, CD117, CD133, CD144, CD146, KDR, CXCR4, HLA-ABC y HLA-DR.

En su gran mayoría no existían cambios entre la expresión de los marcadores entre las 2 condiciones testadas (esos datos sin diferencias entre las medidas no se muestran), pero sí hubo cambios de interés para el marcaje de CD29, CD34, CD106, CD117, CD133, CD144 y HLA-DR.

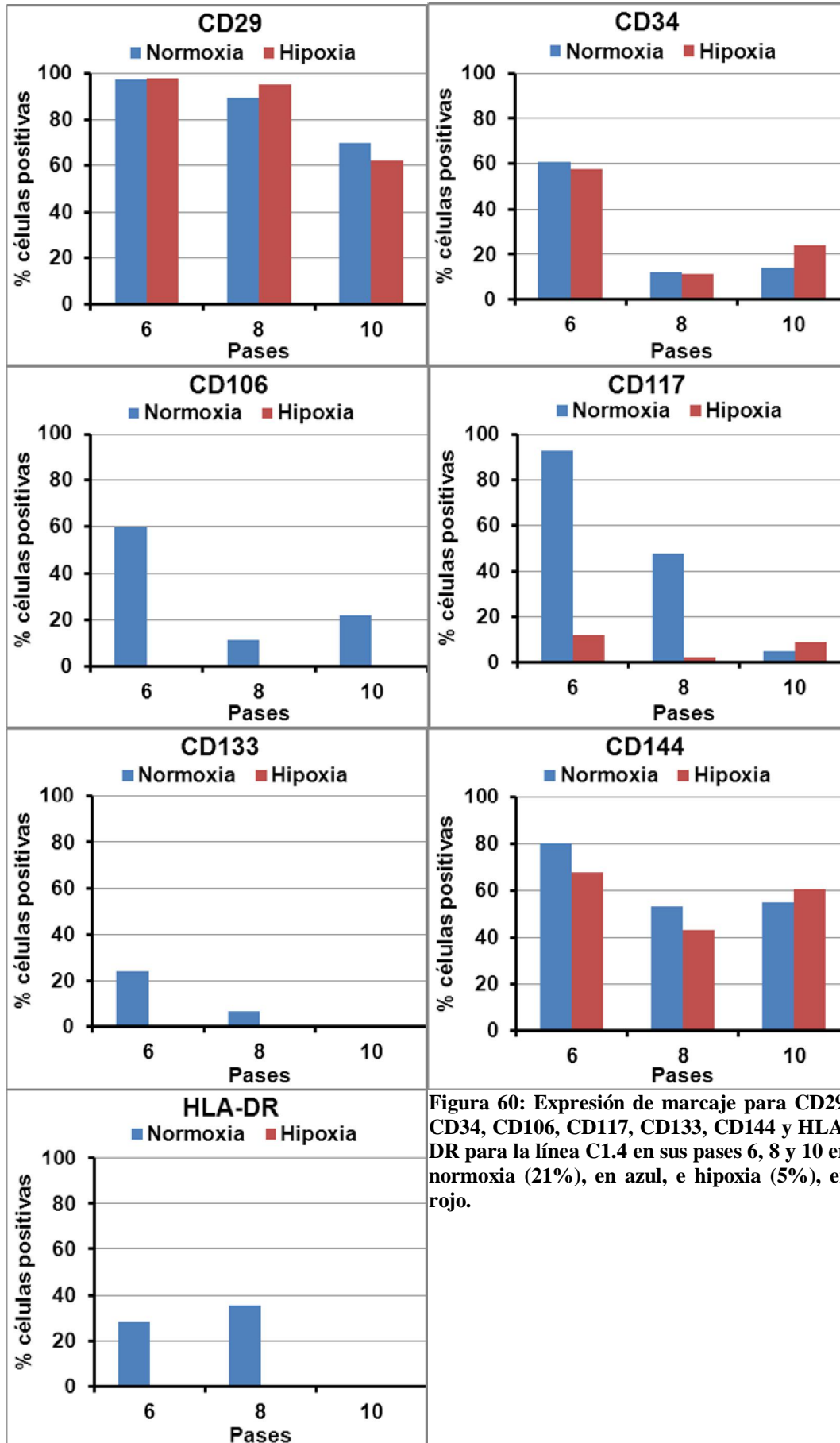


Figura 60: Expresión de marcaje para CD29, CD34, CD106, CD117, CD133, CD144 y HLA-DR para la línea C1.4 en sus pases 6, 8 y 10 en normoxia (21%), en azul, e hipoxia (5%), en rojo.

Los marcajes para CD29, CD34 y CD144 se van reduciendo progresivamente con los pases en cultivo de forma indistinta a la concentración de oxígeno. Pero sin llegar a desaparecer por completo. La expresión de CD106, CD117, CD133 y HLA-DR también se reduce con los pases de cultivo, pero en este caso la pérdida se acelera en hipoxia con un 5% de oxígeno en aire frente a la normoxia.

### 8.4.3 Normoxia frente a Hipoxia aguda

Más adelante fue posible realizar ensayos comparando la condición de normoxia control frente a hipoxia más acusada. Concretamente se testaron las condiciones del 3 y 1% de oxígeno en aire.

#### 8.4.3.1 Proliferación en pases sucesivos

Se llevaron a cabo ensayos de proliferación en pases sucesivos sobre las líneas BH10, pases: 6 a 12, y C1.2, pases 4 a 13, en normoxia, hipoxia 3%, hipoxia 1%. Las palcas en hipoxia al 1% de la línea C1.2 no crecieron, se intentó resembrarlas a partir de la placa creciendo en normoxia 2 veces, mostrado en la Figura 61, pero sin éxito.

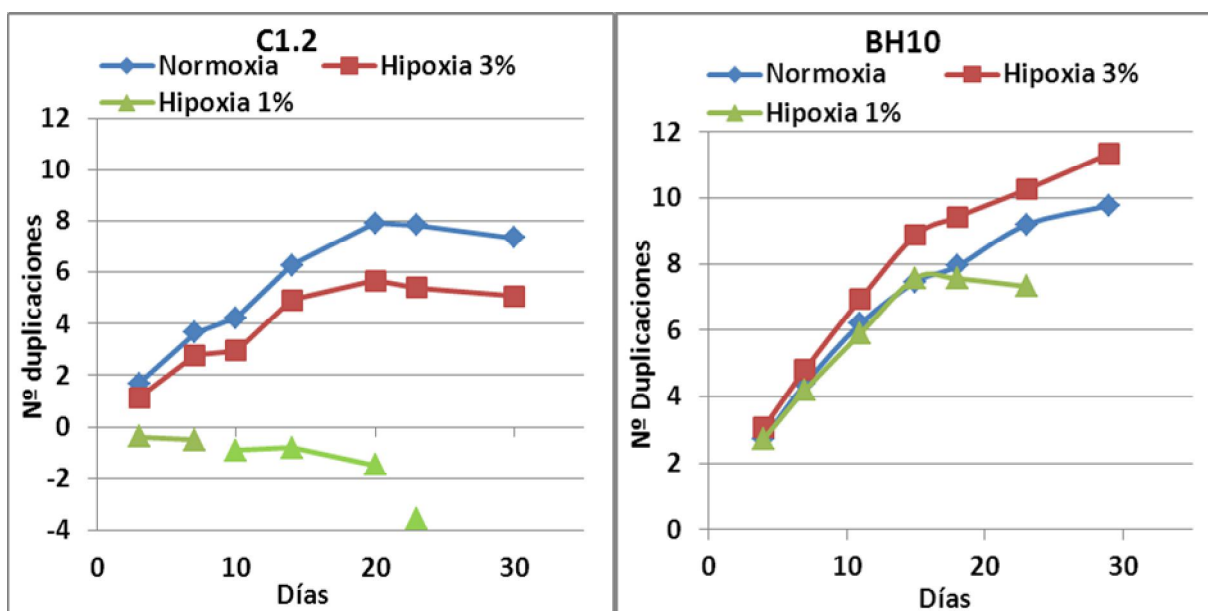


Figura 61: Curva de crecimiento en pases sucesivos de las líneas C1.2 y BH10 en condiciones de normoxia (control) e hipoxia con un 3 y un 1% de oxígeno.

El motivo exacto por el que no fue posible mantener por varios pases la línea C1.2 no llegó a averiguarse. Es un efecto que no ocurre en tanta extensión con el ensayo equivalente con la línea BH10, pero que tampoco pudo aguantar tantos pases como las otras concentraciones de oxígeno. Es reseñable que otros ensayos a tiempos más cortos,

que se detallan en los apartados siguientes, no mostraron este efecto negativo que parece ser aparente sólo tras varios pases.

La línea C1.2 parece crecer algo mejor en normoxia mientras que la de adulto parecería crecer algo mejor en hipoxia al 3%. Como el conjunto de ambas líneas no arroja tendencias claras y los ensayos siguientes de proliferación a tiempos cortos no mostraron tampoco diferencias, estos cambios se adujeron propios al error experimental.

#### **8.4.3.2 Proliferación a tiempos cortos**

La prueba de crecimiento a tiempos cortos se realizó sobre una línea de cordón (C2.1) y otra de adulto (BH10). La prueba se inicia sobre la línea de cordón en el pase 6 sembrando 5.000 células por pocillo con la intención de tomar medidas los días 0, 1, 2, 3, 5, 7, 9 y 12. Para el último punto la confluencia ya había alcanzado el 100% y no se pudo medir. El rápido crecimiento de la línea de cordón permitió repetir la medida en el pase 10, donde se sembraron sólo 1.000 células por pocillo, tomando las medidas los días (0, 1, 2, 3, 5, 7, 9 y 12). La medida sobre la línea de adulto se realiza sobre el pase 6 sembrando inicialmente 1.000 células por pocillo y tomando medidas los días 0, 1, 2, 3, 5, 7, 9 y 12.

Los resultados, que se muestran en la Figura 62, no indican cambios de importancia. Sí parece apreciarse un ligero detrimento por parte de la hipoxia más extrema (1% oxígeno) en todos los ensayos. En coherencia con las limitaciones observadas en las pruebas de proliferación en pases sucesivos.

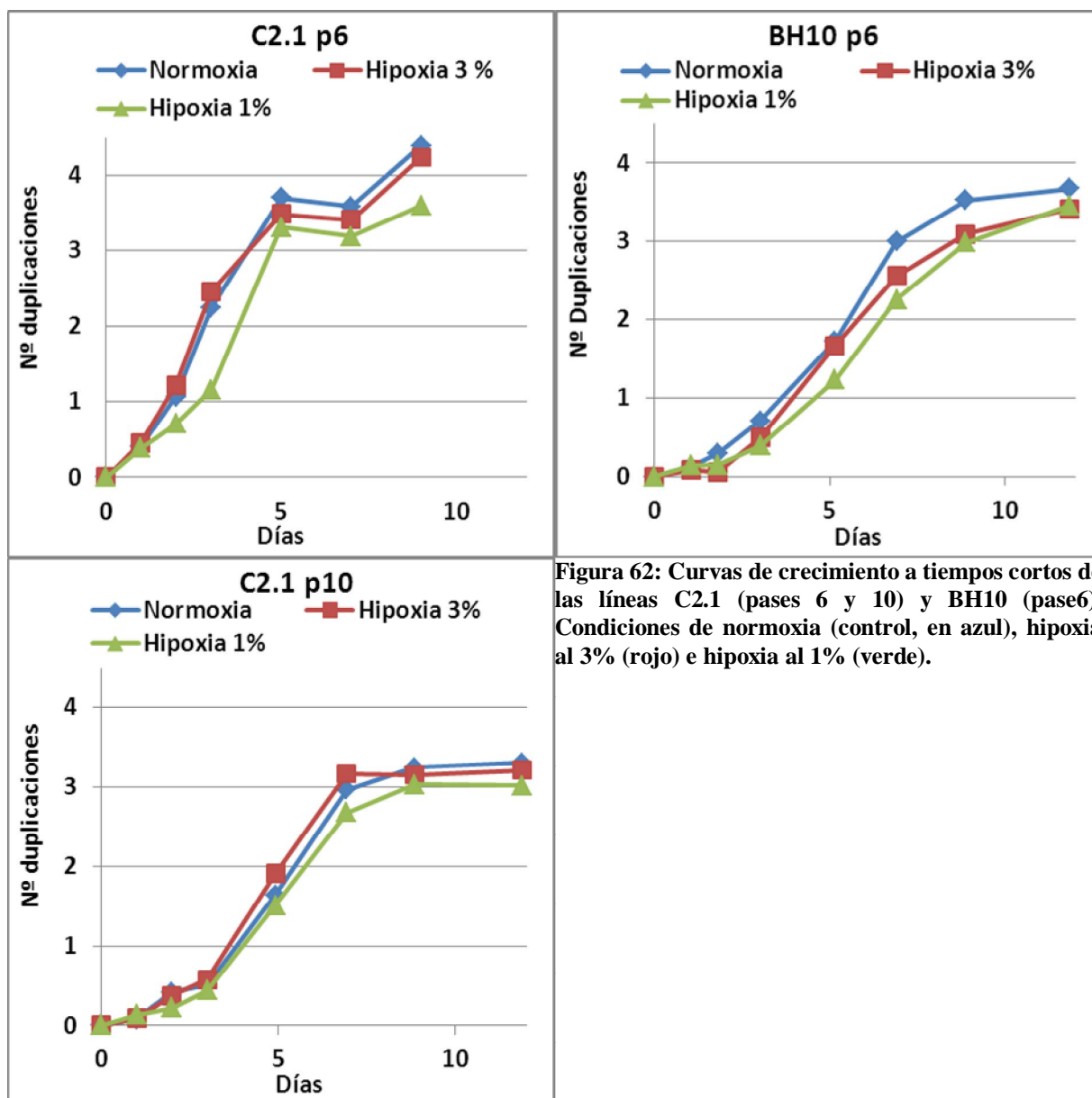


Figura 62: Curvas de crecimiento a tiempos cortos de las líneas C2.1 (pases 6 y 10) y BH10 (pase6). Condiciones de normoxia (control, en azul), hipoxia al 3% (rojo) e hipoxia al 1% (verde).

### 8.4.3.3 Ensayos clonogénicos

Se hizo un ensayo clonogénico como ya se ha descrito sobre una línea de adulto así como sobre una línea de cordón.

Tabla 12: Detalles del ensayo clonogénico sobre las líneas C2.1 (pase 6) y BH10 (pase 6) en normoxia frente a hipoxia al 3 y 1% de oxígeno.

Línea	Pase	Condición	Días	Céls sembradas	>25	≤25	Media	Mediana	Máximo	Mínimo
C2.1	6	Normoxia	7	300	150	59	322.12	271.5	1356	27
C2.1	6	Hipoxia 3%	7	300	130	65	812.223	521	5285	26
C2.1	6	Hipoxia 1%	7	300	121	67	657.107	516	3786	32
BH10	6	Normoxia	12	300	59	102	295.271	191	1647	28
BH10	6	Hipoxia 3%	12	300	51	104	375.588	163	6117	27
BH10	6	Hipoxia 1%	12	300	45	108	318.778	180	1258	28



Nuevamente, no se aprecian diferencias en el número de colonias formadas entre las condiciones.

Tabla 13: Número de colonias entre normoxia, hipoxia 3% e hipoxia 1%.

Línea	Pase	Normoxia	Hipoxia 3%	Hipoxia 1%
C2.1	6	150	130	121
BH10	6	59	51	45

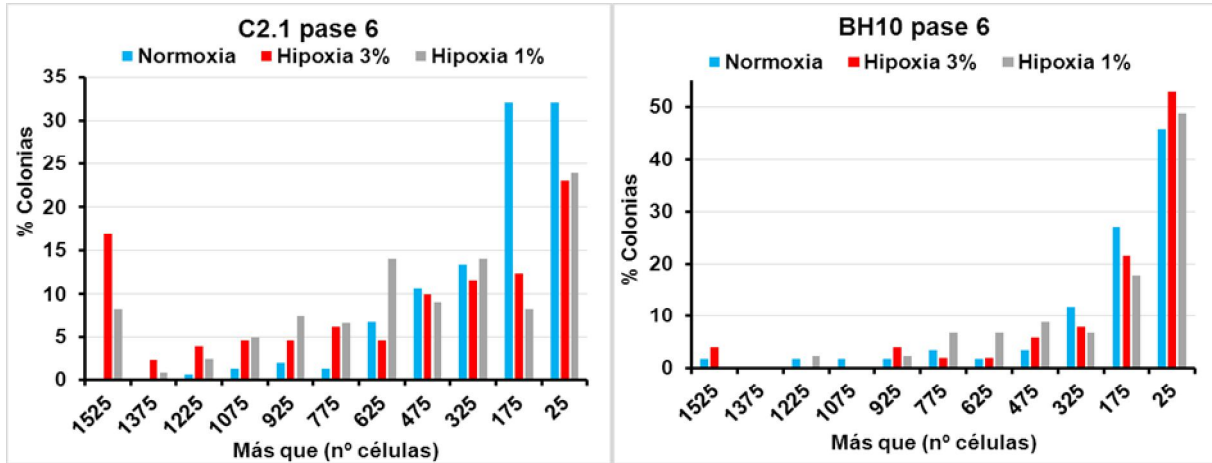


Figura 63: Histograma de los tamaños de las colonias formadas de la línea C2.1 en pase 6 y línea BH10 pase 6. Los resultados para el ensayo en normoxia (control) se muestran en azul, los correspondientes en hipoxia a un 3% de oxígeno en aire se muestran en rojo y a un 1% de oxígeno en aire en gris.

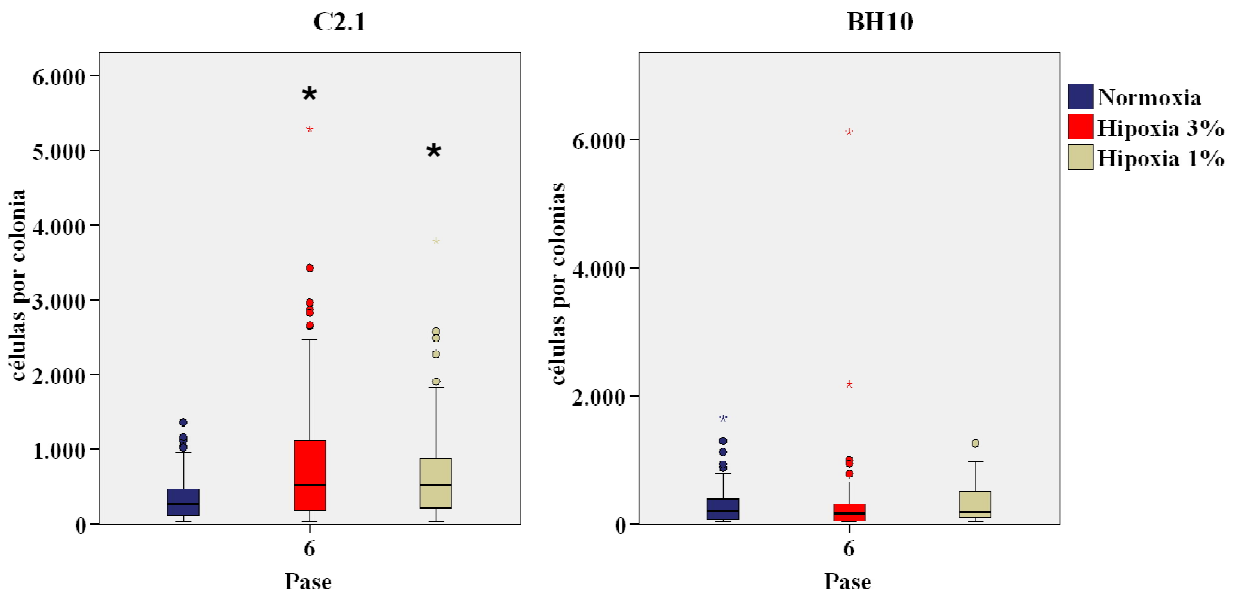


Figura 64: Representación por cuartiles del ensayo clonogénico comparando normoxia (en azul) frente a hipoxia al 3% (en rojo) e hipoxia al 1% (en gris) sobre las líneas C2.1 (pase 6) y BH10 (pase 6). Se indica con un asterisco las condiciones donde el tamaño de las colonias era significativamente diferente de la normoxia.

En la Tabla 12 se muestran los datos generales de estos 2 ensayos y los datos en formato de histograma se ofrecen en la Figura 63 y en formato de distribución en la Figura 64. En este caso la línea BH10 procedente de adulto formó gran número de tamaño medio en normoxia, por lo que si bien había más colonias de gran tamaño en hipoxia (especialmente al 3%) la diferencia no alcanzó significancia al considerar la distribución. La línea C2.1 procedente de cordón, por otro lado, muestra unas diferencias más acusadas que alcanzan una diferencia significativa tanto para hipoxia al 3% como al 1%. Esta diferencia parece más acusada para la hipoxia al 3%.

Visto que hay una diferencia con una tendencia constante, aunque no siempre significativa, en el ensayo clonogénico que no existía en los ensayos comunes de proliferación, se consideró la posibilidad de si el efecto observado sobre la capacidad clonogénica tendría que ver con la baja asiduidad con que se cambia el medio en este tipo de cultivos, de bajo requerimiento con respecto a los cultivos habituales. La idea sería la siguiente: si la hipoxia inducía la excreción al medio de efectores paracrinicos como el VEGFA en mayor medida que la normoxia, tal vez permitir que el medio enriquecido en estos factores permaneciese en contacto con las células ayude en su crecimiento. Para comprobarlo se repitió el ensayo pero cambiando el medio diariamente a la mitad de los pocillos de la placa (3 en cada caso). Tanto sobre una línea de adulto (BH10 en su pase 9) como una línea de cordón (C1.2 en sus pases 7 y 8). Tanto los datos numéricos (ver Tabla 14) como las representaciones gráficas muestran un efecto de interés.

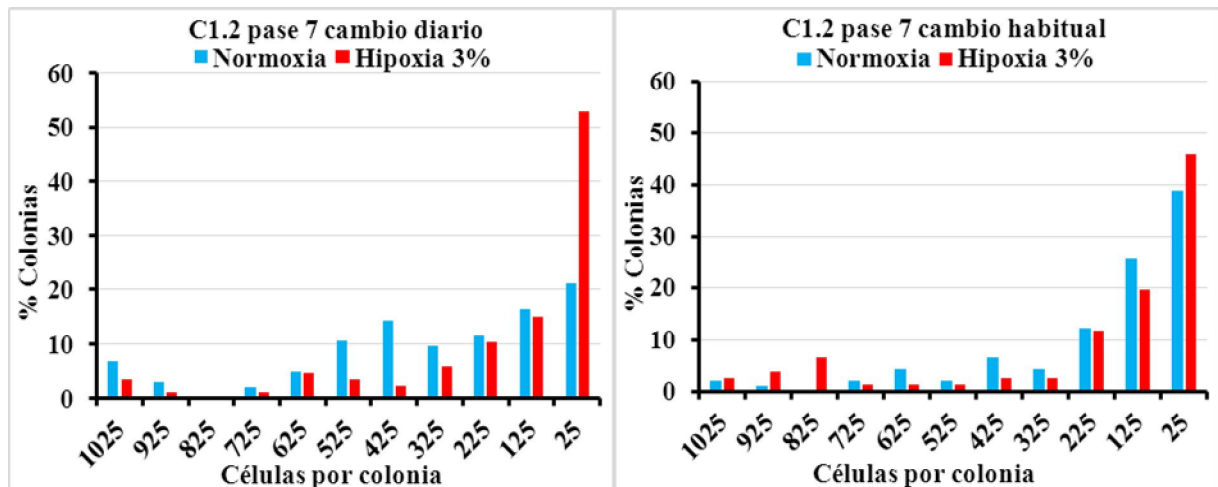
**Tabla 14: Detalles del ensayo clonogénico sobre las líneas C2.1 (pase 7) y BH10 (pase 9) en normoxia frente a hipoxia al 3 y 1% de oxígeno bien cambiando el medio cada 5 días (habitual) o diariamente.**

Línea	Pase	Condición	Condición Especial	Días	Céls sembradas	>25	≤25	Media	Mediana	Máx	Mín
BH10	9	Normoxia	Normal	12	300	26	98	221.769	77	2355	30
BH10	9	Normoxia	Cambio de medio diario	12	300	26	83	159.615	100	770	27
BH10	9	Hipoxia 3%	Normal	12	300	35	118	217.171	104	1450	27
BH10	9	Hipoxia 3%	Cambio de medio diario	12	300	15	102	110.333	107	439	31
BH10	9	Hipoxia 1%	Normal	12	300	19	103	119.053	60	893	27
BH10	9	Hipoxia 1%	Cambio de medio diario	12	300	14	108	122.643	64	623	29
C1.2	7	Normoxia	Normal	8	300	70	90	251.7	162.5	1495	26
C1.2	7	Normoxia	Cambio de medio diario	8	300	78	104	424.885	328.5	2774	30
C1.2	7	Hipoxia 3%	Normal	8	300	73	76	301.592	154.5	3100	26

Efecto de la Hipoxia sobre las Células Progenitoras Endoteliales

Línea	Pase	Condición	Condición Especial	Días	Céls sembradas	>25	≤25	Media	Mediana	Máx	Mín
C1.2	7	Hipoxia 3%	Cambio de medio diario	8	300	106	83	213.554	120	1140	26
C1.2	7	Hipoxia 1%	Normal	8	300	205	3	36.333	36	44	29
C1.2	7	Hipoxia 1%	Cambio de medio diario	8	300	197	4	47.750	30	104	27
C1.2	8	Normoxia	Normal	11	300	22	59	725.455	177.5	3866	27
C1.2	8	Normoxia	Cambio de medio diario	11	300	27	64	1969.444	829	8343	29
C1.2	8	Hipoxia 3%	Normal	11	300	28	50	627.857	264.5	4142	31
C1.2	8	Hipoxia 3%	Cambio de medio diario	11	300	22	67	582.227	171	3932	33
C1.2	8	Hipoxia 1%	Normal	11	300	2	72	94.5	94.5	158	31
C1.2	8	Hipoxia 1%	Cambio de medio diario	11	300	0	66	No había	No había	No había	No había

Para la representación gráfica se muestran los histogramas agrupados de dos formas diferentes. En la Figura 65 se representan los tamaños de las colonias separando en gráficas diferentes según se hiciera el cambio de medio diariamente (a la izquierda) o de la forma habitual (a la derecha). En estas representaciones no se muestran los valores de la línea de cordón en hipoxia al 1% al no haber formado colonias prácticamente. En la Figura 66 se han separado los datos según condiciones de normoxia, hipoxia al 3 y 1 % para comparar el efecto del cambio del medio. En la Figura 67 se muestra la distribución de todas las condiciones.



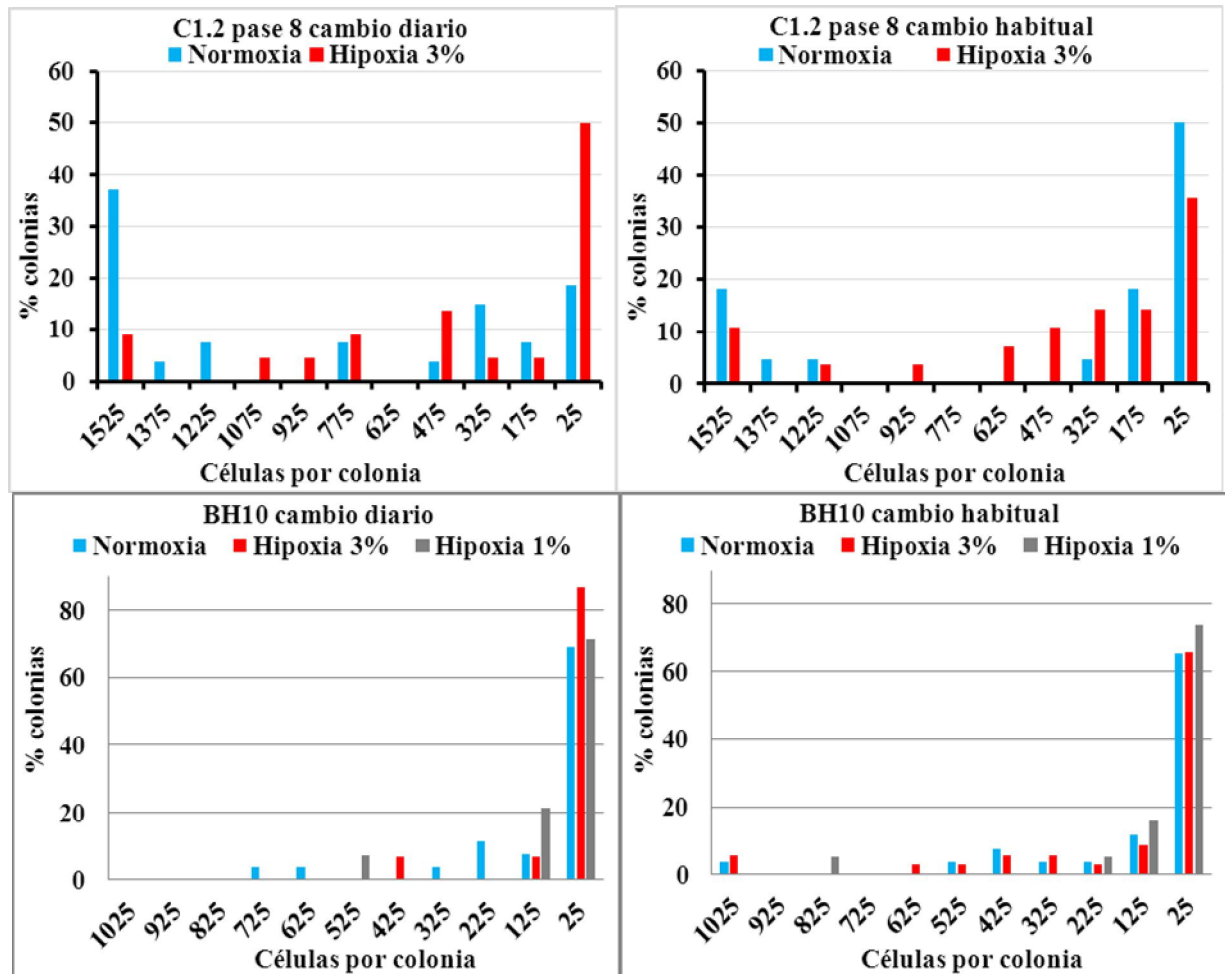
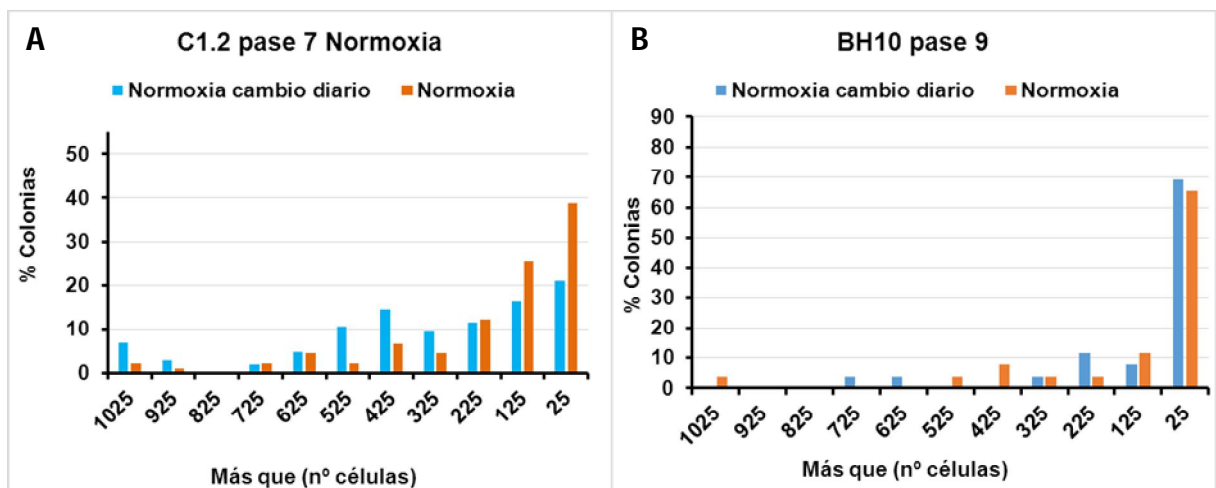


Figura 65: Histograma comparativo de las condiciones de normoxia (en azul), hipoxia al 3% (en rojo) e hipoxia al 1% (en gris). Con cambio de medio diario (a la izquierda) o cambio de medio habitual (a la derecha) Se muestran los resultados para la línea C1.2 pase 7, C1.2 pase 8 y BH10 pase 9.



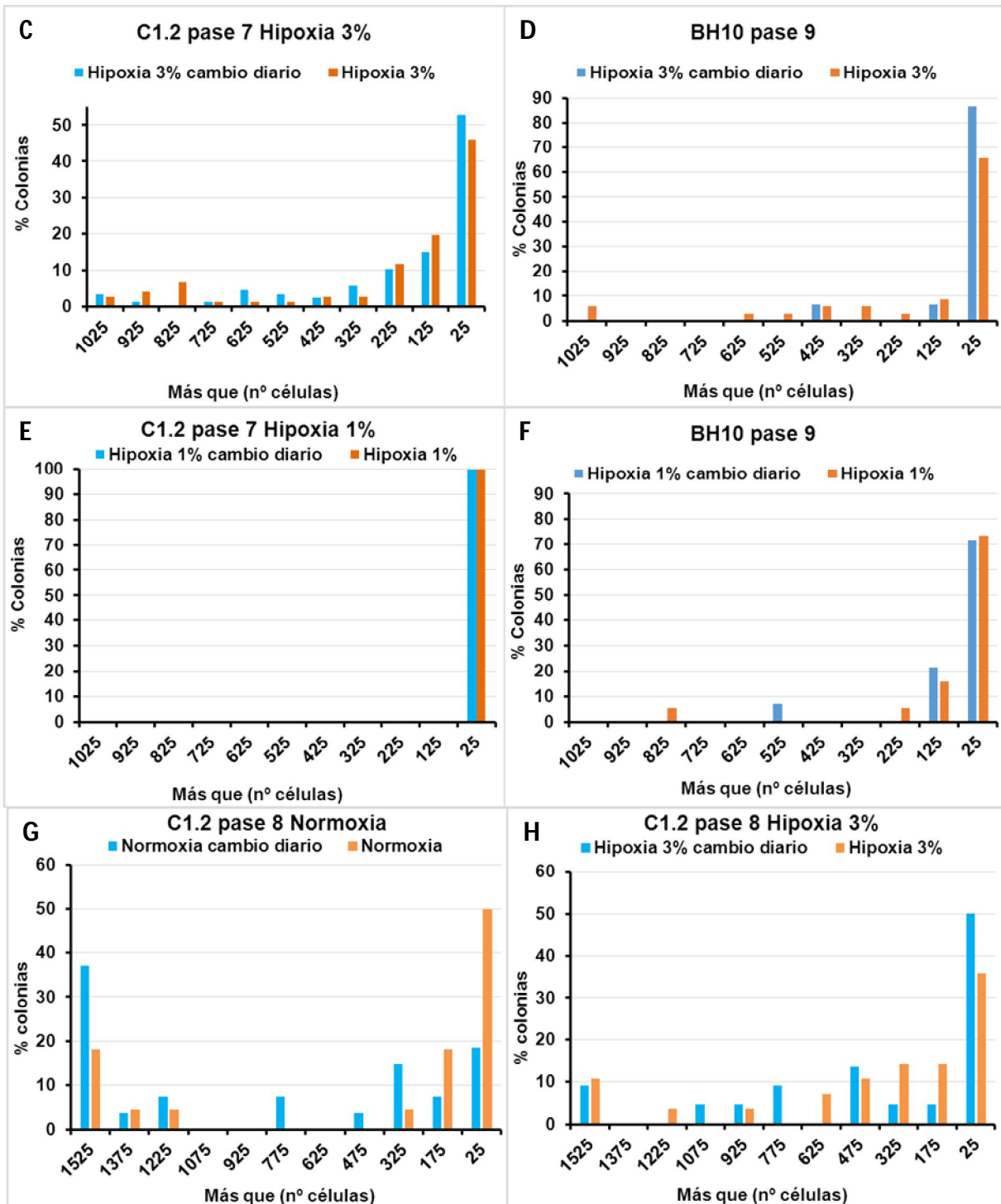


Figura 66: Histograma de los tamaños de las colonias formadas a diferentes frecuencias en el cambio de medio. Línea C1.2 en pase 7, en normoxia (A), hipoxia al 3% (C) e hipoxia al 1% (E). Línea BH10 en pase 9, en normoxia (B), hipoxia al 3% (D) e hipoxia al 1% (F). Línea C1.2 en pase 8, en normoxia (G) e hipoxia al 3% (H). Se muestran los resultados de cambiar el medio diariamente en azul y los resultados de cambiar el medio cada 5 días en naranja.

El cambio habitual de medio promueve que las colonias crecidas al cultivar a una concentración del 3% de oxígeno en aire sean algo más grandes que sus equivalentes a un 21% de oxígeno en aire. Por el contrario, cuando el cambio de medio se hace diariamente, el resultado tiende a la inversa y hay un mayor número de colonias grandes en normoxia que en hipoxia con un 3% de oxígeno en aire. En cualquiera de los casos la hipoxia extrema (1% de oxígeno en aire) parece perjudicial a los otros casos comparados. Este efecto queda reflejado en la Figura 65, donde se muestra la comparativa normoxia-hipoxia del 3% con cada frecuencia en el cambio de medio para la línea de cordón. La línea de adulto formó colonias más pequeñas en general y resulta menos evidente en el histograma, aunque en la distribución la tendencia es clara.

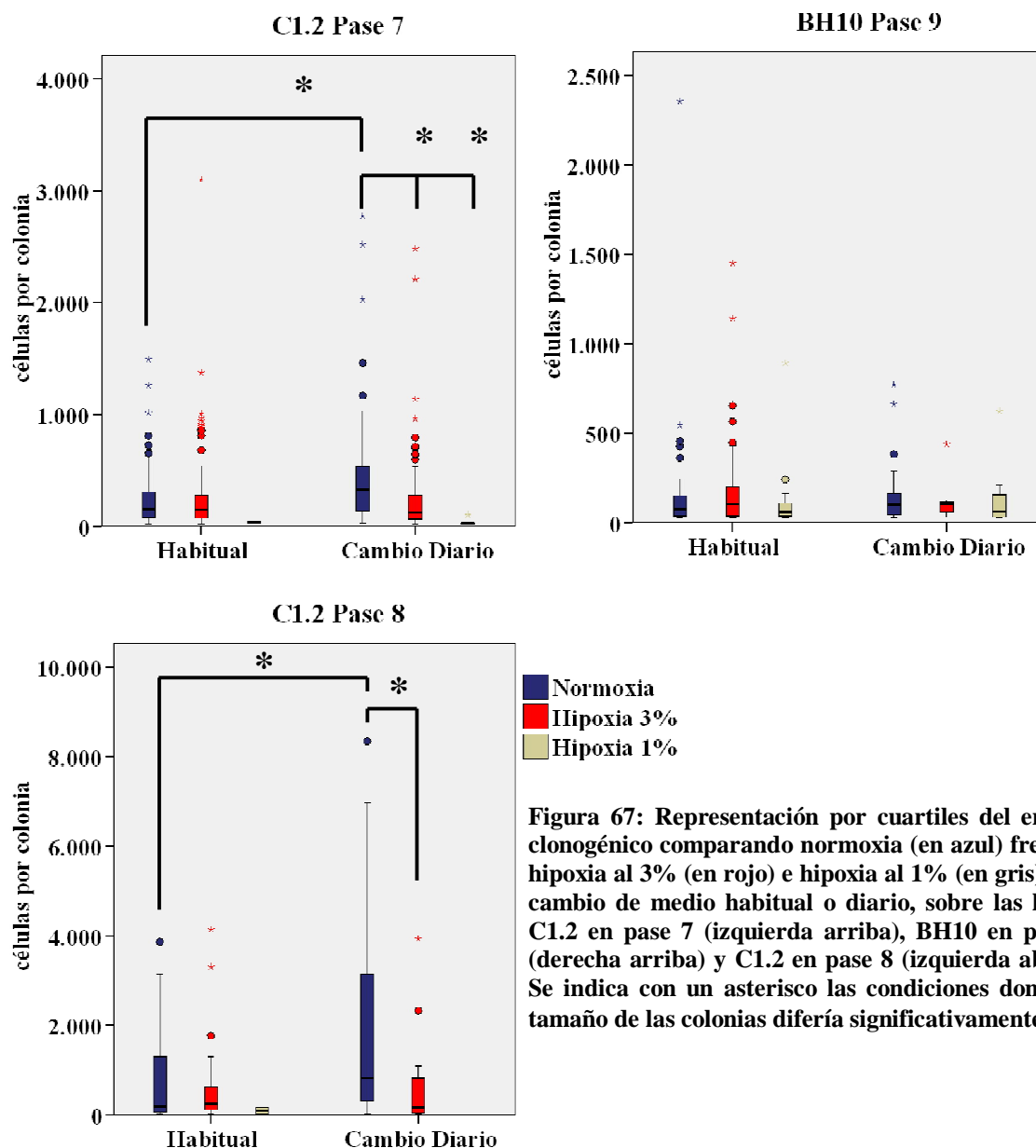


Figura 67: Representación por cuartiles del ensayo clonogénico comparando normoxia (en azul) frente a hipoxia al 3% (en rojo) e hipoxia al 1% (en gris), con cambio de medio habitual o diario, sobre las líneas C1.2 en pase 7 (izquierda arriba), BH10 en pase 9 (derecha arriba) y C1.2 en pase 8 (izquierda abajo). Se indica con un asterisco las condiciones donde el tamaño de las colonias difería significativamente.

A pesar de que la diferencia entre colonias cultivadas en normoxia e hipoxia 3% de la línea de cordón no se ve con la claridad de ensayos previos, esta misma línea se empleó más adelante en ensayos de crecimiento clonogénico (representado en la Figura 70). En ese ensayo las colonias que se formaran en hipoxia 3% eran significativamente más grandes, como no eran los datos que se buscaban en el ensayo no se hicieron medidas que mostrar, sólo fue una observación durante la vigilancia del cultivo. Este hecho da idea de que la reducción en la diferencia sea probablemente debida al hecho de que la placa se sacaba diariamente de la estufa de hipoxia para poder hacer el cambio de medio diario a la mitad de los pocillos. La exposición asidua a una concentración atmosférica de oxígeno afectó, con toda probabilidad a la concentración efectiva a la que se enfrentaban las células.

El bajo crecimiento observado para la condición de hipoxia 1%, observado específicamente en la línea de cordón empleada en este experimento y no en otros ensayos previos, sugiere que hubo un problema puntual en la estufa correspondiente que a fecha de hoy no hemos podido diagnosticar. O bien que la hipoxia extrema afecta a esta línea de forma extraordinaria.

#### **8.4.3.4 Senescencia**

También comparando normoxia e hipoxia al 3 y 1% de oxígeno se testó la senescencia. Se hizo un ensayo sobre una línea de cordón (C2.1 pase 6) sembrando 10.000 células por pocillo y manteniéndolas en cultivo por 48 horas, y otra de adulto (BH10 pase 6) sembrando 1.000 células por pocillo y manteniéndolas 7 días en cultivo (ver Figura 68 A). La medida se realizó cuando las células se acercaban a confluencia, pero sin alcanzarla, tal y como se explica en la metodología.

Para poder tener en cuenta el efecto de la concentración de las células sembradas se realiza un ensayo añadido pero por triplicado, sembrando 100, 1.000 y 10.000 células C1.2 en su pase 7 y 48 horas en cultivo. Los pocillos donde sólo se sembraron 100 células presentaban una confluencia demasiado baja para poder tomar las imágenes. De las otras en cambio sí se tomaron y los resultados se exponen en la Figura 68 B.

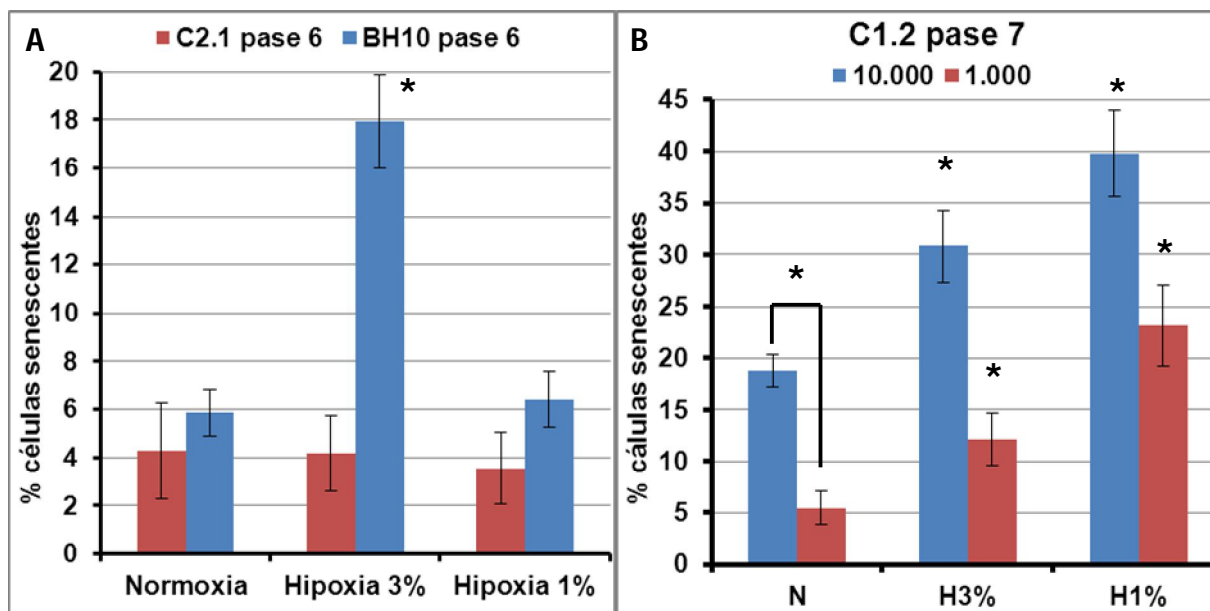


Figura 68: Porcentaje de células senescentes en la línea C2.1 en pase 6 (A, rojo), BH10 en pase 6 (A, azul) y C1.2 en pase 7 sembrando 10.000 células por pocillo (B, azul) o 1.000 células por pocillo (B, rojo).

Se puede observar que la hipoxia apenas tuvo efecto en cuanto a senescencia en el caso de la línea C2.1. Sí provocó un aumento significativo en el caso de la línea BH10 con un 3% de oxígeno, y ligeramente con un 1%. En cuanto a la línea C1.2 se distingue que la hipoxia resulta perjudicial para el nivel de senescencia, pues ésta aumenta de forma inversamente proporcional al oxígeno disponible. Asimismo los resultados indican que la senescencia aumenta con la confluencia. Todas estas diferencias resultaron significativas.

Se concluye por lo tanto que la senescencia o bien no se ve afectada apenas por la hipoxia, o bien ésta tiene un efecto perjudicial sobre las células y un mayor porcentaje de las mismas

### 8.4.3.5 Apoptosis

Se hicieron medidas citométricas sobre una línea de cordón (C2.1 pase 6) comparando normoxia frente a hipoxia al 3% y al 1%. Los resultados se muestran en la Tabla 15, no arrojan diferencias reseñables.

Tabla 15: Medida de apoptosis de la línea C2.1 en pase 6 entre normoxia, hipoxia 3% e hipoxia 1%.

C2.1	Normoxia	Hipoxia3%	Hipoxia1%
Necrosis	0.4%	0.6%	0.5%
Muertas	4.7%	3.8%	3.5%
Vivas	90.4%	90.1%	92%
Apoptosis	4.5%	5.4%	4%



#### 8.4.3.6 Ciclo Celular

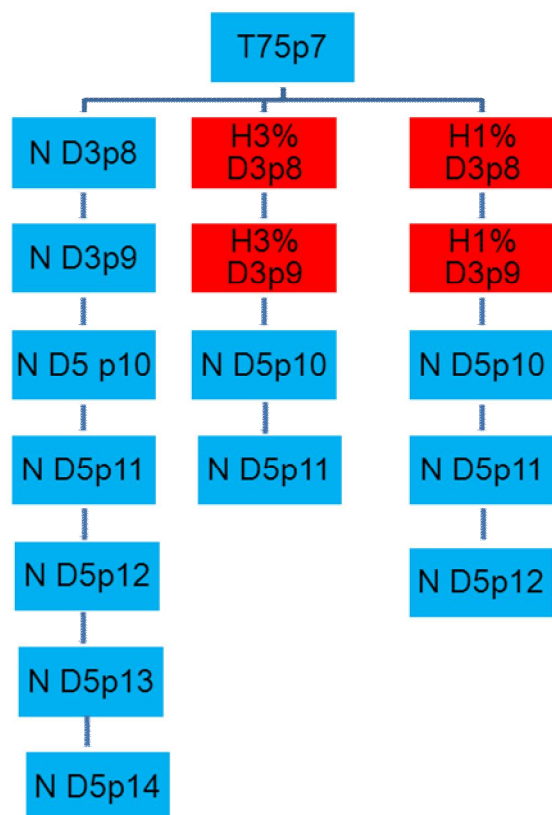
También se hizo una medida sobre la misma línea de cordón (C2.1 pase 6) comparando normoxia frente a hipoxia al 3% y al 1%. Los resultados se muestran en la Tabla 16. En este ensayo se observó un mayor porcentaje de células en fases de división (G2 y S) en la condición de normoxia respecto de las dos condiciones de hipoxia consideradas.

**Tabla 16: Porcentaje de células en diferentes fases del ciclo celular en normoxia, hipoxia al 3% y al 1% para la línea C2.1.**

C2.1	Normoxia	Hipoxia 3%	Hipoxia 1%
G1-G0	45.65%	53.57%	52.98%
G2-M	18.82%	16.94%	17.95%
S	35.53%	29.49%	29.06%
IP	0.544	0.464	0.470

#### 8.4.3.7 Cultivos en Clonogenia

Dado que las principales diferencias observadas entre las diferentes concentraciones de oxígeno parecen tener lugar en condiciones de crecimiento clonogénico, se decidió hacer ensayos de crecimiento sembrando cantidades muy bajas de células. A partir de una línea concreta de cordón (C2.1 en pase 7) se sembraron 100 células en placas de 9.6 cm<sup>2</sup> y se mantuvieron en cultivo en las 3 concentraciones de oxígeno ya habituales del 21, 3 y 1 por ciento. Se deja crecer las colonias y luego éstas de nuevo se pasan en pequeño número bajo las condiciones de oxígeno controladas. Posteriormente las células se pasan a placas de mayor superficie y se permite su crecimiento en normoxia sembrando ya en cada pase un mayor número de células. Tras varios pases se fue observando su comportamiento. El bajo número de células por pase hace que no se logran números fiables de células obtenidas para hacer una curva de proliferación, pero sí es de interés el número de pases que alcanzaron las células provenientes de los diferentes tratamientos originales (ver Figura 69).



Tras aislar estas líneas provenientes de colonias en las respectivas condiciones, para comprobar si se había logrado la selección de alguna de sus propiedades se probó a realizar un ensayo clonogénico en las condiciones en las que se obtuvieron (normoxia e hipoxia del 3 y 1%). El bajo número de colonias formadas (puede apreciarse en la Tabla 17) no permite un análisis comparativo de los tamaños de las colonias. No obstante sí es reseñable que para el caso de las células provenientes de hipoxia al 3% no se llegó a formar ninguna colonia que superara las 25 células, sólo agrupaciones menores.

**Figura 69:** Esquema de los pases de la expansión en condiciones clonogénicas de la línea C2.1. Se indica en rojo las condiciones hipóxicas de crecimiento y en azul las de normoxia.

**Tabla 17:** Características del ensayo clonogénico con las líneas aisladas a partir de la expansión clonogénica de la línea C2.1 a diferentes concentraciones de oxígeno.

Línea	Pase	Condición	>25	<=25	Media	Mediana	Máximo	Mínimo
C2.1	11	Normoxia	17	125	517.9412	305	2551	26
C2.1	11	Hipoxia 3%	0	107	0	0	0	0
C2.1	11	Hipoxia 1%	13	155	301.7692	361	540	40

Un ensayo similar se llevó a cabo sobre la línea C1.2 de los pases 6 a 11 en normoxia, hipoxia 3% e hipoxia 1% en condiciones clonogénicas. Esta vez manteniendo las condiciones de oxígeno y clonogenicidad en todos los pases que duró el cultivo (ver Figura 70). Se indica ahora en rojo aquellos casos donde el número de células obtenido fue tan bajo que no se pudo contar y simplemente se sembró todo para el siguiente pase.

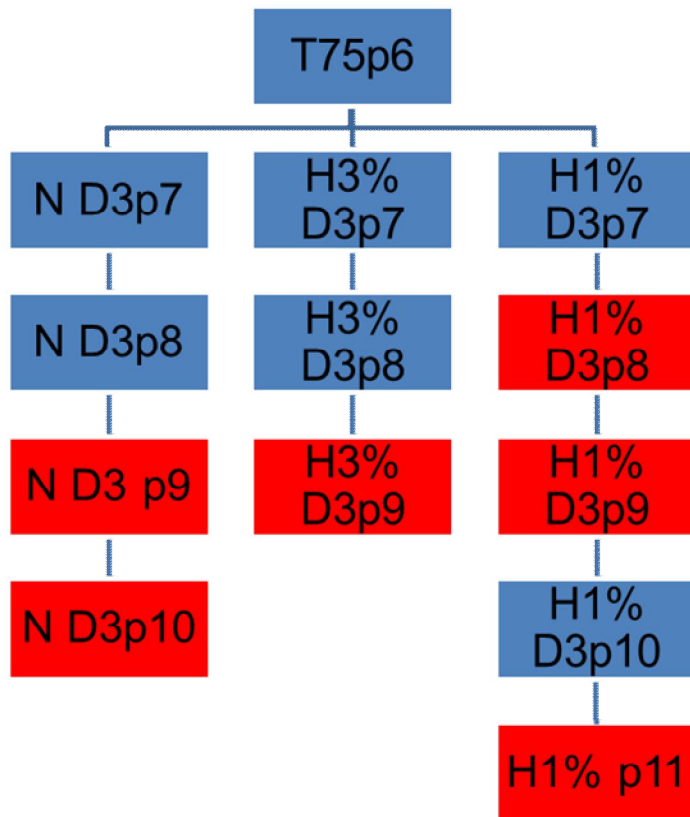


Figura 70: Esquema de los pases de la expansión en condiciones clonogénicas de la línea C1.2. Se indica en azul los pases donde fue posible una contabilización y siembra razonables, y en rojo aquellos casos donde el número de células fue tan bajo que un conteo exacto fue imposible.

De forma interesante el número de pases que duraran las células en cada una de las condiciones en ambos ensayos fue inversamente proporcional al tamaño de las colonias formadas. En la primera de las líneas usadas (C2.1) las colonias eran más grandes en hipoxia al 3%, seguido de hipoxia al 1% y por último normoxia al 21% (como se aprecia en la Figura 64), justamente el orden inverso a los pases que aguantaron (4, 5 y 7 pases cada uno) o el tamaño de las colonias que se formarían tras esos pases (como se muestra en la Figura 69 y Tabla 17 respectivamente). La línea del segundo ensayo (C1.2) formó colonias más grandes en hipoxia al 3%, seguido de normoxia al 21% y apenas creció en hipoxia al 1% (como se vio en el ensayo clonogénico que se muestra en la Figura 67 y siguiendo las características de la curva de crecimiento de la Figura 61) y creció 3, 4 y 5 pases en cada condición. Estos ensayos refuerzan la idea derivada de los ensayos de senescencia del agotamiento y envejecimiento acelerado que supone para las células la formación de colonias, a más rápida la formación de estas colonias (más grandes en menos tiempo) menos pases proliferan.

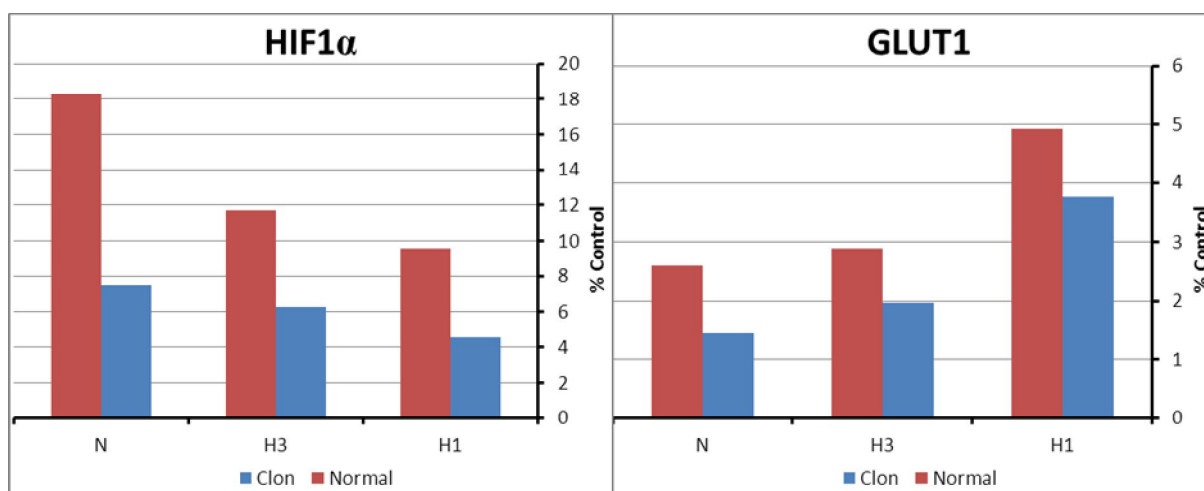
#### 8.4.3.8 Expresión genética

Por último también se realizaron medidas de expresión genética de algunos de los genes donde se observara un cambio de expresión con los compuestos químicos de emulación de hipoxia en los ensayos previos (descritos en el apartado 8.4.1.7 Expresión genética).

Tanto sobre una línea de adulto como una línea de cordón se sembraron sendas placas a concentración habitual o en condiciones clonogénicas. Se dejaron crecer hasta lo máximo posible y se obtuvo el material genético. Siguiendo el procedimiento descrito en la metodología se aisló el cDNA de ambas muestras. Este ensayo se realizó en condiciones de normoxia, hipoxia al 3% e hipoxia al 1%.

La obtención del cDNA en las muestras clonogénicas probó ser especialmente complicada, la cantidad de material genético fue menor y de una calidad inferior a otros ensayos realizados. Como se ha indicado en el apartado 7.6 Expresión génica de la metodología se hizo una prueba de integridad por electroforesis en agarosa comprobando las bandas de RNA ribosómico en todas las muestras. Donde las otras muestras mostraban claramente las bandas de RNA ribosómico, en las provenientes de cultivos en clonogenia estas bandas resultaban indistinguibles. El problema fue especialmente grave en el caso de la línea proveniente de sangre de cordón.

Como resultado hubo una variabilidad superior de las medidas, por lo que los valores mostrados deben tomarse con precaución. Para minimizar que esto afectara a la forma de visualizar los datos se ha optado por una representación como porcentaje de expresión de cada gen en cada condición respecto del promedio de los genes control en esa condición. Esta forma de mostrar los datos es algo menos intuitiva que el valor R (número de veces) normalizado empleado en los otros ensayos, pero al quitar un paso de normalización se evita que los errores de la medida que haya podido haber se extiendan a todas las muestras.



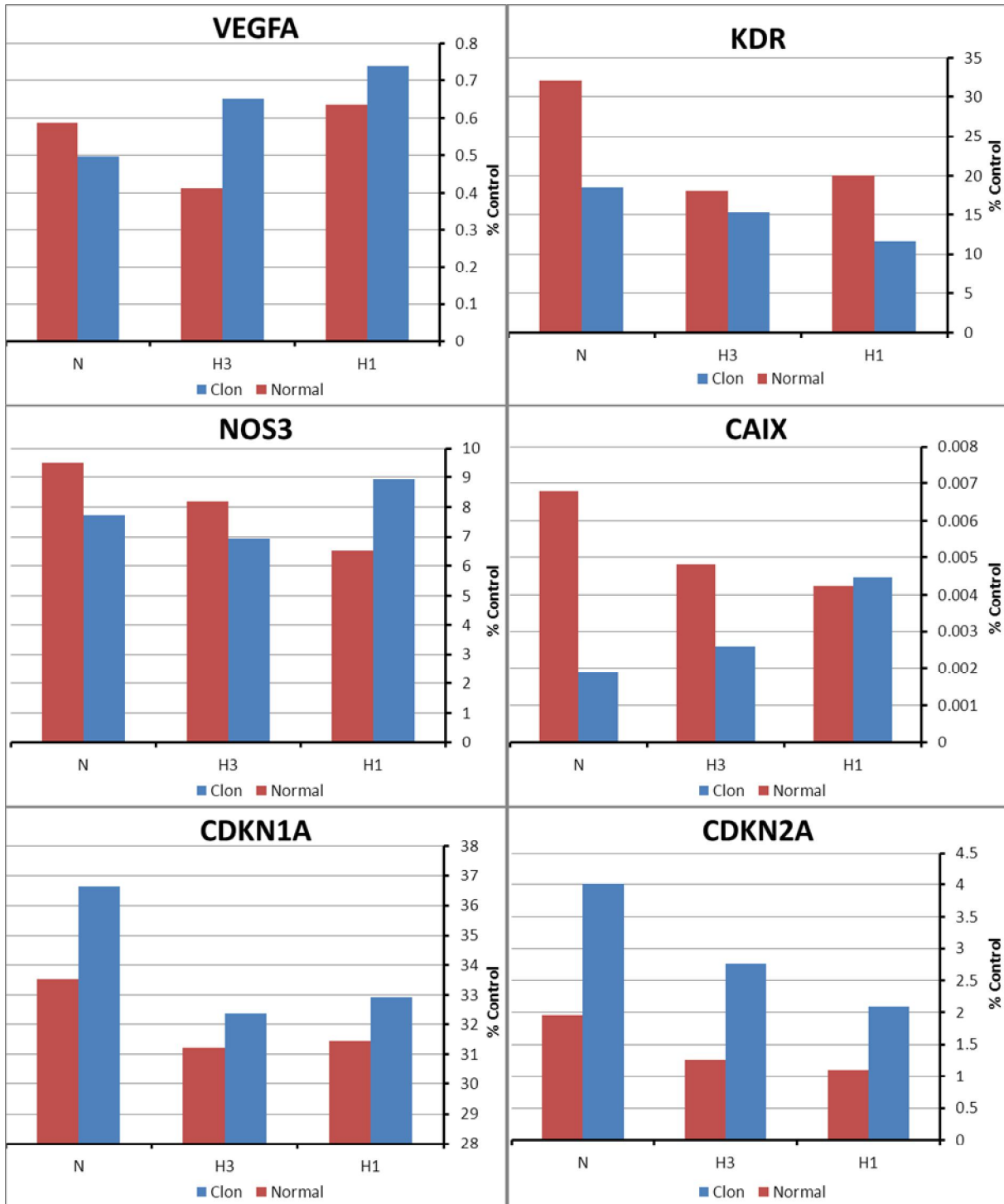
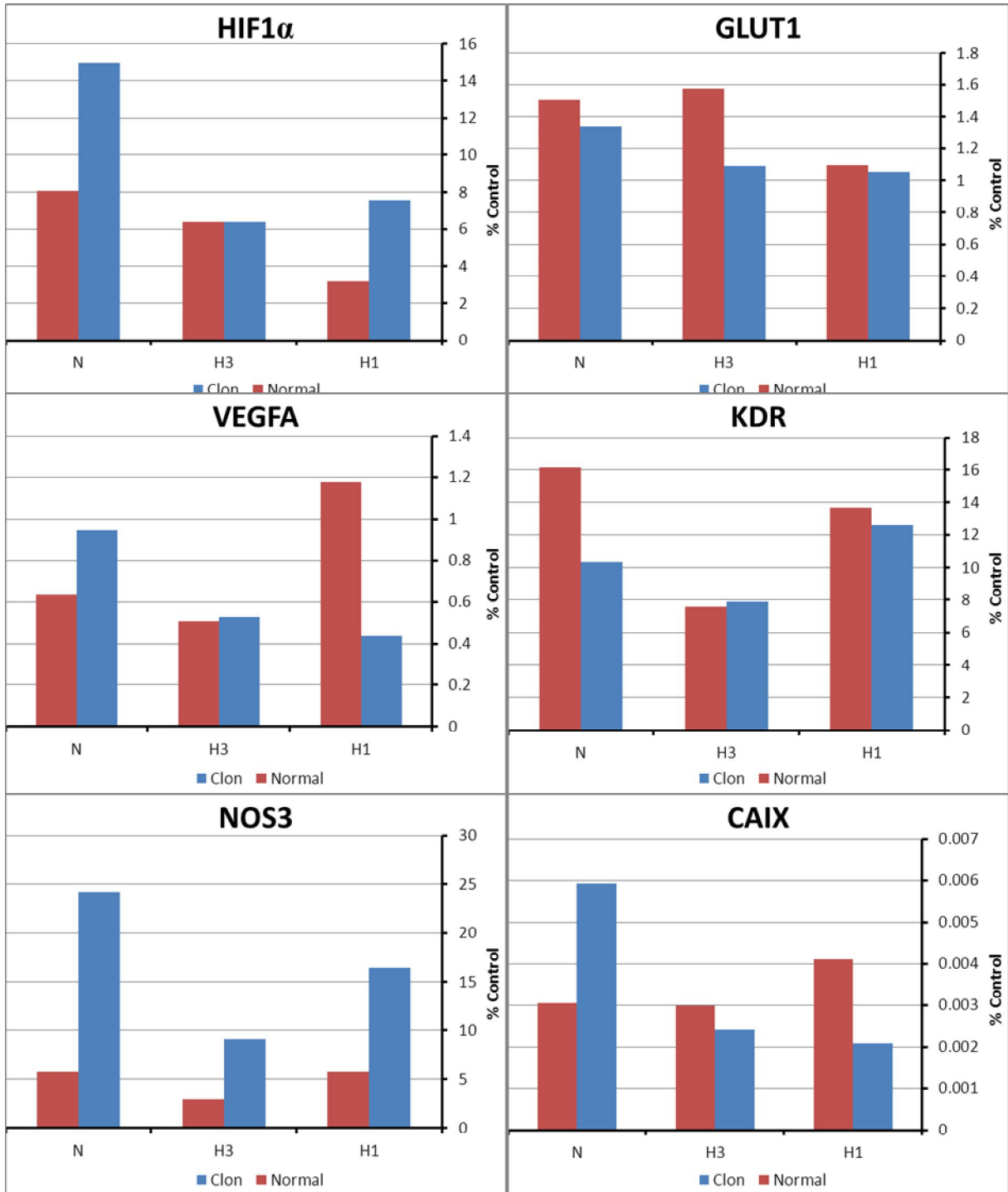


Figura 71: Expresión de varios genes de la línea BH10 en su pase 6 en condiciones de crecimiento clonogénico (en azul) o habituales (en rojo) en condiciones de normoxia, hipoxia al 3% o hipoxia al 1%.



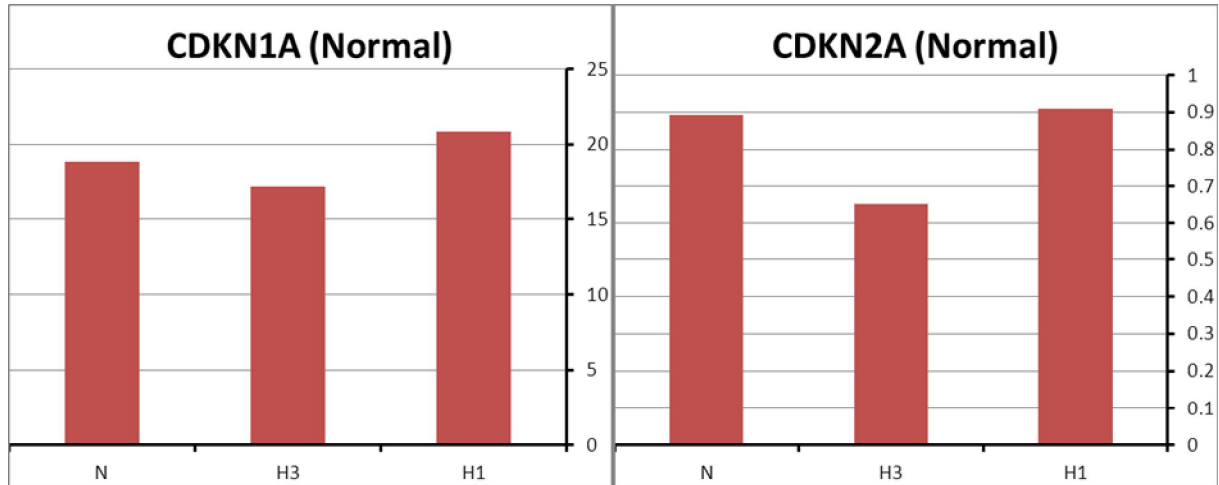
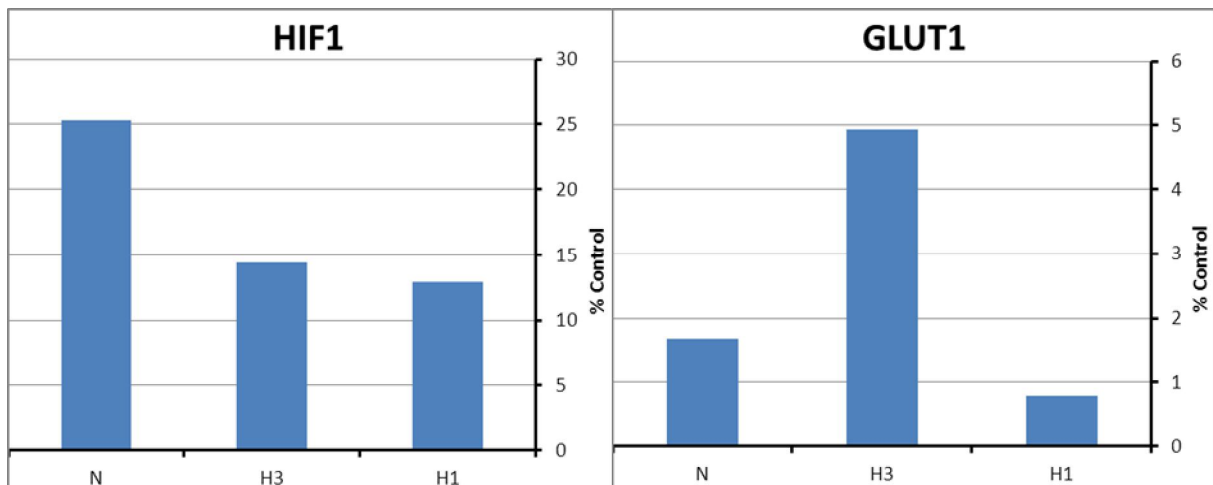


Figura 72: Expresión de varios genes de la línea C2.1 en su pase 6 en condiciones de crecimiento clonogénico (en azul) o habituales (en rojo) en condiciones de normoxia, hipoxia al 3% o hipoxia al 1%.

La medida de las ciclinas dependientes de quinasa 1 y 2 sólo se hicieron sobre las muestras obtenidas de cultivos a concentraciones normales dada la alta variabilidad de las obtenidas en condiciones clonogénicas.

La medida de expresión genética para la línea de cordón se repitió 3 pases más tarde en condiciones clonogénicas para algunos de los genes que parecían mostrar una mayor variación.

En líneas generales los resultados indican que en hipoxia se reduce la expresión de HIF1 $\alpha$  al aplicar hipoxia en todas las medidas, si bien la extensión del cambio varía según la línea y condición de cultivo testada. GLUT1 y VEGFA aumentan su expresión en hipoxia en la línea de adulto y una de las medidas de cordón. Lo cual va acompañado de una respuesta inversamente proporcional por parte de KDR.



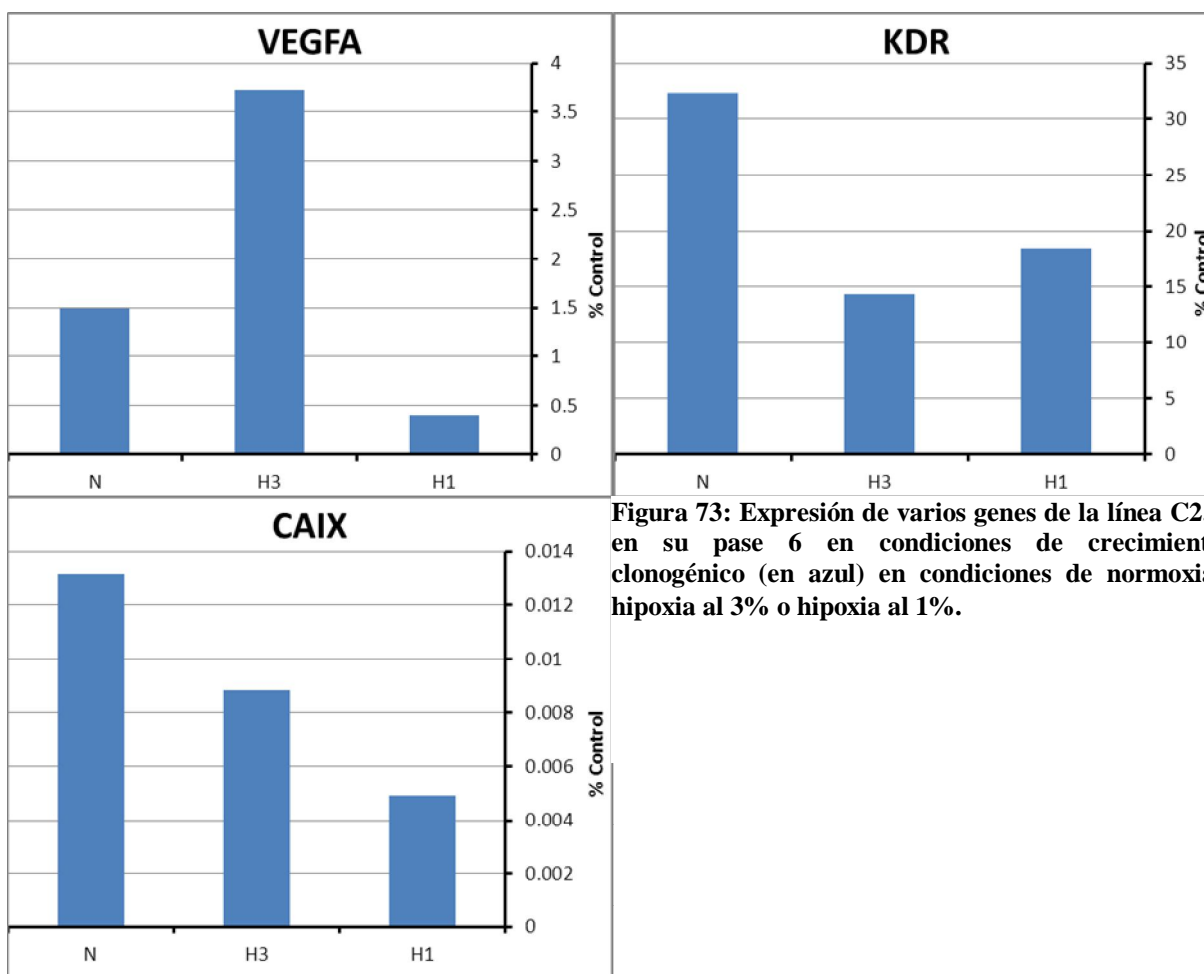


Figura 73: Expresión de varios genes de la línea C2.1 en su pase 6 en condiciones de crecimiento clonogénico (en azul) en condiciones de normoxia, hipoxia al 3% o hipoxia al 1%.

La respuesta del resto de genes es menos clara. NOS3 presenta poca variación en adulto, pero una reducción de la expresión en hipoxia en cordón, mucho más acusada en clonogenia que en cultivo habitual. CAIX parece mostrar tendencias contrarias frente a hipoxia según se trate de cultivo en clonogenia o habitual y según se trate de la línea de adulto o la de cordón. Por último CDKN1A y CDKN2A muestran una reducción en hipoxia en la línea de adulto, pero no se ven cambios en la línea de cordón.

#### 8.4.3.9 Análisis de la expresión de HIF

Desde un principio hemos supuesto que las diferencias observadas entre las condiciones vienen del efecto del factor inducible de hipoxia (1 ó 2). Por ello hemos realizado multitud de intentos con diversas combinaciones para detectar el nivel de esta proteína en los diferentes cultivos.

Como comprobación de la efectividad de la técnica empleada se realizó una medida control. En la medida, que se muestra en la Figura 74, se cargó un control positivo



comercial de extracto proteico de células HeLa expuestas a hipoxia así como extractos proteicos de la línea tumoral HepG2 expuesto a las condiciones control,  $\text{CoCl}_2$  200 nM, DMSO (0.4%) y DMOG 1 mM (disuelto en DMSO 0.4%).

Dado que la proteína HIF1 $\alpha$  aparece en el entorno de los 120 KDa se ve que el control comercial da una señal positiva intensa. Las muestras de HepG2, en cambio, dan señal a un peso molecular bastante más pesado (unos 170 KDa). A pesar de unas dudas iniciales de si se trataría de una señal inespecífica al comprobar en ensayos posteriores el resultado confirmamos que, efectivamente, se trata de HIF1 $\alpha$ . Se ve que la línea tumoral presenta una expresión basal de HIF1 $\alpha$ . Asimismo la detección de HIF2 $\alpha$  es clara en la línea tumoral a un peso molecular cercano a los 150 KDa, algo más ligero. Ambas proteínas se encuentran presentes en mayor cantidad en las condiciones con los inductores químicos de hipoxia que sus respectivos controles.

En cuanto a las células de interés, las ECFC, como ya se ha indicado se hicieron multitud de pruebas. De todas ellas se muestra en la Figura 75 el resultado más optimista. Sólo para la proteína HIF2 $\alpha$  se logró cierta señal clara a la altura esperada en el entorno de los 120 KDa. Ambas proteínas HIF1 $\alpha$  y HIF2 $\alpha$ , muy similares, deberían aparecer a ese peso molecular.

En el ejemplo que se muestra la banda para la actina presenta un tiempo de exposición mucho menor debido a que no hubo problemas para su detección. Surgieron problemas con bandas inespecíficas de gran intensidad a alturas muy pesadas (más de 250 KDa) y excesivamente ligeras (menos de 70 KDa). Y no se logró una señal consistente lo suficientemente clara como para hacer medidas cuantitativas.

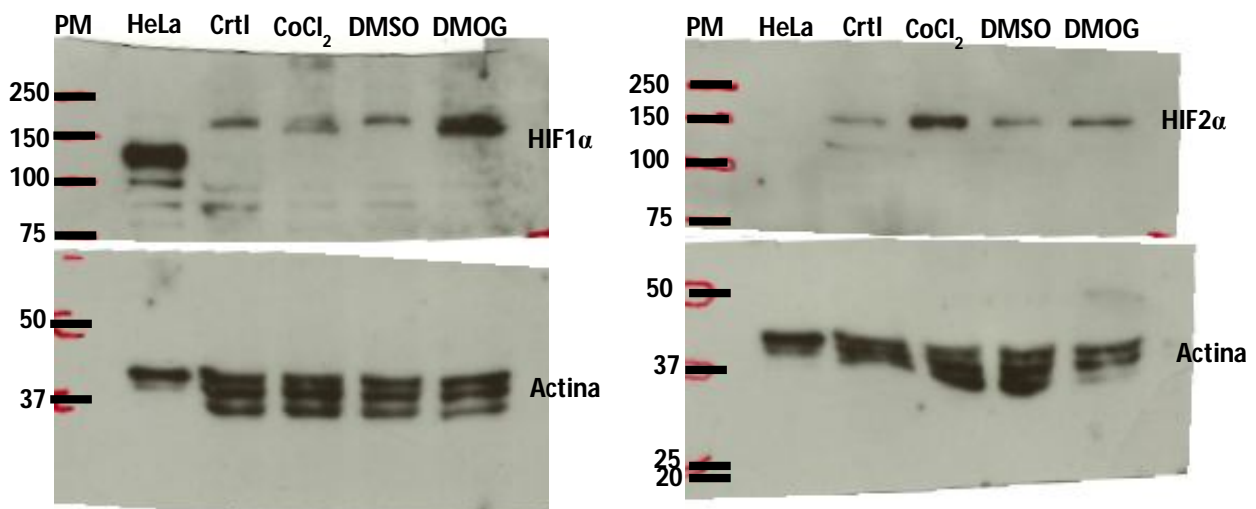


Figura 74: Western-Blot sobre células HepG2 como control positivo de la técnica para el análisis de HIF1 $\alpha$  y HIF2 $\alpha$ .

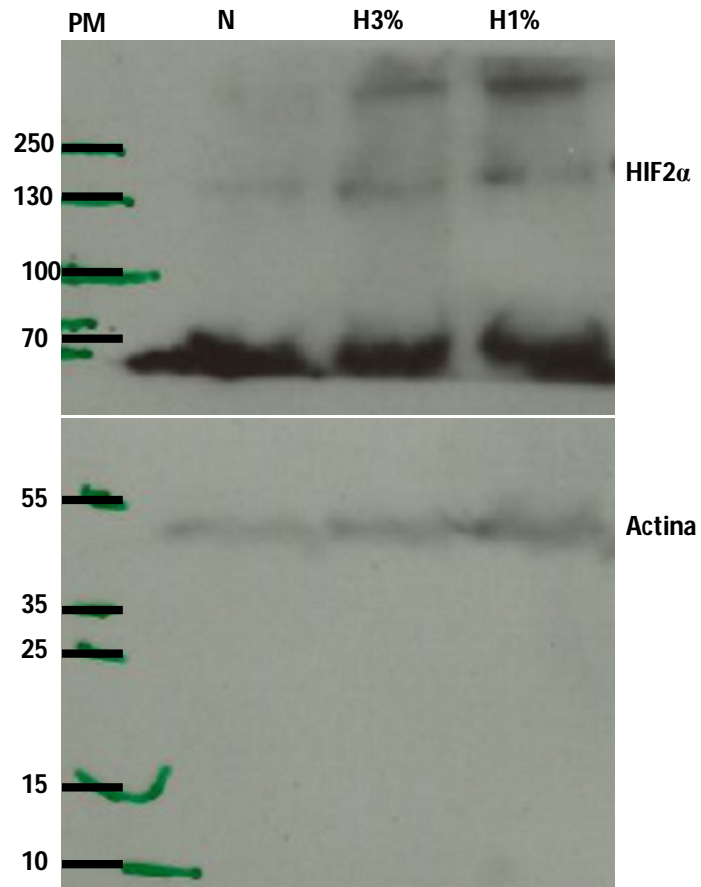


Figura 75: Western-Blot de la línea C2.1 en su pase 6 en normoxia e hipoxia al 3% y 1% para HIF2α.



## 9 Discusión

### 9.1 Obtención de las líneas celulares

Se ha llevado a cabo repetidamente el procedimiento de aislamiento de las líneas con muestras provenientes de diversos donantes. Se obtuvieron líneas homogéneas y de comportamiento similar en la mayoría de los casos, cumpliéndose en todos ellos los requisitos de proliferación elevada, morfología compacta y regular, captación de LDL-Ac y presencia de los marcadores de superficie CD31, CD34, CD146, VEGFR2 y CXCR4, ausencia de CD14 y CD45. Podemos por lo tanto asegurar que hemos tenido éxito en el aislamiento de las ECFC.

De 6 muestras de sangre de cordón umbilical surgieron 21 colonias que finalmente proporcionaron 11 líneas viables independientes y 3 líneas de colonias que recrecieron.

- Eso supone un promedio de 3.5 colonias por muestra y 1.833 líneas por muestra.
- Tuvimos éxito en el aislamiento en 5 de las 6 muestras eso supone una tasa de éxito del 83.333%, similar al 81.5% del trabajo de Corselli (Corselli, 2008).
- Al trabajar con muestras de aproximadamente 40-50mL de sangre estamos hablando de alrededor de 0.08 colonias por mililitro de sangre (en el rango que indican Tasev et al. (Tasev et al., 2015)).
- Atendiendo a las MNC sembradas ( $1.35 \times 10^9$  en total) eso significa 0.016 colonias ECFC obtenidas por millón de MNC frente a las 0.017 colonias por millón de MNC indicado por Yoder et al. (Yoder et al., 2007).
- Si bien sólo se hizo un intento, no se lograron obtener colonias ECFC a partir de MNC aisladas de sangre almacenadas un tiempo prolongado en nitrógeno líquido. Se ha indicado que el rendimiento baja, aunque no es imposible (DiMaio et al., 2016). Sin más pruebas no estamos en posición de confirmarlo ni desmentirlo.
- No fue posible encontrar las colonias cuando se probó a trabajar sobre placas de 24 pocillos, fue necesario un pase a superficies algo más extensas.

Es decir, el éxito es muy similar al descrito en la bibliografía siguiendo procedimientos de aislamiento parecidos. El éxito en las muestras de sangre de cordón parece a priori menor que en las muestras de adulto (83% frente a 95%), pero no debe olvidarse que estas

últimas provenían de un número muy superior de MNC, las restantes de una bolsa de donación con 450 mL de sangre frente a los 40 mL de las muestras de cordón. Con estos ratios y considerando que las diferentes pruebas de comprobación resultaron positivas podemos decir que se ha logrado un protocolo exitoso de aislamiento de las ECFC en este laboratorio.

Un detalle de interés que hemos observado pero que no estaba descrito en la bibliografía es la importancia de la extensión de la superficie sobre la que se siembran las células. A pesar de que la concentración de las MNC por  $\text{cm}^2$  era el mismo, tuvimos problemas cuando se trabajó en placas de 24 pocillos, donde hubo que pasar las células a una superficie mayor. Esto se debió a que existe un primer momento de formación de múltiples colonias y células adheridas por la superficie de la placa que van desapareciendo con los sucesivos lavados. Si la superficie es pequeña, estas células no deseadas impiden un crecimiento apropiado de las ECFC que han de aparecer más adelante. Por lo tanto una de las conclusiones es que el aislamiento debe realizarse sobre superficies de, al menos,  $9.6 \text{ cm}^2$  cuando la concentración de la siembra ronda las  $3 \times 10^6$  MNC por  $\text{cm}^2$ .

Tras observar el crecimiento de varias líneas diferentes (ver Figura 21) se obtiene que, como suele ocurrir con células primarias, existe una enorme variabilidad entre las líneas, por lo que las comparaciones entre ellas deben tomarse con precaución. Todas las líneas testadas tienden a la forma de crecimiento habitual en cultivo celular, con una corta fase de adaptación durante el aislamiento de la línea, seguido de una fase de crecimiento exponencial más acelerado que progresivamente se ralentiza hasta parar por completo. Por lo tanto, en nuestro laboratorio, ninguna de las ECFC obtenidas tenía características inmortales alcanzando un máximo de 19 pases (línea C1.4) y 28.74 duplicaciones (línea C2.1). Son cifras extraordinariamente altas para líneas primarias, máxime si tenemos en cuenta que el número de duplicaciones no tiene en cuenta los primeros momentos de establecimiento de la línea de forma clonal a partir de una única célula, lo que suele requerir un gran número de duplicaciones. En conjunto es muy probable que se alcanzaran cifras de más de 40-45 duplicaciones. Si bien se encuentran lejos de las 100 duplicaciones que se han llegado a describir en casos puntuales (Ingram, 2004).

Durante el cultivo in vitro se alcanzaron concentraciones en el entorno de  $3 \times 10^4$ - $4 \times 10^4$  células/ $\text{cm}^2$ . En pases posteriores esta densidad fue bajando conforme las células entraban en senescencia y aumentaban de tamaño. Esta concentración no es tan elevada como la

que se puede encontrar en la vasculatura *in vivo* que ronda las  $8.33 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup> (Sender et al., 2016).

No fue un ensayo buscado, pero las líneas aisladas se mantuvieron en crecimiento en condiciones normales en varios momentos (ver Figura 21). Se llegó a dar el caso de una línea que se guarda congelada un tiempo para luego continuar trabajando con ella meses después. Puede verse como, en mayor o menor medida según la línea, el pase descongelado tiene un comportamiento muy similar al que tuvieron las células de esa misma línea que se mantuvieron en cultivo en vez de congelarse. Es decir, con una metodología apropiada se pueden conservar criogénicamente las células ECFC sin apenas pérdida en su capacidad proliferativa respecto de la misma línea no congelada.

Sí se buscó comprobar cuántos pases eran capaces de alcanzar las células de las diferentes líneas, así como la rapidez con que crecían. Cuando se hace la comparación entre el origen de las células (ver Figura 20) no se ve una diferencia consistente en todas las líneas pero sí una importante tendencia por parte de las líneas de cordón de alcanzar pases más tardíos y de crecer más deprisa en la fase inicial de la curva de crecimiento.

Debe indicarse que a pesar de que el número de pases promedio alcanzado en total no difiera mucho entre el origen de las líneas, sí lo hace el número de duplicaciones alcanzadas. Esto ocurre porque conforme se avanza en el número de pases las células envejecen y aumenta el número de senescentes, cambiando su morfología; perdiendo regularidad (Carlson et al., 1988), las uniones entre ellas se vuelven menos estrechas (Krouwer et al., 2012) y las células alcanzan tamaños mayores en general (Johnson and Longenecker, 1982). Dado que el tamaño de la placa es invariable y que las células sólo crecen en monocapa esto obliga a realizar el pase transcurrido un número menor de duplicaciones, por lo tanto las duplicaciones alcanzadas para cada pase se van reduciendo. Si a esto le sumamos que las células de cordón no sólo alcanzaban más duplicaciones por pase sino que son de partida de un tamaño menor se tiene que para un mismo número de pases generalmente las células de cordón alcanzan bastantes más duplicaciones.

En la quinta muestra de sangre de cordón testamos la obtención de líneas en condiciones de normoxia (C5.1) o de hipoxia 5% (C5.2). De los ensayos posteriores realizados, proliferación (Figura 21) y clonogenia (Figura 57 y Figura 59), vemos que ambas se comportaron de forma muy similar. Sí es cierto que la línea de normoxia (C5.1) parece que creció ligeramente más mientras que formó colonias ligeramente más pequeñas que la

línea obtenida en hipoxia 5% (C5.2). Pero estas diferencias no alcanzan valores lo suficientemente grandes como para no poder ser debidas a la variabilidad entre líneas. Por lo tanto, sin más ensayos específicos al respecto, parece deducirse que el comportamiento de la línea ECFC aislada no difiere significativamente si se obtiene en condiciones de normoxia o de hipoxia 5%. Sería interesante, a futuro, estudiar si al cultivar las células en una u otra concentración de oxígeno se mantienen parcialmente las diferencias observadas, que se discuten más adelante.

Por último mencionar que una de las líneas derivadas de la primera muestra de sangre de cordón (C1.4), acabaron dando un cariotipo anómalo en las pruebas de ciclo celular. Con doble cantidad normal de DNA, aparecieron células tetraploides (ver Tabla 11). Células que, además, crecieron especialmente rápido y resultando en un alto número de pases (mostrado en la Figura 21), si bien al proceder de cordón no tiene por qué ser un efecto derivado de la mutación. En total se hicieron medidas de ciclo celular sobre 4 líneas diferentes (C1.4, BH20, C2.1 y otra que no se empleó en este estudio), de todas ellas sólo 1 mostró esta anomalía cromosómica. No podemos asegurar que exista un riesgo especialmente alto de que este fenómeno se produzca al haber visto un solo caso, pero tampoco hemos buscado específicamente mutaciones genéticas de otra índole. Corselli (Corselli, 2008) estudió este asunto en mayor extensión encontrando que ganancia o pérdida de cromosomas ocurrió en algunas de las células de 5 de 7 líneas que analiza en su trabajo publicado. En cualquier caso, si las células así aisladas acaban siendo empleadas como base de un tratamiento celular en biomedicina, es un factor más que deberá ser controlado para evitar problemas de tipo tumoral.

## **9.2 Modelo individualizado de angiogénesis**

En conjunto se puede decir que se ha logrado obtener esferoides a partir de las ECFC mediante la técnica de la gota colgante. Dichos esferoides, además, pueden crearse de tamaños variables según la necesidad y empleando una cantidad de medio muy pequeña. Del mismo modo se ha logrado adaptar a nuestro laboratorio las condiciones en las que realizar el ensayo de angiogénesis a partir de dichos esferoides.

Es interesante observar cómo la formación de las extensiones de tipo angiogénico adquieren una estructura estrecha y alargada, mientras que en presencia del fármaco

inhibidor de la angiogénesis Bevacizumab la extensión de las células desde el esferoide adquiere la forma de un frente continuo (como se ve en la Figura 25).

Cabe preguntarse si el núcleo del esferoide sigue siendo viable o por el contrario las células que lo rodean le impiden adquirir los nutrientes necesarios del medio. Intentos por parte del grupo para discernir este punto han resultado infructuosos debido a que los fluoróforos para determinar viabilidad no impregnan hasta el interior del esferoide y no dan señal, motivo por el que esos datos no se muestran. Las pruebas de resiembra de los esferoides para comprobar la viabilidad de los mismos, mostrados en la Figura 24, parecen indicar que el núcleo del esferoide no llega a derivar en células de la colonia, lo cual hace sospechar que, efectivamente, el núcleo del esferoide no es realmente viable. De ser así, en principio cabe pensar que resultaría de mayor interés emplear esferoides reducidos en tamaño para evitar que las señales de muerte celular de su interior pudiesen afectar a los resultados observados. No obstante se considera en general que el modelo tridimensional imita mejor el comportamiento celular in vivo (Pampaloni et al., 2007), por lo que es una consideración secundaria.

De los diferentes intentos realizados hubo que desechar algunos debido a que la localización del esferoide termina en un borde del pocillo, donde las extensiones están direccionadas y no resultan representativas. Es por ello que se ha testado también el otro punto de esta línea de investigación, la introducción de nanopartículas ferromagnéticas.

Las nanopartículas, como era de esperar, inducen la muerte a parte de las células en cultivo, pero no detienen por completo su crecimiento en las concentraciones testadas. Se ha comprobado que son internalizadas por las células y que éstas conservan la capacidad de formar esferoides. Esto presenta un gran interés debido a las propiedades magnéticas que dichos esferoides pasan a adquirir.

Para el objetivo final que se deseaba, colocar de forma controlada el esferoide en una zona concreta para facilitar ensayos posteriores, ha sido posible incluso emplear esferoides con sólo parte de las células que los componen con nanopartículas. Es de suponer que de esta forma las células sin nanopartículas en su interior puedan mostrar un comportamiento menos afectado al tiempo que el esferoide en su conjunto mantiene propiedades magnéticas. El empleo de esferoides con dos tipos de células, incluso de diferentes tejidos, es un aspecto que se está desarrollando recientemente (Shah and Kang, 2018).



El próximo paso lógico en esta línea de desarrollo es la combinación de los dos principios perfeccionados. Para lo cual se hace necesario comprobar que los esferoides con parte de sus células portando nanopartículas siguen mostrando diferencias cuantificables como modelo de angiogénesis tridimensional. Una vez se compruebe este extremo se podrá testar la viabilidad del procedimiento con células ECFC derivadas de pacientes.

Las posibilidades que se abren son amplias, siendo la principal ventaja la facilidad de obtención de las ECFC al encontrarse éstas circulando en sangre del propio paciente, su obtención no requiere de procedimientos invasivos. El principal obstáculo sería el tiempo que cuesta aislar y expandir en el laboratorio las ECFC. Inevitablemente, a día de hoy esto limita su uso a pacientes con patologías de largo recorrido y no casos de urgencia. No obstante sigue siendo posible la búsqueda personalizada de fármacos concretos para muchas de las patologías con participación de estas células, especialmente aterosclerosis o cáncer, ambas enfermedades de evolución lenta.

Para los casos de aterosclerosis lo ideal sería buscar aquellos fármacos que, para un paciente concreto, mejoren las funciones de sus ECFC. En cambio para el cáncer la idea sería la contraria, detener el crecimiento tumoral, pudiéndose testar en el laboratorio los fármacos antiangiogénicos idóneos y así perfeccionar el cóctel quimioterápico. A fecha de hoy, hasta donde sabemos, los ensayos de angiogénesis tridimensional con ECFC se realizan sólo en el ámbito de la investigación básica (Sturtzel et al., 2018).

### **9.3 Modificación génica de las ECFC**

Se ha logrado en nuestro laboratorio la modificación génica de las ECFC mediante el uso de vectores lentivirales, un procedimiento relativamente sencillo y rápido. Las posibilidades que se abren para un uso terapéutico de ECFC modificadas *in vitro* es obvio, modificaciones de esta índole se han planteado como una posibilidad muy interesante para superar las limitaciones que en terapia tendrían las ECFC afectadas de pacientes donde la función de estas células se encuentra reducida (Ye, 2015).

Actualmente hay publicado un ensayo en ratones donde se trata un modelo de isquemia con ECFC transducidas con el gen de la integrina  $\beta 1$ , con mejoras respecto de las células control (Goto et al., 2016). Como ya se ha comentado, la adhesión de las ECFC a la zona dañada es uno de los puntos críticos que limitan su función. En este caso, en lugar de

aumentar la expresión de proteínas de adhesión, la aproximación que hemos abordado ha sido la de mejorar la emisión de factores proangiogénicos, una de las funciones que se está viendo tiene gran importancia en la función de estas células (Suh et al., 2005).

Las comprobaciones respecto a la eficacia de la técnica sobre las líneas transducidas con el gen GFP, mostradas en la Figura 27, indican que no hay problemas en la aplicación de la técnica sobre ECFC. Cabe suponer que un éxito similar habrá tenido lugar también con las otras modificaciones siguiendo el mismo procedimiento.

Se han escogido 3 genes candidatos por su participación en procesos de angiogénesis; AM, PPAM y FGF2 comparados frente a un control. A partir de las diferentes medidas realizadas podemos sacar las siguientes observaciones generales:

Hay un ligero efecto perjudicial en las curvas de proliferación en pases sucesivos de las líneas transducidas con los genes PPAM y FGF2 en las células de cordón, que se hace más evidente en las células de adulto (ver Figura 28). Efecto que no se observa en el estudio de proliferación a tiempo corto que se hiciera sobre un pase temprano (ver Figura 29).

En esos pases tempranos muestran diferencias significativas en los niveles de senescencia (ver Figura 30), pero éstas no son consistentes entre las líneas de adulto y cordón, por lo que no podemos extraer conclusiones a ese respecto. Sí es de interés que a pases más tardíos parece haber un aumento importante de la senescencia en las líneas PPAM y FGF2 en las células de cordón (ver Figura 31). Este hecho coincide con la observación de que estas líneas decaen antes que las líneas control o AM.

Una diferencia que no se traduce en una tendencia similar en cuanto a la capacidad clonogénica. Lo único que se observa es una ligera tendencia por parte de la línea AM de cordón a formar colonias más grandes en el pase 8, mientras que en el pase 9 es la línea FGF2. De las células de adulto parece ser que es la línea PPAM la que forma colonias algo más grandes que el resto (ver Figura 32). Es decir, sin una tendencia consistente.

Los estudios de expresión génica (ver Figura 34) confirman un importante aumento de la expresión del gen FGF2, tanto en adulto como en cordón. No se observa aumento similar para el gen AM en las líneas transducidas con el gen AM o PPAM, debido a que los cebadores empleados son los apropiados para la detección de la secuencia de la proteína interna de las ECFC, diferente de la de los constructos introducidos. Por lo tanto, a nivel de expresión génica, sólo podemos confirmar que la transducción ha sido exitosa en el

caso de la línea FGF2. No obstante, las importantes diferencias entre la línea control y las líneas transducidas con los genes AM y PPAM así como el éxito contrastado de la técnica para los genes GFP y FGF2 permiten suponer que también se ha producido.

De las pruebas de angiogénesis no es posible sacar un efecto compartido entre los diferentes ensayos con medios condicionados de las diferentes células transducidas. Sólo en el caso de células de la línea de cordón C2.1.1 con medio condicionado de las líneas de cordón C2.1 transducidas se observa un aumento significativo de la complejidad de las estructuras formadas.

Cuando son las propias células transducidas las testadas en la formación de estructuras sobre matriz de la membrana basal se observan valores significativamente más bajos respecto al control en la condición PPAM de la línea de adulto y FGF2 en la línea de cordón. Si tenemos en cuenta que esta prueba se hizo varios pases tras la transducción se entiende que este es un efecto a largo plazo.

En general podemos decir que las líneas FGF2 y PPAM de células de adulto son las que ofrecen mayores diferencias entre los ensayos realizados con respecto a la línea control. Indican un aumento de la expresión de genes relacionados con la angiogénesis y de la capacidad clonogénica. Sin embargo también van asociados a una disminución en el número de pases útiles, un aumento en la senescencia y una reducción de la complejidad de las estructuras formadas sobre Cultrex. Todo ello hace sospechar que la sobreexpresión inducida aumenta la utilidad inmediata de las ECFC, pero a un mismo tiempo reduce su vida útil. A pesar de esta pérdida de la viabilidad podrían tener una aplicación interesante en medicina regenerativa dado que los riesgos asociados a una proliferación excesiva son los más directos y peligrosos que caben esperar de modificaciones de esta índole. Sería de gran interés poder disponer de emisores de factores que favorezcan la regeneración vascular que, de forma natural, se dirijan a zonas dañadas donde cumpliesen su función para luego simplemente desaparecer.

## **9.4 Respuesta a inductores químicos de Hipoxia**

Todas las medidas realizadas con los inductores químicos de hipoxia sobre la viabilidad celular muestran los mismos resultados, que son perjudiciales para las ECFC de forma dependiente a la concentración.

Cuanto mayor es la concentración testada se reduce la proliferación (como se muestra desde la Figura 40 a la Figura 39), aumenta la senescencia (Figura 43), aumenta la apoptosis (Tabla 6 y Figura 44), se reduce el índice de proliferación (Tabla 7) y parece reducirse la capacidad angiogénica (Figura 45). En general con un efecto más acusado en la línea de cordón testada que la de adulto.

Esto entra dentro de lo esperable, como se ha descrito en 5.4.4 Inductores Químicos de Hipoxia, estos compuestos presentan una serie de efectos sobre el metabolismo que en general afectan negativamente a las células en cultivo. Con el presente trabajo se demuestra que las ECFC no son una excepción. Es interesante reseñar que el DMOG presentó con respecto a su control el efecto menos perjudicial en comparación con los otros compuestos testados,  $\text{CoCl}_2$  y DFO.

La causa de este efecto menos pernicioso para el DMOG la encontramos en su mecanismo de actuación. Los tres compuestos estabilizan HIF porque inhiben las PHD que inician su degradación, pero lo hacen de formas diferentes. El DMOG, cuando es internalizado por la célula pasa a N-oxalilglicina, el cual es un análogo del 2-oxoglutarato, cofactor necesario para las PHD implicadas, con el cual compite por el sitio activo de la enzima inhibiendo su efecto (Siddiq et al., 2009).  $\text{CoCl}_2$ , por su parte, disocia en solución, y el ión  $\text{Co}^{2+}$  tiene gran similitud con el  $\text{Fe}^{2+}$ , sustituyéndolo en varias enzimas que lo emplean en su centro catalítico. Como a diferencia del  $\text{Fe}^{3+}$  el  $\text{Co}^{3+}$  no es estable, uno de los pasos del proceso catalítico queda bloqueado inhibiéndose la enzima. Por último DFO es un compuesto quelante de  $\text{Fe}^{2+}$  con una cierta especificidad, en la práctica negando a las enzimas el hierro que requieren para su centro catalítico con un efecto final similar al  $\text{CoCl}_2$ .

Como el DMOG afecta a las enzimas que requieren de 2-oxoglutarato, no sólo las PHD, adolece de efectos secundarios, pero como los otros dos compuestos afectan a todas las que incluyen hierro presentan aún más.

Esto permitió emplear una mayor concentración de DMOG en las pruebas de expresión realizadas para comprobar el efecto sobre los genes relacionados con la hipoxia que  $\text{CoCl}_2$  o DFO. El objetivo final es, a fin de cuentas, la caracterización de las ECFC en diferentes situaciones de hipoxia, o que la simulan.

La concentración obtenida para el IC50, contando como mitad de la proliferación medida, sobre las ECFC con  $\text{CoCl}_2$ , fue de 230-300  $\mu\text{M}$ . Este valor es sorprendentemente cercano

al que se ha indicado como necesario para matar la mitad de células de osteosarcoma MG63 en cultivo, de 300  $\mu\text{M}$  (Zhang et al., 2013), o de cáncer de próstata PC-3, de 210  $\mu\text{M}$ , (Mahey et al., 2016). En estos artículos se indica que ciertas líneas tumorales son sensibles al  $\text{CoCl}_2$  que el tejido sano. Lo mismo parece ocurrir con las concentraciones obtenidas para el DMOG, donde obtuvimos valores de 470-500  $\mu\text{M}$ , y la línea de cáncer de pulmón nci-h2228 cuyo IC50 es de 42.8  $\mu\text{M}$  (de acuerdo a las referencias de la casa comercial Selleckchem). El DFO, para el que hemos obtenido valores de 35-50  $\mu\text{M}$ , tiene un IC50 con HepG2 de 210  $\mu\text{M}$  (Kicic et al., 2002).

De las medidas de expresión génica en presencia de estos compuestos (Figura 47, Figura 48, Figura 49, Figura 50) se puede concluir las siguientes observaciones:

Como era de esperar, hay una disminución de la expresión de HIF1 $\alpha$ , factor de transcripción que se está estabilizando. Si bien el principal mecanismo de regulación del HIF1 $\alpha$  transcurre a nivel de estabilidad de la proteína (Ke and Costa, 2006), no es el único. Éste es un claro ejemplo del mecanismo a nivel de transcripción en la regulación de este factor (Horak et al., 2010) inducido por la estabilización y acumulación de su forma activa.

Esto se acompaña de un aumento importante y continuado de GLUT1. Era lo esperable dado que este gen regula que la célula sea capaz de adecuar su mecanismo de obtención de energía hacia la fermentación en lugar de la respiración. Adaptación que requiere de una captación aumentada de glucosa.

El gen AM, con un importante papel proangiogénico, aumenta rápidamente, sobre todo al emplear DMOG. Es el efecto que se esperaba con la inducción producida, al ser la AM uno de los genes que promueve HIF1 $\alpha$  en células endoteliales (Nakayama et al., 1999).

El CAIX, está descrito como gen de respuesta a hipoxia, pero más como regulador del pH tras inducción de la ruta de la glucólisis cuando la respiración está inhibida (Wykoff et al., 2000), lo que lo ha relacionado con el desarrollo tumoral. Esto explicaría en cierta medida los resultados poco constantes que se han obtenido, con aumentos puntuales en algunas de las medidas con DMOG seguido de una reducción a largo plazo que, en general, parece ser común a los otros inductores también. Como se explica más adelante, DMOG induciría un aumento de la glucólisis en mayor extensión que el  $\text{CoCl}_2$  o el DFO, forzando un cambio de pH puntual en el medio que requiere de una respuesta apropiada, entendiéndose que la inducción de HIF1 $\alpha$  por sí misma no afecta al pH.

Es de interés que tras el esperado aumento de VEGFA, importante inductor de angiogénesis, éste se correlaciona con una reducción en la expresión de su receptor, KDR. De las diferentes medidas vemos que cuanto mayor es la expresión de VEGFA menor señal proporciona KDR. Dado que se ha establecido la ausencia de promotores de inhibición activadas directamente por HIF1 $\alpha$  (Ortiz-Barahona et al., 2010), es de suponer que la disminución de KDR no sea un resultado directo de la estabilización de HIF1 $\alpha$ . Por contra su estrecha relación inversa con los niveles medidos de VEGFA dan a entender que es la presencia del factor proangiogénica la que regula mediante un ciclo de retroalimentación negativa la expresión de KDR para evitar una señal proangiogénica excesiva.

La respuesta a FGF2 y NOS3, ambos inductores de la angiogénesis en cierto grado reducen su expresión en lugar de aumentar como hiciera el VEGFA, lo que en un principio habíamos esperado. Con FGF2, además, se había descrito este aumento en el cultivo de otras líneas similares a células endoteliales (Luo et al., 2011), si bien su relación para con HIF1 $\alpha$  es compleja porque participa tanto en ciclos de retroalimentación positiva como negativa (Conte et al., 2008). NOS3, en cambio, se ha correlacionado con una reducción de su expresión en hipoxia (Fish et al., 2010), proceso en el que parece jugar un papel importante miR-200b (Janaszak-Jasiecka et al., 2018), en modelos de células HUVEC. Más interesante aún es el hecho de que, a diferencia de otros de los genes medidos que aumentan su expresión (VEGFA, GLUT1 o AM), apenas hay diferencias entre los compuestos testados en esta reducción, es decir, que no se observa el mayor efecto del DMOG. Esta ausencia de diferencias entre los compuestos, de nuevo, apunta a que la reducción en la expresión génica de FGF2 y NOS3 son debidos a procesos secundarios cuya activación es prácticamente independiente de la extensión del aumento inicial en la concentración del activador (HIF1 $\alpha$  en este caso). Una reducción que es aún menos rápida que en el caso de KDR, lo que daría idea de que este es un proceso aún más indirecto, no un mecanismo inducido realmente por la mera presencia de VEGFA, sino un efecto derivado de los procesos que provoca. Atendiendo a las rutas metabólicas participantes (ver Figura 76) una posible explicación del efecto negativo sobre NOS3 podría ser el siguiente: La alta y rápida sobreexpresión de VEGFA tiene como efecto la activación de la ruta PI3K (fosfatidil inositol 3 quinasa), la cual activa eNOS (proteína traducida del gen NOS3) y es una de las rutas principales activadas por FGF2 y otros factores de crecimiento. Dado que el resultado final de ambos genes es activado por este

gen de rápida sobreexpresión puede producirse un efecto de retroalimentación negativa que acabe derivando en el resultado observado, la reducción en la expresión de NOS3 y FGF2.

CDKN1A y CDKN2A se traducen en quinasas que inhiben el ciclo celular, p21 y p16 respectivamente. El primero tendría un efecto reversible, mientras que el segundo sería irreversible (Campisi, 2005).

En teoría, en las EPC la hipoxia debería reducir la expresión de p21 como parte del efecto proangiogénico que se ha descrito en la bibliografía (Lee et al., 2013). Por contra, CDKN1A y CDKN2A son genes que, por su papel, están relacionados en senescencia (Chen et al., 2006; Matthaei et al., 2012), en este sentido se podría esperar un aumento derivado de la mayor senescencia observada en presencia de los compuestos testados (véase la Figura 43). Sin embargo, los cambios que se observan son en general tenues.

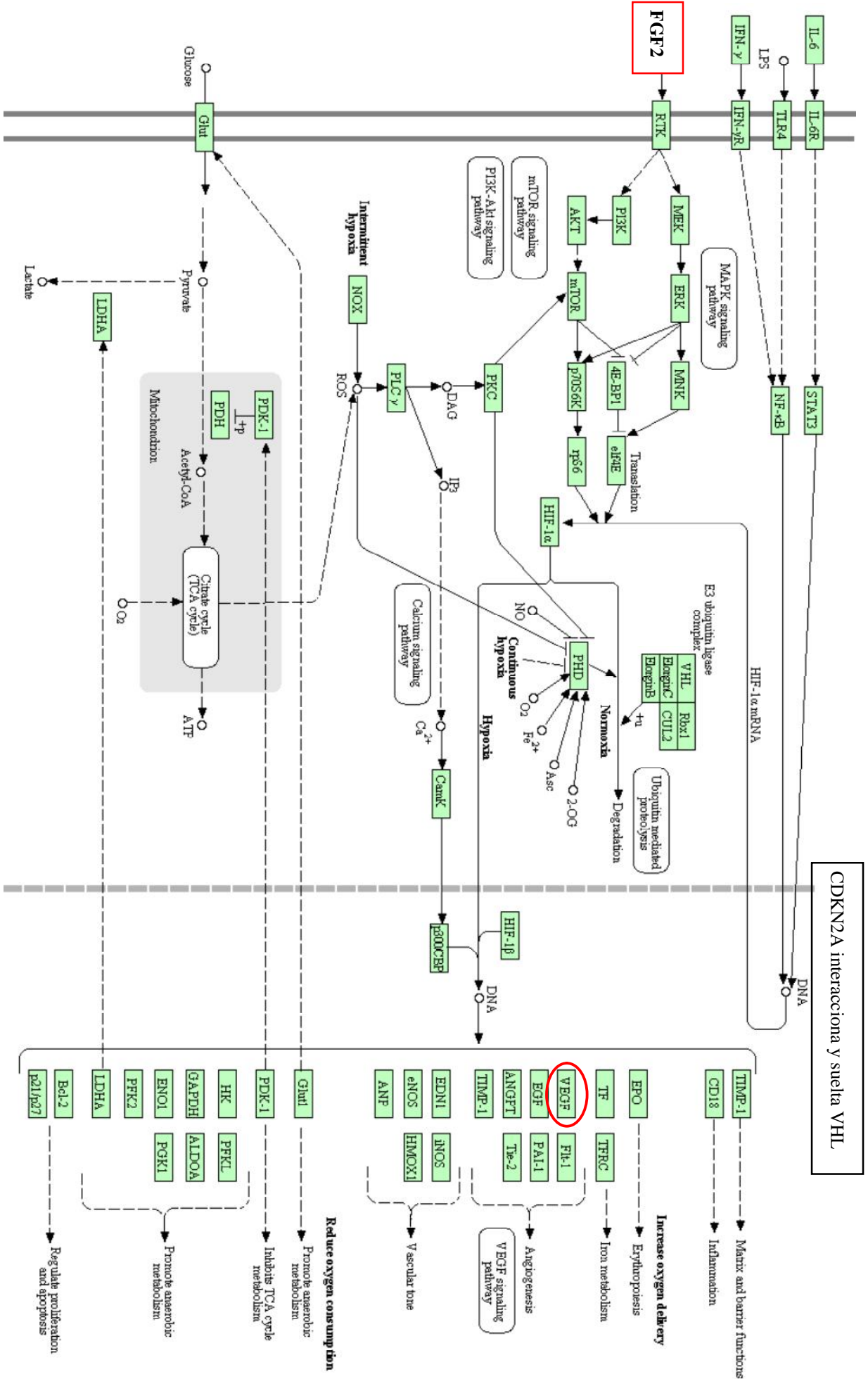
Vemos un aumento en CDKN1A que sólo ocurre con uno de los compuestos testados, el CoCl<sub>2</sub>, que parece tener un efecto más perjudicial sobre el crecimiento celular, es decir, no sería achacable a la acumulación de HIF1 $\alpha$ . Si a eso le sumamos lo tardío del cambio, indicativo también de no derivar directamente del aumento de HIF1 $\alpha$ , nos inclinamos por opinar que estamos viendo un aumento del gen que controla el ciclo celular para evitar resultados negativos del efecto general del CoCl<sub>2</sub> observados en las pruebas de proliferación (resultados mostrados en Figura 40, Figura 42, Figura 37, Figura 38 y Figura 39). Que este efecto sea independiente de la acumulación de HIF1 $\alpha$  (lo que se pretendía observar) estaría apoyado por el trabajo mencionado (Lee et al., 2013) donde indican que CDKN1A baja en hipoxia.

Por su parte, CDKN2A a largo plazo parece reducir su expresión. El papel de este gen es más preponderante en su relación con la senescencia y la detención del ciclo derivado de la acumulación de daño en el DNA (Rayess et al., 2012), es posible que el tiempo necesario para que se produzcan con estos compuestos a esta concentración sea mayor a las 24-48 horas aquí testadas, pues en trabajos al respecto se suelen tener hasta 5 días en cultivo (Chen et al., 2006). También juega un papel en el secuestro de HIF1 $\alpha$  para regular su actividad (Fatyol and Szalay, 2001). Esto, no obstante, no explicaría una reducción con respecto al valor control. Existe algún trabajo que da a entender que la expresión de p21 y p16, complementarios, sería inversamente proporcional según el causante de la detención

del ciclo (McGregor et al., 2002), pero nuestros resultados, poco acusados, no permiten confirmar este extremo.

Viendo las modificaciones producidas en la transcripción, parece claro que sí se produce una estabilización de HIF con los compuestos añadidos. Algunas de ellas (como VEGFA, GLUT1 o AM) son observables en las muestras de 3h, dando a entender que el efecto es rápido. Otros procesos son más lentos en producirse o a las 6h aún no han alcanzado su alcance total.





CDKN2A interacciona y suelta VHL

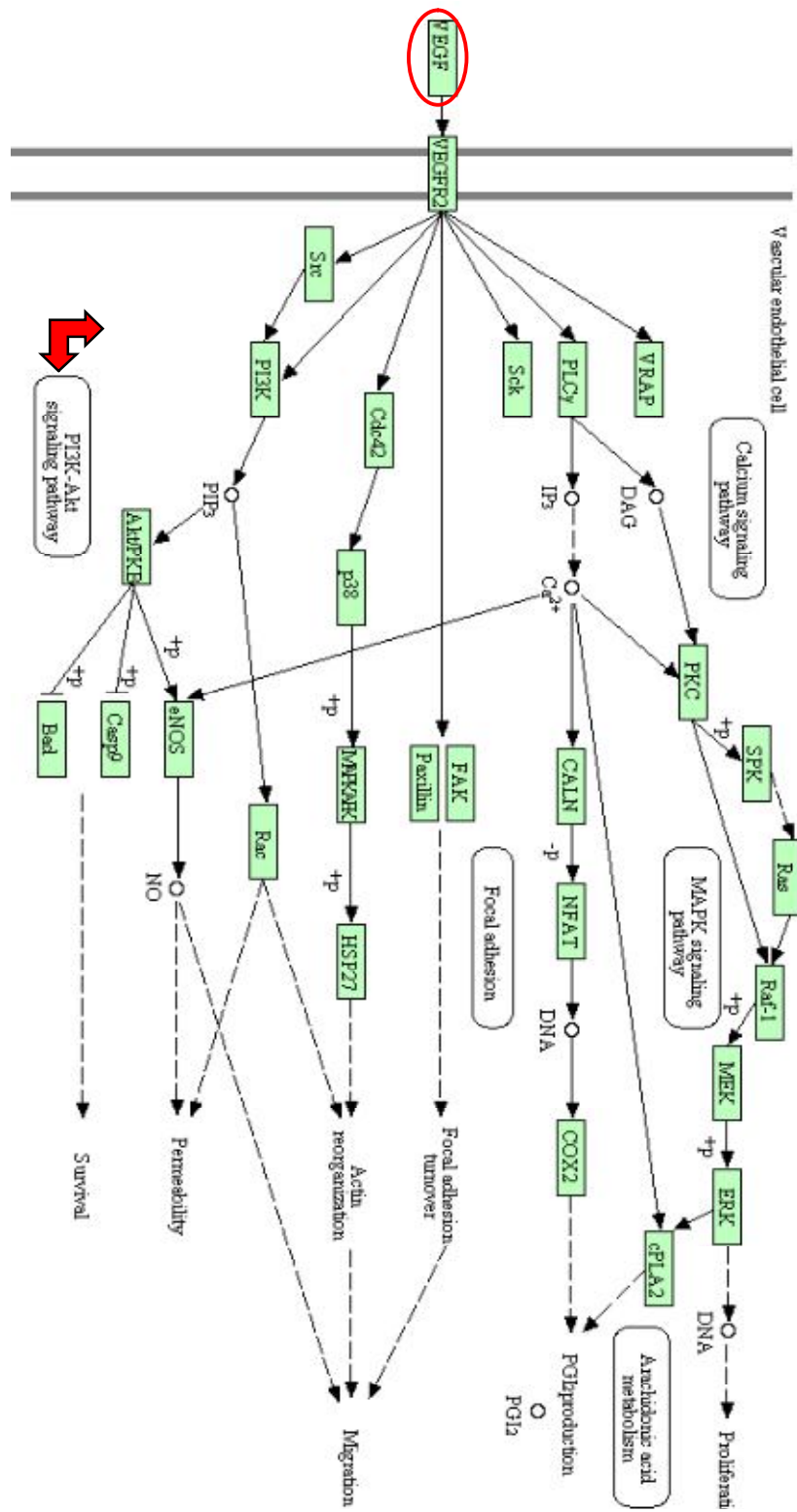


Figura 76: Esquema de la participación de las rutas afectadas por HIF1α. Imagen de KEGG.JP, modificada.

Se observa en todos los casos que el DMOG parece tener una actuación mucho más rápida y en muchas de las medidas el valor máximo alcanzado también es muy superior. El fundamento de esta observación se debe muy probablemente al empleo de una concentración superior de DMOG frente a otros de los compuestos empleados. Lo cual a su vez sólo fue posible porque su efecto perjudicial sobre el crecimiento era menor. Es decir, de los compuestos testados, todos ellos parecen estabilizar HIF1 $\alpha$ , permitiendo simular parcialmente el efecto de la hipoxia sobre el metabolismo celular, pero al hacerlo afectan la normal proliferación celular. De los tres compuestos testados (DFO, CoCl<sub>2</sub> y DMOG) es el DMOG el que causa menos reducción en el crecimiento con respecto a su control, siendo por lo tanto más específico a la hora de inhibir enzimas hidroxilasas relacionadas con la degradación de HIF1 $\alpha$ .

Debe tenerse en cuenta, no obstante, que el control correspondiente para el DMOG no es el mismo que para CoCl<sub>2</sub> o DFO. Como el DMOG es un compuesto insoluble en medio acuoso requiere de un disolvente orgánico para añadirse de forma controlada al medio. En este trabajo se usó el DMSO (habitual en estos casos) que induce por sí mismo una reducción en el crecimiento celular. Por lo tanto aunque el DMOG por su parte sí es más específico y la célula se ve menos afectada al comparar contra el control debe tenerse en cuenta el efecto del DMSO en dicho control. Esto puede ser importante según la línea empleada. En la Figura 39 podemos ver que la proliferación no se ve demasiado afectada en las ECFC empleadas, haciendo más deseable para la mayoría de casos la selección del DMOG como emulador químico de hipoxia. Pero se hace necesaria una consideración añadida de si este disolvente puede afectar a las medidas que se fueran a realizar (Lee and Park, 2017).

Por otra parte existe un trabajo (Zhdanov et al., 2015) que indica que el DMOG, previo efecto inductor de HIF, inhibe la respiración mitocondrial, reduciendo el consumo de O<sub>2</sub> que pasa a acumularse en el medio. La inhibición de la respiración necesariamente forzará el uso de la ruta de la glucólisis como fuente de energía, lo cual a su vez producirá una serie de cambios metabólicos que permitan emular con mayor exactitud el comportamiento propio de la hipoxia. Además se ha descrito que el DMOG, como la hipoxia aguda, induce un aumento de PlGF en las ECFC (Hookham et al., 2016), un factor proangiogénico que une VEGFR1 (d'Audigier et al., 2014). Es decir, a pesar de que la especificidad y mayor concentración del DMOG sea probablemente la principal

causa de la diferencia observada con respecto a los otros inductores de hipoxia también actúan otras razones.

## 9.5 Efecto de la Hipoxia

Las células ECFC se consideran las principales responsables de la reparación del endotelio vascular y de la vasculogénesis (Asahara et al., 2011). Diversos trabajos indican que ayudan a la recuperación del riego en modelos de isquemia (Burger et al., 2015; Fan et al., 2010; Goto et al., 2016; Pesce, 2003), asimismo indican que las células procedentes de cultivos en hipoxia resultan más útiles e incluso algunos autores dan a entender que ciertas subpoblaciones de EPC crecen mejor en dichas condiciones (Lee et al., 2013, 2015).

El razonamiento de este efecto sería que la hipoxia es una señal inequívoca de falta de riego en un tejido, lo cual requeriría un aumento de las ECFC presentes en la zona, las cuales aumentarían su proliferación y serían reclutadas con mayor eficiencia.

No obstante nuestras pruebas in vitro arrojan resultados contradictorios.

Sí que hemos comprobado de forma consistente que el efecto de la hipoxia induce un aumento de la capacidad clonogénica en las ECFC, en la línea de otros autores (Lee et al., 2015). Esto es, si se siembran a una densidad tan baja que se siembran células individuales en lugar de un grupo obligándolas a formar una colonia, las colonias formadas en condiciones de hipoxia son más grandes que las que surgen en normoxia (para una misma línea y pase). Efecto que tiene lugar tanto si comparamos una concentración de oxígeno del 5% en aire frente a normoxia (ver Figura 57 y Figura 58) como si comparamos un 3 o un 1% de oxígeno en aire frente a normoxia (ver Figura 63).

Las representaciones por cuartiles se muestran en la Figura 59 y la Figura 64 para los ensayos con hipoxia moderada y aguda respectivamente. Sólo 7 de 12 ensayos en hipoxia moderada y 1 de los 2 realizados en hipoxia aguda arrojaron valores significativos ( $p < 0.05$ ), pero la tendencia es clara en todos ellos.

Como el número de incubadores de hipoxia era limitado no fue posible una comparación simultánea de las 3 condiciones. Además, como ya se ha comentado, al tratarse de diferentes líneas y pases no es apropiado relacionarlos directamente por la alta

variabilidad entre los ensayos. No obstante, observando la diferencia entre las condiciones testadas y su control (normoxia), se intuye que la concentración del 3% de oxígeno es óptima para la formación de colonias, siendo las de 1 y 5% algo menos eficientes, pero en cualquier caso las 3 mejores que el 21% habitual para casi todas las líneas testadas, con la excepción de los ensayos realizados en hipoxia al 1% en la línea de cordón C1.2.

En este sentido, la hipoxia sí está proporcionando un aumento de las capacidades de las ECFC. Sin embargo, este crecimiento superior no se traduce en un aumento de la pendiente en la fase exponencial de una curva de crecimiento habitual. Todos los ensayos de proliferación, tanto a tiempos cortos (hipoxia moderada en Figura 56 y aguda en Figura 62) como los de pases sucesivos (hipoxia moderada en Figura 51 y aguda en Figura 61) así lo indican. Prácticamente no hay diferencias entre el 21 y el 5% de oxígeno, tampoco parece haberlas entre el 21 y el 3% (al menos no de forma consistente) y al llegar al extremo de un 1% de oxígeno parece producirse un efecto perjudicial en el crecimiento.

Estas observaciones desestiman por sí mismas la hipótesis de partida de que la hipoxia promovería el crecimiento celular. Si bien al no ser tampoco perjudicial por encima de un 1% de oxígeno sí que se podría mejorar la eficacia de un tratamiento basado en las ECFC al mejorar su capacidad clonogénica.

### **9.5.1 Diferencias entre líneas de adulto y cordón**

Resulta obvio que existen importantes diferencias entre las líneas que se aíslan de sangre periférica de adulto de aquellas que se aíslan de sangre de cordón umbilical de neonatos. Las primeras acostumbran a soportar un número de pases menor, tardar más tiempo en crecer que las segundas y presentan una superficie por célula mayor. Esto también se traduce en una capacidad clonogénica empeorada y mayor senescencia.

Son diferencias que dan idea de que las líneas que se aíslan de donantes adultos son de una “calidad” o potencia inferior. Sin embargo es de interés comentar que a lo largo de este trabajo se ha observado una ligera tendencia adicional. La diferencia en los ensayos clonogénicos entre normoxia e hipoxia parecía menor en el caso de células adultas que en el de células de cordón. Esto es muy probablemente debido simplemente a que las células de adulto forman menos colonias y de menor extensión, por lo que hallar las diferencias entre condiciones se hace más complicado.

Pero a esta observación debe añadirse que tanto en los ensayos de proliferación en pases sucesivos de hipoxia moderada (5%) como aguda (3%) sólo las líneas testadas provenientes de adulto presentaron una ligera mejoría en hipoxia ausente en las líneas de cordón. En un principio esta tendencia se desestimó por minúscula, no estar compartida por las ECFC de cordón (teóricamente de comportamiento similar) y no extenderse a los ensayos de proliferación a tiempos cortos. Sólo al comprobar todos los ensayos surge este patrón.

Como sólo se han hecho 2 ensayos de seguimiento a largo plazo en condiciones de hipoxia y normoxia sobre líneas ECFC de adulto no es posible concluir si esta tendencia se mantiene realmente o sea debida al error experimental. No obstante es una observación digna de mención a la vista de los resultados obtenidos que habrá de estudiarse a futuro. Existe la posibilidad de que la respuesta a hipoxia difiera muy ligeramente entre ECFC según provengan de sangre de adulto o de cordón. Esto explicaría las observaciones previas del grupo donde esta tendencia parecía haberse mantenido mientras se trabajó con las líneas obtenidas de muestras de sangre de adulto bajo una hipoxia del 5% de oxígeno en aire.

## 9.6 ECFC en clonogenia

A lo largo de los diversos ensayos clonogénicos realizados, a pesar del alto error aleatorio cometido al sembrar números tan bajos de células, sí que observamos un número más bajo de colonias formadas que de células sembradas, salvo un único caso. Esto se explica por dos motivos; probablemente con el manejo algunas células acaben dañadas y no todas logren adherirse. Por otra parte de las que sí lo logren no todas sobrevivirán, dado que las ECFC, como la mayoría de líneas primarias, requieren de señales de supervivencia generadas por sus vecinas que no pueden recibir al sembrarse solas, entrando muchas en lo que se denomina como apoptosis por soledad (Bowen, 1993).

Se observa también de forma coherente que conforme más avanzado es el pase de testado en una línea dada, menor es el número y tamaño de las colonias formadas. Como se ve en la detención del crecimiento en los ensayos de proliferación, las ECFC no son inmortales y sus propiedades se reducen al realizar pases sucesivos. Cabe pensar que aquellas células que hayan pasado por más duplicaciones tendrán una mayor dependencia de factores de

supervivencia externos y posean un ritmo de duplicación menor. Este último punto también se observa en los ensayos de proliferación, de hecho es el fundamento del ensayo a pases sucesivos, donde podemos ver que para pases más tardíos las células tardan más en duplicarse y lo hacen en menor extensión.

Como se ha comentado en la metodología, lo que no ofrece información de interés es considerar el número de colonias observadas, información mostrada en la Tabla 9 y la Tabla 13. En su lugar debe atenderse a la distribución del tamaño de las mismas. Por lo tanto se deduce que la hipoxia no afecta realmente a la capacidad de supervivencia de las ECFC aisladas ni su adhesión inicial sobre las superficies de colágeno empeladas.

Teniendo en cuenta las características observadas durante el cultivo clonogénico, el siguiente paso consistió en buscar la explicación de por qué la capacidad clonogénica y la proliferación muestran una respuesta discrepante frente a la hipoxia.

### **9.6.1 Senescencia celular como posible causa**

Una de las explicaciones que se plantearon para la disyuntiva clonogenicidad-proliferación, en principio contradictoria, fue que tal vez la base de la misma residiera en la senescencia celular. Según esta nueva hipótesis, la tensión de oxígeno básicamente protegería de alcanzar la senescencia, tal y como algunos artículos indican (Lee et al., 2013). Durante el crecimiento habitual al no estar sometidas las células a un estrés importante, la senescencia se alcanzaría más o menos a la vez al alcanzar un número de divisiones que induzca el acortamiento de los telómeros. Por contra, en el proceso clonogénico extremadamente estresante, las células en normoxia perderían propiedades y capacidad de crecimiento, algunas incluso entrando en senescencia y dejando de dividirse. Mientras que aquellas crecidas en hipoxia, protegidas por algún efecto sin determinar derivado de la falta de oxígeno, aguantarían mejor este estrés y serían capaces de continuar creciendo con menos trabas, resultando en colonias más grandes.

Esta hipótesis se puso a prueba midiendo explícitamente el nivel de senescencia indirectamente por tinción con X-Gal. Al usar una línea de cordón no se hallaron diferencias entre las concentraciones de oxígeno en aire del 21, 3 o 1%. En una línea de adulto, no obstante el cultivo en hipoxia al 3% de oxígeno presentó un nivel significativamente superior de senescencia (ver Figura 68 A). Desestimando la posibilidad de que la hipoxia protegiera de la senescencia.

Una posible explicación de la ausencia de diferencias en la primera medida podría ser que, siendo una línea de cordón con una vida útil larga, en el pase testado (pase 6, relativamente temprano) el número de células senescentes fuese demasiado bajo como para distinguir diferencias entre las condiciones. En todo caso esta técnica adolece de una alta desviación.

Se consideró la posibilidad de que el efecto de la hipoxia sobre la senescencia cambiara a diferentes concentraciones de siembra, como ocurre con el crecimiento. Para ello células de otra línea de cordón se sembraron a diferentes concentraciones: 100, 1.000 y 10.000 células por pocillo (ver Figura 68 B). Se decidió realizar la medida de todos los pocillos en el mismo momento para poder compararlos entre sí. Los pocillos con 100 células no ofrecían resultados mensurables, pero los otros indican una relación inversamente proporcional entre el oxígeno disponible y la senescencia.

Hubo por tanto importantes diferencias entre las tres medidas. Se trata de líneas, tiempos y siembras diferentes en los ensayos, por lo que la comparación no es directa y no resulta sencillo deducir una explicación a este hecho. Pero en todo caso lo que sí queda fuera de toda duda es que la hipoxia no protege de la senescencia, de hecho la promueve según el caso. Queda por tanto la hipótesis completamente desestimada.

### **9.6.2 Selección de subpoblaciones como posible causa**

Otra posible explicación sería que las condiciones de hipoxia ayudan a la selección de ciertas subpoblaciones de ECFC de capacidad clonogénica superior. Los ensayos de crecimiento a tiempos largos en condiciones de hipoxia frente a normoxia (mostrados en la Figura 51 y la Figura 61) no ofrecían diferencias claras a este respecto. Pero pensamos que podría haber una posibilidad a este respecto que encajara con todas las medidas.

Según esta hipótesis, esta subpoblación de alta capacidad clonogénica y proliferativa sería muy minoritaria y en condiciones habituales su crecimiento acelerado en hipoxia quedaría oculto por la mayoría de células de crecimiento similar en normoxia o hipoxia. En clonogenia, no obstante, las colonias que fuesen de estas células crecerían más deprisa al seleccionarse esta subpoblación. El trabajo de Patel et al. (Patel et al., 2016) distinguiendo entre ECFC CD34+/- apoyaría esta idea. En este artículo muestran que las células positivas para CD34 poseen una capacidad clonogénica importante mientras que las negativas para CD34 no. Las células positivas se mantendrían en un número bajo y



constante con un número creciente de negativas que no serían capaces de volver a su estadio previo de célula CD34+.

Para testar esta explicación e intentar seleccionar esta subpoblación se mantuvieron células de una línea de cordón en expansión clonogénica durante 2 pases consecutivos (8 y 9) en normoxia e hipoxia al 3 y al 1%, para a continuación pasar a expandir en normoxia. No se logró expandir, las células parecían haber agotado gran parte de su capacidad proliferativa, como si hubiesen acumulado gran número de pases. No es de extrañar dado que la expansión inicial se hizo de forma clonogénica. No obstante, es de interés lo siguiente: Las células derivadas de normoxia se pudieron mantener durante un total de 4 pases, mientras que las de hipoxia 1% sólo 2 y las de hipoxia 3% sólo duraron 1 pase antes de detenerse por completo (ver Figura 69). Se intentó realizar un ensayo clonogénico, el único tipo de ensayo para el que alcanzaba la baja disponibilidad de células, a partir de las 3 sublíneas así aisladas. Apenas se formaron colonias (ver Tabla 17), por lo que no es posible obtener resultados concretos, pero sí se observa una tendencia similar a la observada con los pases sucesivos, las células obtenidas de normoxia formaron más colonias que las de hipoxia al 1% y alcanzando un valor máximo superior, mientras que las de hipoxia al 3% no llegaron a formar ninguna colonia de más de 25 células.

Este resultado se confirmó con un ensayo similar con otra línea de cordón. En este caso se mantuvieron las células expandiendo, siempre que fue posible, en condiciones clonogénicas (ver Figura 70). Aquí la condición de hipoxia 3% (la que más rápido formó colonias en un principio) dio menos pases que la de normoxia (la siguiente) y ésta menos que hipoxia 1% (la más lenta en crecer en un principio para esta línea concreta).

En conclusión, las células que más se habían esforzado en crecer rápidamente en la formación de colonias inicial se encontraban peor que las de crecimiento no acelerado. De donde se deduce que la hipótesis original es errónea, de haberse seleccionado una subpoblación más potente en hipoxia ésta debería haber crecido más que la de normoxia. Es más, el esfuerzo que supone formar colonias más grandes más rápido parece agotar la capacidad de las células, que en pases sucesivos son superadas por las de crecimiento más lento. Este resultado se encuentra en la línea de lo que se puede observar en los ensayos de senescencia donde la hipoxia se mostraba perjudicial.

### 9.6.3 Secreción al medio como posible causa

Las ECFC, si bien a diferencia de otras células proangiogénicas no es su principal función, secretan una serie de citoquinas y hormonas con papel paracrino que inducen su propia proliferación (Asahara et al., 2011). Es de esperar que estos factores, a la larga, se acumulen en el medio. A partir de los ensayos de expresión génica sabemos que esta expresión difiere según el oxígeno disponible (ver Figura 71, Figura 72 y Figura 73). Aumenta especialmente la expresión de VEGFA en condiciones donde se induce HIF1.

En la práctica las células en condiciones de cultivo habituales se encuentran a una confluencia tal que son necesarios cambios de medio regulares cada 2 días para evitar que se agoten los nutrientes. Por el contrario, cuando se planteó el ensayo clonogénico con una siembra de muy pocas células se decidió economizar y reducir la asiduidad con que se realizaba este cambio, pasando a 3-5 días.

A partir de estos hechos se planteó una posibilidad diferente. Tal vez las diferencias observadas sean las propias del efecto de los factores acumulados en el medio. Según esta hipótesis sólo en el caso del ensayo clonogénico, donde el medio permanece por más tiempo, alcanzan las citoquinas entre las condiciones de normoxia e hipoxia una diferencia significativa que causa el efecto observado. Esta diferencia no podría apreciarse en los ensayos de crecimiento habitual por la renovación cada dos días del medio.

Como no era factible mantener el medio durante más tiempo en un ensayo de proliferación para comprobar este extremo, se recurrió al razonamiento inverso. Se repitió el ensayo clonogénico cambiando el medio diariamente o cada 5 días como es habitual. Los datos se muestran en la Tabla 14 y la representación de los mismos en la Figura 66 comparando cambio diario frente a habitual para cada condición, así como en la Figura 65 comparando las condiciones y en la Figura 67 las distribuciones por cuartiles. Ensayo que se realizó tanto sobre una línea de adulto (BH10) como una línea de cordón (C1.2), este último sobre 2 pases sucesivos.

No se lograron suficientes colonias como para obtener datos representativos de la condición de hipoxia al 1% en esta línea concreta de cordón. La casi ausencia de crecimiento en hipoxia extrema no la observamos en medidas previas, indicando que bien surgió un problema puntual en el incubador que no pudimos diagnosticar o bien la línea empleada en concreto era extraordinariamente sensible a la concentración de oxígeno del

1%. La línea de adulto formó muy pocas colonias como para que los resultados sean claros por una representación en histograma, pero sí se observa en la representación por distribución que la tendencia habitual se mantuvo. Quizá la línea de adulto empleada, que en condiciones de expansión corrientes sólo alcanzó el pase 12 antes de detenerse por completo, se encontraba ya bastante agotada en el pase 9 que se usó.

Sí se obtuvieron buen número de colonias de la línea de cordón en normoxia e hipoxia al 3% y proporcionan datos interesantes. A pesar de que la representación de la distribución no lo muestra, el histograma da idea de que con el cambio de medio habitual hay más colonias grandes en hipoxia 3% que en normoxia, si bien no con tanta diferencia como en otros ensayos. Este hecho probablemente sea debido a que la placa se tuvo que sacar del incubador en hipoxia diariamente para poder hacer el cambio de medio en los pocillos que lo requerían según el diseño del ensayo, por lo que la hipoxia sólo era intermitente. Sin embargo esta diferencia se modifica en aquellos pocillos que recibieran un cambio de medio diariamente, en esos casos es la condición de normoxia la que genera colonias más grandes que la hipoxia 3%.

La diferencia en la línea de cordón se magnifica en el segundo de los pases. Aquí, de nuevo, las condiciones de normoxia e hipoxia 3% presentan un tamaño promedio de las colonias formadas muy similar, ligeramente superior en hipoxia. Como se ha comentado probablemente debido a que la hipoxia no fue continua. Cuando se cambia el medio diariamente la inversión en la tendencia es total. Las colonias formadas en normoxia pasan a ser significativamente mayores que cuando el cambio de medio se realizó cada 5 días. Por su parte, el tamaño promedio de las colonias formadas en la condición de hipoxia 3% decrece ligeramente. Al comparar normoxia frente a hipoxia 3% con cambio diario, el primero es también significativamente superior al segundo.

Una inversión de la tendencia que no esperábamos originalmente cuando diseñamos los detalles del ensayo, dado que lo planteado era que no hubiese diferencias importantes entre las condiciones al cambiar asiduamente el medio. Entendemos que se han producido dos efectos simultáneamente:

- El constante manejo de las placas no permitió un nivel constante de hipoxia. Como se ha comentado en la introducción el equilibrado del nivel de oxígeno en el seno del líquido puede llevar bastante tiempo. Por necesidades del ensayo la placa estuvo saliendo de la estufa hipóxica diariamente durante la extensión del mismo. Esta ha de

ser la principal causa de la minimización de las diferencias previamente observadas cuando el medio no se sustituía diariamente.

- Por otra parte, un cambio de medio diario parece impulsar enormemente el crecimiento de las colonias en normoxia. En principio podría explicarse por el aumento importante en nutrientes disponibles para las células en crecimiento. Esto, sin embargo, no se produce en hipoxia donde el cambio de medio diario parece más bien perjudicial.

La explicación que se propone a este nuevo efecto es similar a la reducción en el tamaño de las colonias observadas en este ensayo en hipoxia respecto a los anteriores. Si cambios constantes que impiden mantener la hipoxia de forma constante prueban reducir el efecto ventajoso de la hipoxia, es razonable pensar que si dichos cambios se producen bruscamente el efecto perjudicial será mayor. Como se ha comentado en el apartado 5.4.2 Tensión de Oxígeno en Cultivos Celulares el equilibrado del nivel de oxígeno en medios acuosos lleva tiempo. Por lo tanto mientras que la hipoxia no era del todo constante en los pocillos con cambio de medio habitual (cada 5 días) al salir del incubador diariamente existió un efecto de tampón por parte del medio no cambiado que debió suavizar esa variación. En cambio dicha suavidad desaparece de los pocillos donde el medio es sustituido por completo, pasando las células de encontrarse en un medio medianamente hipóxico a normoxia atmosférica bruscamente. Las células en esta situación no tendrían la ventaja de tener una cierta cantidad de factores proangiogénicos secretados por ellas mismas presentes el medio pero sí la desventaja del estrés causado por los bruscos cambios en la cantidad de oxígeno en el medio.

Esto explicaría la disminución del tamaño de colonias en la condición hipoxia con cambio diario mientras que aumentan en normoxia. Asimismo encajaría con la observación previa, a priori contradictoria, de que pasar de normoxia a hipoxia diariamente no afecta a la proliferación en general (como se muestra en la Figura 52), pues aquí el efecto también quedaría más o menos suavizado por el medio y no se observan diferencias importantes entre las condiciones de normoxia o hipoxia constantes que por sí mismos.

Por lo tanto podemos decir que una de las causas del aumento observado en el tamaño de las colonias formadas por las ECFC en hipoxia respecto de normoxia es por la secreción y acumulación de factores proangiogénicos al medio.

En cuanto a cuáles pueden ser, se pueden plantear algunas posibilidades a partir de las medidas de expresión génica. El principal gen cuya expresión aumenta es el VEGFA, un gen cuya correlación con la angiogénesis se conoce desde hace tiempo (Leung et al., 1989), y su participación parece asegurada. Del mismo modo hemos encontrado aumentos interesantes en la expresión de AM con inductores de hipoxia, por lo que sería un candidato interesante a analizar a futuro. Por contra, los niveles de FGF2 medidos dan idea de que su participación en los cambios observados no sería importante.

Esta explicación, sin embargo, no ofrece todas las explicaciones necesarias para resolver la dicotomía en cuanto a la diferencia entre las condiciones de cultivo. Si bien es cierto que el cambio asiduo de medio en cultivo celular habitual minimiza la acumulación de factores proangiogénicos, éstos siguen produciéndose. Existirían dos posibilidades:

- Podría darse el caso de que es necesario alcanzar una cierta cantidad crítica de los factores implicados para que su efecto no sea despreciable. Cantidad que no se alcanzaría en 2 días de cultivo pero sí en 5. Nos enfrentaríamos entonces a la contradicción de cómo en cultivo habitual, con una confluencia celular muy superior, no se puede producir una cantidad suficiente de estos factores.
- Por otra parte, debe tenerse en cuenta que el cultivo a alta confluencia implica la participación de multitud de procesos por parte de las células de tipo endotelial. Estas células crean uniones “gap” entre ellas y su respuesta difiere de forma importante según el espacio disponible y los detalles del medio de crecimiento (Krüger-Genge et al., 2015), además su consumo de glucosa aumentará de forma importante debido a su mayor número, tanto más en hipoxia. En definitiva, es posible que existan otros mecanismos aún no abordados que expliquen estas diferencias.

#### **9.6.4 Expresión génica en clonogenia**

Observadas las importantes diferencias en el crecimiento en condiciones clonogénicas entre hipoxia y normoxia se decidió incluir en el análisis de expresión génica entre normoxia e hipoxia una comparación adicional entre dichas condiciones de sembrado. Para ello se mantuvo un ensayo clonogénico creciendo más tiempo del habitual para maximizar el número de células disponibles, para luego extraer el material genético y sacar cDNA del RNA total. Los resultados se muestran en la Figura 71 para la línea de adulto y Figura 72 para la de cordón. En la línea de cordón se repitió la extracción, pero sólo sobre la condición clonogénica, se muestra en la Figura 73.

Las muestras de clonogenia presentaban una cantidad y calidad del RNA obtenido sensiblemente inferior a otros ensayos. Este hecho junto con una alta variabilidad entre muestras de las medidas de los genes empleados como referencia da idea de que no es posible sacar conclusiones sólidas de las pruebas realizadas por degradación de la muestra. De hecho las diferencias entre condiciones de cultivo clonogénico o habitual no arrojan tendencias constantes. A continuación se comentan algunas observaciones que sí se pueden derivar de los resultados obtenidos por comparación con lo mostrado en el apartado anterior.

Como ocurría con los inductores químicos de hipoxia se observa una reducción de la expresión de HIF1 $\alpha$ , así como un aumento de GLUT1 y VEGFA que induce una reducción de KDR. Estos cambios son progresivos al reducir el oxígeno disponible en el caso de las muestras de la línea de adulto, no así en la de cordón, indicativo de nuevo de los problemas que surgieran con esa línea.

La expresión de NOS3 parece no modificarse significativamente en la línea de adulto. Lo cual contrasta con las medidas con inductores químicos de hipoxia, donde su expresión bajó de forma consistente. En la línea de cordón se observa una expresión inversamente proporcional al ritmo de crecimiento de las diferentes muestras en clonogenia, con valores superiores en el crecimiento en normoxia y menores en hipoxia al 3%. Valores todos ellos mayores a las muestras en crecimiento habitual.

Todos estos cambios siguen las líneas generales ya descritas en la discusión de los inductores químicos como los que cabrían esperar ante el efecto de la hipoxia. La extensión de los mismos, según el caso, supera en algo el doble de expresión, siendo por tanto cambios de importancia pero no extremos.

La expresión de CDKN1A es muy superior a CDKN2A, pero ambas expresiones parecen reducirse al aplicar hipoxia, si bien en la línea de adulto esto sólo se observa en la condición de hipoxia al 3%. Esto refuerza la hipótesis comentada en el apartado anterior de que el aumento observado en CDKN1A en presencia de CoCl<sub>2</sub> sea debido a su efecto nocivo y no algo derivado de la acumulación de HIF1 $\alpha$ , donde una reducción del mismo, como aquí sí ocurre, es más razonable por promover la angiogénesis.

Todas estas modificaciones parecen producirse en el mismo sentido tanto en las muestras obtenidas de cultivo en las condiciones habituales como en las clonogénicas, pero su extensión varía. En la línea de adulto hemos medido una mayor expresión de los genes

HIF1 $\alpha$ , GLUT1 o KDR en condiciones habituales que en clonogénicas. No obstante el gen VEGFA pasa a estar más expresado en condiciones hipóxicas en las placas sembradas en clonogenia que en esas mismas condiciones en placas habituales. Como ya se ha comentado eso explicaría la correlación inversa medida para la expresión de su receptor, KDR.

Estas diferencias no son aparentes en la muestra de cordón, donde la tendencia no es tan clara. No obstante, donde en la línea de adulto apenas hay diferencias en la expresión de NOS3 entre clonogenia o no, en la línea de cordón la expresión es mayor en condiciones clonogénicas.

Las medidas tomadas para la expresión de CAIX muestran un cambio aparente en las tendencias. En la línea de adulto baja la expresión al reducir el oxígeno disponible en la siembra normal, pero en la siembra clonogénica la expresión aumenta en hipoxia. Por el contrario, las medidas realizadas en la línea de cordón muestran un aumento de la expresión al reducir el oxígeno disponible en condiciones de cultivo habituales, pero una disminución cuando se hace en condiciones clonogénicas. Además en la línea de adulto se observa que la expresión de CAIX es menor en condiciones de crecimiento clonogénico que en concentraciones habituales, mientras que la de cordón es similar.

Resulta complejo en el caso de este gen comprender el mecanismo derivado de la actuación de la hipoxia. Más aún cuando las medidas con inductores de hipoxia no arrojaron tampoco tendencias constantes entre las diferentes medidas. No cabe en este caso aducir la diferencia a cambios en el pH, pues ambas líneas de ECFC se expusieron a las mismas condiciones.

Las medidas que se hicieran sobre un pase posterior de la línea de cordón refuerzan todo lo observado, un aumento de VEGFA y GLUT1 en hipoxia, acompañado de una disminución de HIF1 $\alpha$ , KDR y CAIX.

La similitud entre los resultados de expresión génica entre los ensayos que comparan normoxia e hipoxia y los que emplean inductores químicos sugiere que los cambios que se observan provienen de la misma fuente, previsiblemente HIF1. Las diferencias entre las condiciones de cultivo habitual y clonogénica son, no obstante, tenues como para explicar por sí mismas las diferencias en el crecimiento que se observa en los ensayos correspondientes.

## 9.7 Estudio de marcadores de superficie

Del ensayo que se hiciera en pases sucesivos a condiciones de hipoxia moderada (5%) y normoxia (21%), cuyo resultado se muestra en la Figura 60, de forma general se ve que se va perdiendo la expresión de varios marcadores propios de células progenitoras o madre hematopoyéticas.

Las proteínas siguientes reducen de forma progresiva su expresión:

- CD29, participante de integrinas de unión a matriz extracelular (colágeno) formando parte de la integrina  $\alpha 3\beta 1$ .
- CD34, marcador de célula madre hematopoyética
- CD144, también denominado VE-caderina, es una proteína de unión célula-célula dependiente de calcio importante para la impermeabilidad endotelial.

La pérdida de CD34 ya estaba descrita (Cheng et al., 2012; Patel et al., 2016). Se trata de un regulador de localización de otras proteínas de membrana importante para la migración, generación de túbulos y proliferación (Nielsen and McNagny, 2008). Se incluye en los marcajes de selección de EPC, y se ha comprobado que las células que lo incluyen mejoran las condiciones de isquemia en modelos murinos (Ott, 2005). Su desaparición se entiende como el proceso que siguen las ECFC de evolución a células endoteliales maduras.

La reducción de CD29 y CD144 se produce en mucha menor extensión. En ambos casos aún restaba más de un 50% de las células medidas como positivas para cada uno de ellos. Cabe suponer que esta ligera pérdida parecería ser derivada del propio cultivo *in vitro*, dado que ambas proteínas son necesarias para una apropiada función endotelial. Los valores medidos finalmente son similares a los que se encuentran en la bibliografía para EPC genéricas (Avci-Adali et al., 2009). A pesar del ligero decremento de la expresión de CD29 no se produjo pérdida de la adherencia de los cultivos, de nuevo dando idea de que no es una bajada significativa.

Por otra parte tenemos una selección de marcadores cuya pérdida se produce en mucha mayor extensión, lo que hace pensar que es producto del propio proceso de maduración de las ECFC y no un artefacto derivado de las condiciones *in vitro*. De especial interés es que estos cambios están bastante acelerados en hipoxia frente a normoxia. Tanto es así



que en varias de ellas no llegamos a detectar su presencia en ninguno de los países en los que se midieran en hipoxia. Las proteínas en cuestión son:

- CD106, también llamado VCAM-1, es una proteína de unión al endotelio vascular y es un marcador de células madre mesenquimales.
- CD117, receptor de citoquinas de células madre hematopoyética relacionado con su proliferación.
- CD133, llamado prominina-1, es una proteína de función exacta desconocida. Se encuentra presente en células madre hematopoyéticas y EPCs.
- HLA-DR, proteína de exposición de antígenos propios.

De nuevo, la reducción se produce predominantemente para los marcadores propios de célula madre o progenitora. Esto nos da idea de que las ECFC desde que son reclutadas desde la médula ósea inician un proceso de maduración que debe concluir produciendo células endoteliales maduras y diferenciadas. En esta línea va desapareciendo también el receptor VCAM-1 que permite a las ECFC migrar desde el flujo sanguíneo a la zona donde son necesarias. Asimismo la expresión del complejo mayor de histocompatibilidad 2 (HLA-DR) baja su expresión en la línea de lo que está descrito en otras líneas modelo de célula endotelial basal (Iwasaki et al., 2017).

A pesar de que todos los cambios mostrados son de reducción de expresión, no parece ser el caso de que haya una reducción generalizada para todas las proteínas de superficie. Porque hay gran cantidad de marcadores que no cambian en absoluto, mostrando expresión o no, en todas las muestras sin excepción. Como no variaban éstos no se muestran entre los resultados de este trabajo.

En resumen, esto confirma la línea de pensamiento que últimamente predomina en el campo de las ECFC. Estas células, desde el momento en que son reclutadas de la médula ósea, inician un proceso de maduración bajo el que van modificando la expresión de citoquinas (Balaji et al., 2013), receptores (Chavakis, 2005) y proteínas de superficie para poder ser reclutadas a las zonas dañadas o isquémicas y cumplir su función reparadora para, finalmente, derivar en células endoteliales maduras.

Esto coincide con el resultado obtenido de la cantidad de células con actividad ALDH (mostrado en la Figura 22), marcador de diferenciación (Moreb, 2008), donde se ve que a mayor es el porcentaje de células mantienen esta actividad enzimática.

Considerando el ritmo de crecimiento de la línea de adulto empleada en el ensayo se ve que el número total de células con actividad ALDH crece ligeramente, pero a una velocidad muy inferior al de las células que no tienen esta actividad. No resulta claro si se pierde su expresión conforme las divisiones se suceden, o por el contrario existe un número más o menos constante de ECFC con actividad ALDH y éstas se diluyen entre las que no tienen esta actividad.

Las medidas que aquí se muestran indican que el proceso de maduración de la población en general no se detiene cuando las células se cultivan *in vitro*, lo cual supone un aspecto más que deberá tenerse en consideración en protocolos de terapia celular que se puedan desarrollar. De especial interés resulta que todo nos indica que dicho proceso de maduración parecería verse acelerado por la hipoxia, alcanzando antes que los cultivos equivalentes en normoxia los perfiles de expresión finales. Esto tendría sentido si se considera que tras su reclutamiento la única zona Hipóxica que las ECFC hacen frente es el propio tejido isquémico donde deben cumplir su función de reparación final. Por lo tanto la hipoxia sería una señal añadida que activaría los cambios que, en última instancia, inducen la consecución de la diferenciación de las ECFC en células endoteliales.

Por lo tanto la hipótesis de partida, que se demostraba falsa para la proliferación, resulta ser parcialmente cierta para los perfiles de expresión, donde la hipoxia sí acelera la modificación de las ECFC.

## 9.8 Detección de HIF mediante Western-Blot

Como se ha expuesto en el apartado 5.4.3 Respuesta a Hipoxia, el principal efector de la respuesta a la hipoxia, condición a caracterizar, es la familia HIF. Factores de transcripción inducidos en hipoxia que permiten a la célula adaptarse a condiciones de falta de oxígeno. De acuerdo a las medidas de expresión génica mostradas las ECFC no son una excepción y también tienen una regulación importante con participación de esta proteína.

Por lo tanto, el siguiente paso lógico sería determinar su presencia en las diferentes condiciones de trabajo. Debido al principal mecanismo de regulación a nivel de estabilidad de la subunidad  $\alpha$  la forma apropiada ha de ser midiendo proteína directamente, es decir, mediante la técnica de Western-Blot.

Sin embargo las medidas resultaron, en resumen, no concluyentes. A pesar de haber testado multitud de variables en el protocolo no fue posible la detección clara de HIF1 $\alpha$  como para poder hacer comparaciones cuantitativas.

El hecho de que sí se detectara con claridad el control positivo indica que la técnica se realizó correctamente. Cabe por tanto plantearse la duda de si la ausencia de señal pudiera deberse realmente a la ausencia de proteína en las muestras de partida. No parece ser el caso, las medidas de expresión génica observadas coinciden con el efecto que cabía esperar de la presencia de HIF1 activo, por ejemplo el gen HIF1 $\alpha$  reduce su expresión de forma importante en hipoxia. Además, entre las muestras se incluyeron extractos de cultivos con inductores químicos de hipoxia, conocidos por inducir la estabilización de la proteína buscada en líneas endoteliales (Bakhashab et al., 2014) y tampoco permitieron detectar señal positiva.

Es más probable que el problema resida en la obtención de la muestra. HIF1 $\alpha$  se degrada a gran velocidad, deja de ser detectable tras sólo 10 min (Berra et al., 2001), y se encuentra presente a muy pequeña concentración, como la mayoría de factores de transcripción. Se tomaron gran número de precauciones, usando inhibidores de proteasas y de prolil-hidroxilasas, trabajando en frío y rápido, pero pudieron no haber sido suficientes. Del mismo modo es posible que, a pesar de los procedimientos de concentración, no partiéramos de una cantidad de muestra suficiente.

Se consideró la posibilidad de que el causante fuera en cambio HIF2, también conocido como EPAS1. Es una proteína de función similar que incluso se solapa con parte de la actuación de sus proteínas hermanas HIF1 y HIF3, todas ellas comparten la subunidad  $\beta$  al formar un homodímero activo. HIF2 $\alpha$  parece encontrarse en mayor medida en células de tipo endotelial (Gorlach, 2009) y estar relacionado con una respuesta a hipoxia a más largo plazo (Koh and Powis, 2012), pero es un factor mucho menos estudiado. Las medidas de Western-Blot que buscaron la expresión de esta proteína ofrecieron cierta señal, insuficiente para poder hacer medidas cuantitativas, pero al menos detectable.

Por lo tanto, si bien no puede asegurarse por medida directa, indirectamente todo indica que las diferencias observadas son debidas a una respuesta en la expresión provocada por el factor de transcripción HIF1 $\alpha$ . Sí podemos asegurar que a este efecto se le suma el de HIF2 $\alpha$ , si bien no queda claro con los datos obtenidos la extensión de la participación de cada uno.

## 9.9 Ideas finales

Las ECFC cultivadas *in vitro* continúan tras su aislamiento el proceso de diferenciación a célula endotelial madura, proceso que la hipoxia acelera. Sin embargo esto no va acompañado de modificaciones en su comportamiento general. En cultivo siguen la curva habitual en líneas primarias, independientemente de las condiciones de cultivo (normoxia frente a hipoxia). Sí que cambia la expresión de genes relacionados con la angiogénesis y parece que ése es uno de los factores que ayudan a que en hipoxia hayamos observado un consistente aumento de la capacidad clonogénica. Probablemente no sea el único factor al no observarse tendencia alguna en las pruebas de crecimiento. Las células que han formado colonias pierden capacidad de crecimiento, comportándose de forma similar a como lo harían en crecimiento habitual tras duplicarse un número equivalente de veces. Es decir, que la hipoxia no protege de los procesos de senescencia, de hecho las pruebas sugieren que la hipoxia induciría senescencia en las ECFC.

Todas estas observaciones en conjunto dan idea de que el comportamiento de las ECFC es el de células con una importante función a corto plazo, como un tratamiento puntual de “un sólo uso”. Las ECFC reclutadas en médula acudirían a la zona donde son necesarias, concluirían su diferenciación, experimentarían un aumento en su capacidad clonogénica y de generación de factores proangiogénicos para reparar la zona dañada y después perderían sus capacidades especiales, pasando a ser simples células endoteliales de la vasculatura normal. Un proceso que, de acuerdo a lo observado, se vería acelerado en presencia de la hipoxia propia de tejidos dañados.

Esta visión de las ECFC tiene importantes implicaciones en las condiciones de cultivo de un hipotético tratamiento médico con base en estas células. Si, como se ha sugerido en varios trabajos publicados (Kawamoto et al., 2001; Murayama et al., 2002; Ott, 2005; Pesce, 2003; Suh et al., 2005), las ECFC se aíslan de pacientes, expanden *in vitro*, y se reinyectan en zonas afectadas de una patología, resultará crítico no inducir durante la fase de expansión el agotamiento replicativo de las mismas.

Las conclusiones derivadas de esta tesis sugieren que para obtener los mejores resultados a partir del tratamiento con ECFC convendría mantener la normoxia durante la mayor parte de la expansión para, poco antes de la reinyección, activar las ECFC mediante una exposición previa a hipoxia. Dicha exposición parece que tendría su punto óptimo entre un 3 y un 5 por ciento de oxígeno en aire.



## 10 Conclusiones

Relativas al aislamiento de las ECFC:

- Se ha establecido un protocolo de gran eficacia para el aislamiento de células progenitoras endoteliales tipo ECFC tanto de sangre de cordón umbilical como de sangre periférica de adulto en humanos. Determinando como crítico la extensión de la superficie en el paso de siembra.
- El rendimiento de dicho protocolo ha probado ser superior para las células provenientes de muestras de sangre de cordón umbilical en relación al volumen inicial. Estas ECFC son inicialmente más pequeñas, poseen un ritmo de proliferación superior, hay un menor porcentaje de células senescentes y forman colonias más grandes en relación a sus equivalentes de adulto.
- Las ECFC son líneas celulares primarias con limitada capacidad proliferativa, si bien inicialmente elevada. Conforme transcurren los pases en cultivo, la capacidad proliferativa disminuye, el tamaño de las células se incrementa, aparecen rasgos de senescencia, se reduce la capacidad clonogénica y la expresión de marcadores CD34, CD106, CD117, CD133 o HLA-DR propios de célula progenitora disminuyen así como la proporción de células con elevada actividad ALDH.
- Hay una gran variabilidad entre las propiedades, especialmente la proliferativa, de las ECFC de diferentes donantes. Lo que cambia los requerimientos en el aprovechamiento terapéutico de las células para cada caso, haciendo necesaria la identificación de indicadores de su declive y funciones.
- La eficiencia en el aislamiento de las ECFC, independientemente del origen de la muestra, no varía según se realice en normoxia o hipoxia al 5%.

Relativas al uso de ECFC como modelo de angiogénesis *in vitro*:

- Se ha logrado desarrollar un modelo de angiogénesis tridimensional con las ECFC basado en la formación de esferoides embebidos en colágeno. Una técnica aplicable a medicina personalizada al emplear células aisladas de una muestra de sangre.
- La utilidad de este modelo se ha comprobado con Bevacizumab, un fármaco antiangiogénico, indicando que se podría aplicar al cribado de compuestos con potencial actividad antiangiogénica.

- Se ha demostrado la posibilidad de introducir nanopartículas ferromagnéticas en las ECFC previa formación de esferoides manteniendo su viabilidad. Esto permite el control mediante campos magnéticos de dichos esferoides para el desarrollo de ensayos a mayor escala.

Relativas a la modificación genética de las ECFC:

- Se ha logrado la modificación genética de las ECFC mediante vectores lentivirales con alta eficacia y de forma estable, independientemente del origen de las células. Una técnica aplicable en terapia, bien mejorando el potencial de las ECFC o usándolas como vehículo para la expresión de proteínas de interés en zonas dañadas.
- Mediante esta técnica ha sido posible la generación de líneas de ECFC, provenientes de sangre de adulto y de cordón umbilical, modificadas para expresar los péptidos proangiogénicos AM, PPAM y FGF2.
- El análisis *in vitro* de estas líneas indica que la introducción de FGF2 o PPAM mejora la expresión de factores proangiogénicos pero reduce la viabilidad a largo plazo.

Relativas al efecto de los inductores químicos de hipoxia:

- Se ha comprobado que los inductores químicos de hipoxia  $\text{CoCl}_2$ , DMOG y DFO ralentizan el crecimiento de las ECFC e inducen senescencia en las mismas.
- Los 3 inductores químicos de hipoxia causan un aumento de la expresión génica de VEGFA, AM, GLUT1 y una reducción de HIF1, KDR, FGF2 y NOS3 en las ECFC.
- El DMOG tiene un menor efecto perjudicial general sobre las ECFC en cultivo comparado al causado por  $\text{CoCl}_2$  o DFO. Esto permite emplear concentraciones superiores con un efecto más intenso sobre las células. No obstante, el DMOG requiere de DMSO como disolvente, el cual lleva asociado su propio efecto perjudicial en otras líneas.

Relativas al efecto de la hipoxia controlada ambientalmente sobre las ECFC:

- La hipoxia no tiene efecto significativo sobre las propiedades macroscópicas de las ECFC en condiciones habituales de cultivo celular. No aumenta el número de pases que puede alcanzar una línea celular, ni se modifica la proliferación en líneas de

cordón. Sin embargo, es posible que un ligero aumento de la proliferación tenga lugar en las líneas provenientes de adulto.

- La capacidad clonogénica se ve estimulada en hipoxia, que promueve la formación de colonias de mayor número de células.
- Una hipoxia severa del 1% de oxígeno en aire tiene efectos perjudiciales en el crecimiento general, y no es tan ventajosa para la capacidad clonogénica como un 3% o un 5% de oxígeno.
- En hipoxia existe un aumento en la expresión génica de VEGFA y GLUT1 acompañada de una reducción de HIF1, KDR y NOS3. Esto ocurre tanto en condiciones de cultivo habituales como clonogénicas, si bien la extensión del cambio varía según el gen, y también en ECFC tanto de adulto como de cordón.
- La hipoxia no protege de la senescencia celular, en todo caso, induce un aumento de la misma.
- Cuando se realizan pases sucesivos de cultivos en clonogenia las células que más divisiones han realizado reducen consecuentemente su ritmo de proliferación. Por lo tanto, la hipoxia no selecciona una subpoblación específica aún no descrita de las ECFC que pudiese tener una mayor capacidad clonogénica.
- La hipoxia acelera la maduración de las ECFC, esto causa un aumento en la expresión y secreción de factores proangiogénicos en las ECFC, incluyendo VEGFA y AM, con participación de HIF1 y HIF2, y acelera el cambio mencionado en los marcadores de superficie. Cambios cuya inducción podría ser de gran interés para maximizar efectos terapéuticos por parte de estas células.
- Estos factores, al acumularse en medio, juegan un papel crítico en la capacidad clonogénica de las ECFC en condiciones de hipoxia.





## 11 Bibliografía

Abaci, H.E., Truitt, R., Luong, E., Drazer, G., and Gerecht, S. (2010). Adaptation to oxygen deprivation in cultures of human pluripotent stem cells, endothelial progenitor cells, and umbilical vein endothelial cells. *AJP Cell Physiol.* 298, C1527–C1537.

Aird, W.C. (2007a). Phenotypic Heterogeneity of the Endothelium: I. Structure, Function, and Mechanisms. *Circ. Res.* 100, 158–173.

Aird, W.C. (2007b). Phenotypic Heterogeneity of the Endothelium: II. Representative Vascular Beds. *Circ. Res.* 100, 174–190.

Allen, J.W., and Bhatia, S.N. (2003). Formation of steady-state oxygen gradients in vitro: Application to liver zonation. *Biotechnol. Bioeng.* 82, 253–262.

Allen, C.B., Schneider, B.K., and White, C.W. (2001). Limitations to oxygen diffusion and equilibration in in vitro cell exposure systems in hyperoxia and hypoxia. *Am. J. Physiol.-Lung Cell. Mol. Physiol.* 281, L1021–L1027.

Alphonse, R.S., Vadivel, A., Zong, S., McConaghy, S., Ohls, R., Yoder, M.C., and Thébaud, B. (2015). The isolation and culture of endothelial colony-forming cells from human and rat lungs. *Nat. Protoc.* 10, 1697–1708.

Alvarado-Moreno, J.A., Hernandez-Lopez, R., Chavez-Gonzalez, A., Yoder, M.C., Rangel-Corona, R., Isordia-Salas, I., Hernandez-Juarez, J., Cerbulo-Vazquez, A., Gonzalez-Jimenez, M.A., and Majluf-Cruz, A. (2016). Endothelial colony-forming cells: Biological and functional abnormalities in patients with recurrent, unprovoked venous thromboembolic disease. *Thromb. Res.* 137, 157–168.

Arnaoutova, I., George, J., Kleinman, H.K., and Benton, G. (2009). The endothelial cell tube formation assay on basement membrane turns 20: state of the science and the art. *Angiogenesis* 12, 267–274.

Asahara, T., Murohara, T., Sullivan, A., Silver, M., van der Zee, R., Li, T., Witzenbichler, B., Schatteman, G., and Isner, J.M. (1997). Isolation of Putative Progenitor Endothelial Cells for Angiogenesis. *Science* 275, 964–966.

Asahara, T., Kawamoto, A., and Masuda, H. (2011). Concise Review: Circulating Endothelial Progenitor Cells for Vascular Medicine. *STEM CELLS* 29, 1650–1655.

d’Audigier, C., Gautier, B., Yon, A., Alili, J.-M., Guérin, C.L., Evrard, S.M., Godier, A., Haviari, S., Reille-Serroussi, M., Huguenot, F., et al. (2014). Targeting VEGFR1 on endothelial progenitors modulates their differentiation potential. *Angiogenesis* 17, 603–616.

- Avci-Adali, M., Nolte, A., Simon, P., Ziemer, G., and Wendel, H.P. (2009). Porcine EPCs downregulate stem cell markers and upregulate endothelial maturation markers during *in vitro* cultivation. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* 3, 512–520.
- Back, K., Islam, R., Johansson, G.S., Chisalita, S.I., and Arnqvist, H.J. (2012). Insulin and IGF1 receptors in human cardiac microvascular endothelial cells: metabolic, mitogenic and anti-inflammatory effects. *J. Endocrinol.* 215, 89–96.
- Badimón, L., and Martínez-González, J. (2006). Disfunción endotelial. *Rev. Esp. Cardiol.* 6, 21–30.
- Bakhashab, S., Lary, S., Ahmed, F., Schulten, H.-J., Bashir, A., Ahmed, F.W., Al-Malki, A.L., Jamal, H.S., Gari, M.A., and Weaver, J.U. (2014). Reference Genes for Expression Studies in Hypoxia and Hyperglycemia Models in Human Umbilical Vein Endothelial Cells. *G3amp58 GenesGenomesGenetics* 4, 2159–2165.
- Balaji, S., King, A., Crombleholme, T.M., and Keswani, S.G. (2013). The Role of Endothelial Progenitor Cells in Postnatal Vasculogenesis: Implications for Therapeutic Neovascularization and Wound Healing. *Adv. Wound Care* 2, 283–295.
- Basile, D.P., Zeng, P., Friedrich, J.L., Leonard, E.C., and Yoder, M.C. (2012). Low Proliferative Potential and Impaired Angiogenesis of Cultured Rat Kidney Endothelial Cells: Limited Growth Potential of Kidney Endothelial Cells. *Microcirculation* 19, 598–609.
- BAUM, J.P., MAURICE, D.M., and MCCAREY, B.E. The Active and Passive Transport of Water Across the Corneal Endothelium. 8.
- Bernatova, I. (2014). Endothelial Dysfunction in Experimental Models of Arterial Hypertension: Cause or Consequence? *BioMed Res. Int.* 2014, 1–14.
- Berra, E., Roux, D., Richard, D.E., and Pouyssegur, J. (2001). Hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) escapes O<sub>2</sub>-driven proteasomal degradation irrespective of its subcellular localization: nucleus or cytoplasm. *EMBO Rep.* 2, 615–620.
- Biasetti, J., Spazzini, P.G., Hedin, U., and Gasser, T.C. (2014). Synergy between shear-induced migration and secondary flows on red blood cells transport in arteries: considerations on oxygen transport. *J. R. Soc. Interface* 11, 20140403–20140403.
- Bitterli, L., Afan, S., Bühler, S., DiSanto, S., Zwahlen, M., Schmidlin, K., Yang, Z., Baumgartner, I., Diehm, N., and Kalka, C. (2015). Endothelial progenitor cells as a biological marker of peripheral artery disease. *Vasc. Med.* 1358863X15611225.
- Boedtkjer, E., Kim, S., and Aalkjaer, C. (2013). Endothelial alkalisation inhibits gap junction communication and endothelium-derived hyperpolarisations in mouse mesenteric arteries: Endothelial alkalisation inhibits intercellular communication. *J. Physiol.* 591, 1447–1461.

- Botham, C.M., Bennett, W.L., and Cooke, J.P. (2013). Clinical trials of adult stem cell therapy for peripheral artery disease. *Methodist DeBakey Cardiovasc. J.* 9, 201–205.
- Bou Khzam, L., Bouchereau, O., Boulahya, R., Hachem, A., Zaid, Y., Abou-Saleh, H., and Merhi, Y. (2015). Early outgrowth cells versus endothelial colony forming cells functions in platelet aggregation. *J. Transl. Med.* 13.
- Bowen, I.D. (1993). Apoptosis or programmed cell death? *Cell Biol. Int.* 17, 365–380.
- Burger, D., Viñas, J.L., Akbari, S., Dehak, H., Knoll, W., Gutsol, A., Touyz, R.M., Allan, D.S., and Burns, K.D. (2015). Human Endothelial Colony-Forming Cells Protect against Acute Kidney Injury: Role of Exosomes. *Am. J. Pathol.*
- Campioni, D., Zauli, G., Gambetti, S., Campo, G., Cuneo, A., Ferrari, R., and Secchiero, P. (2013). In Vitro Characterization of Circulating Endothelial Progenitor Cells Isolated from Patients with Acute Coronary Syndrome. *PLoS ONE* 8, e56377.
- Campisi, J. (2005). Senescent Cells, Tumor Suppression, and Organismal Aging: Good Citizens, Bad Neighbors. *Cell* 120, 513–522.
- Carlson, K.H., Bourne, W.M., McLaren, J.W., and Brubaker, R.F. (1988). Variations in human corneal endothelial cell morphology and permeability to fluorescein with age. *Exp. Eye Res.* 47, 27–41.
- Cavadas, M.A.S., Mesnieres, M., Crifo, B., Manresa, M.C., Selfridge, A.C., Scholz, C.C., Cummins, E.P., Cheong, A., and Taylor, C.T. (2016). REST mediates resolution of HIF-dependent gene expression in prolonged hypoxia. *Sci. Rep.* 5.
- Chamboredon, S., Ciais, D., Desroches-Castan, A., Savi, P., Bono, F., Feige, J.-J., and Cherradi, N. (2011). Hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  mRNA: a new target for destabilization by tristetraprolin in endothelial cells. *Mol. Biol. Cell* 22, 3366–3378.
- Chan, C.K., and Vanhoutte, P.M. (2013). Hypoxia, vascular smooth muscles and endothelium. *Acta Pharm. Sin. B* 3, 1–7.
- Chavakis, E. (2005). Role of 2-integrins for homing and neovascularization capacity of endothelial progenitor cells. *J. Exp. Med.* 201, 63–72.
- Chen, B., Longtine, M.S., and Nelson, D.M. (2013). Pericellular oxygen concentration of cultured primary human trophoblasts. *Placenta* 34, 106–109.
- Chen, J., Huang, X., Halicka, D., Brodsky, S., Avram, A., Eskander, J., Bloomgarden, N.A., Darzynkiewicz, Z., and Goligorsky, M.S. (2006). Contribution of p16<sup>INK4a</sup> and p21<sup>CIP1</sup> pathways to induction of premature senescence of human endothelial cells: permissive role of p53. *Am. J. Physiol.-Heart Circ. Physiol.* 290, H1575–H1586.

- Chen, T.-I., Chiu, H.-W., Pan, Y.-C., Hsu, S.-T., Lin, J.-H., and Yang, K.-T. (2014). Intermittent hypoxia-induced protein phosphatase 2A activation reduces PC12 cell proliferation and differentiation. *J. Biomed. Sci.* *21*, 46.
- Cheng, C.-C., Lo, H.-H., Huang, T.-S., Cheng, Y.-C., Chang, S.-T., Chang, S.-J., and Wang, H.-W. (2012). Genetic module and miRNome trait analyses reflect the distinct biological features of endothelial progenitor cells from different anatomic locations. *BMC Genomics* *13*, 447.
- Chevalier, F., Lavergne, M., Negroni, E., Ferratge, S., Carpentier, G., Gilbert-Sirieix, M., Siñeriz, F., Uzan, G., and Albanese, P. (2014). Glycosaminoglycan mimetic improves enrichment and cell functions of human endothelial progenitor cell colonies. *Stem Cell Res.* *12*, 703–715.
- Cipolleschi, M.G., Dello Sbarba, P., and Olivotto, M. (1993). The role of hypoxia in the maintenance of hematopoietic stem cells. *BLOOD-N. Y.* *82*, 2031–2031.
- Collet, G., Skrzypek, K., Grillon, C., Matejuk, A., El Hafni-Rahbi, B., Lamerant – Fayel, N., and Kieda, C. (2012). Hypoxia control to normalize pathologic angiogenesis: Potential role for endothelial precursor cells and miRNAs regulation. *Vascul. Pharmacol.* *56*, 252–261.
- Collet, G., Szade, K., Nowak, W., Klimkiewicz, K., El Hafny-Rahbi, B., Szczepanek, K., Sugiyama, D., Weglarczyk, K., Foucault-Collet, A., Guichard, A., et al. (2016). Endothelial precursor cell-based therapy to target the pathologic angiogenesis and compensate tumor hypoxia. *Cancer Lett.* *370*, 345–357.
- Conte, C., Riant, E., Toutain, C., Pujol, F., Arnal, J.-F., Lenfant, F., and Prats, A.-C. (2008). FGF2 Translationally Induced by Hypoxia Is Involved in Negative and Positive Feedback Loops with HIF-1 $\alpha$ . *PLoS ONE* *3*, e3078.
- Cooley, B.C. (2013). Collagen-induced thrombosis in murine arteries and veins. *Thromb. Res.* *131*, 49–54.
- Coppola, G., and Caro, C. (2008). Oxygen mass transfer in a model three-dimensional artery. *J. R. Soc. Interface* *5*, 1067–1075.
- Corselli, M. (2008). Clinical scale ex vivo expansion of cord blood-derived outgrowth endothelial progenitor cells is associated with high incidence of karyotype aberrations. *Exp. Hematol.* *36*, 340–349.
- Critser, P.J., Kreger, S.T., Voytik-Harbin, S.L., and Yoder, M.C. (2010). Collagen matrix physical properties modulate endothelial colony forming cell-derived vessels in vivo. *Microvasc. Res.* *80*, 23–30.

Dai, Z.-J., Gao, J., Ma, X.-B., Yan, K., Liu, X.-X., Kang, H.-F., Ji, Z.-Z., Guan, H.-T., and Wang, X.-J. (2012). Up-regulation of hypoxia inducible factor-1 $\alpha$  by cobalt chloride correlates with proliferation and apoptosis in PC-2 cells. *J Exp Clin Cancer Res* 31, 28.

Debacq-Chainiaux, F. (2009). Protocols to detect senescence-associated beta-galactosidase (SA-beta-gal) activity, a biomarker of senescent cells in culture and in vivo. *Nat Protoc.* 4, 1798–1806.

DiMaio, T.A., Wentz, B.L., and Lagunoff, M. (2016). Isolation and characterization of circulating lymphatic endothelial colony forming cells. *Exp. Cell Res.* 340, 159–169.

Dimri, G.P., Lee, X., Basile, G., Acosta, M., Scott, G., Roskelley, C., Medrano, E.E., Linskens, M., Rubelj, I., and Pereira-Smith, O. (1995). A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92, 9363–9367.

Dollé, L., Boulter, L., Leclercq, I.A., and van Grunsven, L.A. (2015). Next generation of ALDH substrates and their potential to study maturational lineage biology in stem and progenitor cells. *Am. J. Physiol. - Gastrointest. Liver Physiol.* 308, G573–G578.

Duong, H.T., Erzurum, S.C., and Asosingh, K. (2011). Pro-angiogenic hematopoietic progenitor cells and endothelial colony-forming cells in pathological angiogenesis of bronchial and pulmonary circulation. *Angiogenesis* 14, 411–422.

Eilken, H.M., and Adams, R.H. (2010). Dynamics of endothelial cell behavior in sprouting angiogenesis. *Curr. Opin. Cell Biol.* 22, 617–625.

Elicha Gussin, H.A., Bischoff, F.Z., Hoffman, R., and Elias, S. (2002). Endothelial Precursor Cells in the Peripheral Blood of Pregnant Women , Endothelial Precursor Cells in the Peripheral Blood of Pregnant Women. *J. Soc. Gynecol. Investig.* 9, 357–361.

Ellis, T.P., Choudhury, R.H., Kaul, K., Chopra, M., Kohner, E.M., and Chibber, J.M.T. and R. (2013). Diabetic Retinopathy and Atherosclerosis: is there a Link?

Elshabrawy, H.A., Chen, Z., Volin, M.V., Ravella, S., Virupannavar, S., and Shahrara, S. (2015). The pathogenic role of angiogenesis in rheumatoid arthritis. *Angiogenesis* 18, 433–448.

Estes, M.L., Mund, J.A., Ingram, D.A., and Case, J. (2010). Identification of endothelial cells and progenitor cell subsets in human peripheral blood. *Curr. Protoc. Cytom. Chapter* 9, Unit 9.33.1-11.

Fadini, G.P., Losordo, D., and Dimmeler, S. (2012). Critical Reevaluation of Endothelial Progenitor Cell Phenotypes for Therapeutic and Diagnostic Use. *Circ. Res.* 110, 624–637.

Fan, Y., Shen, F., Frenzel, T., Zhu, W., Ye, J., Liu, J., Chen, Y., Su, H., Young, W.L., and Yang, G.-Y. (2010). Endothelial progenitor cell transplantation improves long-term stroke outcome in mice. *Ann. Neurol.* 67, 488–497.

Fatyol, K., and Szalay, A.A. (2001). The p14<sup>ARF</sup> Tumor Suppressor Protein Facilitates Nucleolar Sequestration of Hypoxia-inducible Factor-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) and Inhibits HIF-1-mediated Transcription. *J. Biol. Chem.* 276, 28421–28429.

Fedosov, D.A., Caswell, B., Popel, A.S., and Karniadakis, G.E. (2010). Blood Flow and Cell-Free Layer in Microvessels: Blood Flow and Cell-Free Layer in Microvessels. *Microcirculation* 17, 615–628.

Fenyo, I.M., and Gafencu, A.V. (2013). The involvement of the monocytes/macrophages in chronic inflammation associated with atherosclerosis. *Immunobiology* 218, 1376–1384.

Fish, J.E., Yan, M.S., Matouk, C.C., St. Bernard, R., Ho, J.J.D., Gavryushova, A., Srivastava, D., and Marsden, P.A. (2010). Hypoxic Repression of Endothelial Nitric-oxide Synthase Transcription Is Coupled with Eviction of Promoter Histones. *J. Biol. Chem.* 285, 810–826.

Fleming, I. (2000). Myoendothelial Gap Junctions : The Gap Is There, but Does EDHF Go Through It? *Circ. Res.* 86, 249–250.

Foty, R. (2011). A Simple Hanging Drop Cell Culture Protocol for Generation of 3D Spheroids. *J. Vis. Exp.*

Fu, C., Li, B., Sun, Y., Ma, G., and Yao, Y. (2015). Bradykinin inhibits oxidative stress-induced senescence of endothelial progenitor cells through the B2R/AKT/RB and B2R/EGFR/RB signal pathways.

Gaffey, A.C., Chen, M.H., Venkataraman, C.M., Trubelja, A., Rodell, C.B., Dinh, P.V., Hung, G., MacArthur, J.W., Soopan, R.V., Burdick, J.A., et al. (2015). Injectable shear-thinning hydrogels used to deliver endothelial progenitor cells, enhance cell engraftment, and improve ischemic myocardium. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*

George, A.L., Bangalore-Prakash, P., Rajoria, S., Suriano, R., Shanmugam, A., Mittelman, A., and Tiwari, R.K. (2011). Endothelial progenitor cell biology in disease and tissue regeneration. *J Hematol Oncol* 4, 24–31.

Goldstein, L.J., Gallagher, K.A., Bauer, S.M., Bauer, R.J., Baireddy, V., Liu, Z.-J., Buerk, D.G., Thom, S.R., and Velazquez, O.C. (2006). Endothelial Progenitor Cell Release into Circulation Is Triggered by Hyperoxia-Induced Increases in Bone Marrow Nitric Oxide. *Stem Cells* 24, 2309–2318.

Golub, A.S., and Pittman, R.N. (2013). Bang-Bang Model for Regulation of Local Blood Flow. *Microcirculation* 20, 455–483.

- Gorlach, A. (2009). Regulation of HIF-1 $\alpha$  at the transcriptional level. *Curr. Pharm. Des.* *15*, 3844–3852.
- Goto, K., Takemura, G., Takahashi, T., Okada, H., Kanamori, H., Kawamura, I., Watanabe, T., Morishita, K., Tsujimoto, A., Miyazaki, N., et al. (2016). Intravenous Administration of Endothelial Colony-Forming Cells Overexpressing Integrin  $\beta_1$  Augments Angiogenesis in Ischemic Legs: Targeted Cell Therapy to Ischemic Legs. *STEM CELLS Transl. Med.* *5*, 218–226.
- Green, L.A., Njoku, V., Mund, J., Case, J., Yoder, M., Murphy, M.P., and Clauss, M. (2016). Endogenous Transmembrane TNF-Alpha Protects Against Premature Senescence in Endothelial Colony Forming Cells Novelty and Significance. *Circ. Res.* *118*, 1512–1524.
- Guerin, C.L., Loyer, X., Vilar, J., Cras, A., Mirault, T., Gaussem, P., Silvestre, J.-S., and Smadja, D.M. (2015). Bone-marrow-derived very small embryonic-like stem cells in patients with critical leg ischaemia: evidence of vasculogenic potential. *Thromb. Haemost.* *113*.
- Guillevic, O., Ferratge, S., Pascaud, J., Driancourt, C., Boyer-Di-Ponio, J., and Uzan, G. (2016). A Novel Molecular and Functional Stemness Signature Assessing Human Cord Blood-Derived Endothelial Progenitor Cell Immaturity. *PLOS ONE* *11*, e0152993.
- Guo, M., Song, L.-P., Jiang, Y., Liu, W., Yu, Y., and Chen, G.-Q. (2006). Hypoxia-mimetic agents desferrioxamine and cobalt chloride induce leukemic cell apoptosis through different hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  independent mechanisms. *Apoptosis* *11*, 67–77.
- Guo, S., Messmer-Blust, A., Wu, J., Song, X., Philbrick, M., Shie, J.-L., Rana, J., and Li, J. (2014). Role of A20 in cIAP-2 Protection against Tumor Necrosis Factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )-Mediated Apoptosis in Endothelial Cells. *Int. J. Mol. Sci.* *15*, 3816–3833.
- Guzy, R.D., and Schumacker, P.T. (2006). Oxygen sensing by mitochondria at complex III: the paradox of increased reactive oxygen species during hypoxia. *Exp. Physiol.* *91*, 807–819.
- Harrison, J.S., Rameshwar, P., Chang, V., and Bandari, P. (2002). To the Editor: Oxygen saturation in the bone marrow of healthy volunteers.
- Hirschi, K.K., Ingram, D.A., and Yoder, M.C. (2008). Assessing Identity, Phenotype, and Fate of Endothelial Progenitor Cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *28*, 1584–1595.
- Hofmann, N.A., Reinisch, A., and Strunk, D. (2009). Isolation and Large Scale Expansion of Adult Human Endothelial Colony Forming Progenitor Cells. *J. Vis. Exp.*



Holthöfer, H., Virtanen, I., Kariniemi, A.L., Hormia, M., Linder, E., and Miettinen, A. (1982). Ulex europaeus I lectin as a marker for vascular endothelium in human tissues. *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* *47*, 60–66.

Hookham, M.B., Ali, I.H.A., O'Neill, C.L., Hackett, E., Lambe, M.H., Schmidt, T., Medina, R.J., Chamney, S., Rao, B., McLoone, E., et al. (2016). Hypoxia-induced responses by endothelial colony-forming cells are modulated by placental growth factor. *Stem Cell Res. Ther.* *7*.

Horak, P., Crawford, A.R., Vadysirisack, D.D., Nash, Z.M., DeYoung, M.P., Sgroi, D., and Ellisen, L.W. (2010). Negative feedback control of HIF-1 through REDD1-regulated ROS suppresses tumorigenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *107*, 4675–4680.

Hou, Y., Wu, Y., Farooq, S.M., Guan, X., Wang, S., Liu, Y., Oblak, J.J., Holcomb, J., Jiang, Y., Strieter, R.M., et al. (2015). A critical role of CXCR2 PDZ-mediated interactions in endothelial progenitor cell homing and angiogenesis. *Stem Cell Res.* *14*, 133–143.

Huang, W.-H., Chen, H.-L., Huang, P.-H., Yew, T.-L., Lin, M.-W., Lin, S.-J., and Hung, S.-C. (2014). Hypoxic mesenchymal stem cells engraft and ameliorate limb ischaemia in allogeneic recipients. *Cardiovasc. Res.* *101*, 266–276.

Huang, Z., Miao, X., Patarroyo, M., Nilsson, G.P., Pernow, J., and Li, N. (2016). Tetraspanin CD151 and integrin  $\alpha 6\beta 1$  mediate platelet-enhanced endothelial colony forming cell angiogenesis. *J. Thromb. Haemost.* *14*, 606–618.

Imanirad, P., Solaimani Kartalaei, P., Crisan, M., Vink, C., Yamada-Inagawa, T., de Pater, E., Kurek, D., Kaimakis, P., van der Linden, R., Speck, N., et al. (2014). HIF1 $\alpha$  is a regulator of hematopoietic progenitor and stem cell development in hypoxic sites of the mouse embryo. *Stem Cell Res.* *12*, 24–35.

Ingram, D.A. (2004). Identification of a novel hierarchy of endothelial progenitor cells using human peripheral and umbilical cord blood. *Blood* *104*, 2752–2760.

Ivanovic, Z. (2009). Hypoxia or in situ normoxia: The stem cell paradigm. *J. Cell. Physiol.* *219*, 271–275.

Iwasaki, K., Miwa, Y., Uchida, K., Kodera, Y., and Kobayashi, T. (2017). Negative regulation of HLA-DR expression on endothelial cells by anti-blood group A/B antibody ligation and mTOR inhibition. *Transpl. Immunol.* *40*, 22–30.

Janaszak-Jasiecka, A., Siekierzycka, A., Bartoszewska, S., Serocki, M., Dobrucki, L.W., Collawn, J.F., Kalinowski, L., and Bartoszewski, R. (2018). eNOS expression and NO release during hypoxia is inhibited by miR-200b in human endothelial cells. *Angiogenesis*.

Javed, M.J., Mead, L.E., Prater, D., Bessler, W.K., Foster, D., Case, J., Goebel, W.S., Yoder, M.C., Haneline, L.S., and Ingram, D.A. (2008). Endothelial colony forming cells and mesenchymal stem cells are enriched at different gestational ages in human umbilical cord blood. *Pediatr. Res.* *64*, 68–73.

Johnson, L.K., and Longenecker, J.P. (1982). Senescence of aortic endothelial cells in vitro: influence of culture conditions and preliminary characterization of the senescent phenotype. *Mech. Ageing Dev.* *18*, 1–18.

Kang, K.-T., Lin, R.-Z., Kuppermann, D., Melero-Martin, J.M., and Bischoff, J. (2017). Endothelial colony forming cells and mesenchymal progenitor cells form blood vessels and increase blood flow in ischemic muscle. *Sci. Rep.* *7*.

Kang, S., Park, H.S., Jo, A., Hong, S.H., Lee, H.N., Lee, Y.Y., Park, J.S., Jung, H.S., Chung, S.S., and Park, K.S. (2012). Endothelial Progenitor Cell Cotransplantation Enhances Islet Engraftment by Rapid Revascularization. *Diabetes* *61*, 866–876.

Kawakami, Y., Ii, M., Matsumoto, T., Kuroda, R., Kuroda, T., Kwon, S.-M., Kawamoto, A., Akimaru, H., Mifune, Y., Shoji, T., et al. (2015). SDF-1/CXCR4 Axis in Tie2-Lineage Cells Including Endothelial Progenitor Cells Contributes to Bone Fracture Healing: SDF-1/CXCR4 AXIS AND BONE FRACTURE HEALING. *J. Bone Miner. Res.* *30*, 95–105.

Kawamoto, A., Gwon, H.-C., Iwaguro, H., Yamaguchi, J.-I., Uchida, S., Masuda, H., Silver, M., Ma, H., Kearney, M., Isner, J.M., et al. (2001). Therapeutic potential of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for myocardial ischemia. *Circulation* *103*, 634–637.

Ke, Q., and Costa, M. (2006). Hypoxia-Inducible Factor-1 (HIF-1). *Mol. Pharmacol.* *70*, 1469–1480.

Kicic, A., Chua, A.C.G., and Baker, E. (2002). Desferrithiocin is a more potent antineoplastic agent than desferrioxamine. *Br. J. Pharmacol.* *135*, 1393–1402.

Kieninger, J., Aravindalochanan, K., Sandvik, J.A., Pettersen, E.O., and Urban, G.A. (2014). Pericellular oxygen monitoring with integrated sensor chips for reproducible cell culture experiments. *Cell Prolif.* *47*, 180–188.

Koh, M.Y., and Powis, G. (2012). Passing the baton: the HIF switch. *Trends Biochem. Sci.* *37*, 364–372.

Kolka, C.M., and Bergman, R.N. (2013). The endothelium in diabetes: Its role in insulin access and diabetic complications. *Rev. Endocr. Metab. Disord.* *14*, 13–19.

Korybalska, K., Kawka, E., Kusch, A., Aregger, F., Dragun, D., Jorres, A., Breborowicz, A., and Witowski, J. (2013). Recovery of Senescent Endothelial Cells From Injury. *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.* *68*, 250–257.

Koulaouzidis, G., Jenkins, P., and McArthur, T. (2014). Incidence of subclinical atherosclerosis as assessed with electron beam CT in adults  $\leq 45$  years old. *Eur. J. Prev. Cardiol.* *21*, 1365–1366.

Krouwer, V.J.D., Hekking, L.H.P., Langelaar-Makkinje, M., Regan-Klapisz, E., and Post, J. (2012). Endothelial cell senescence is associated with disrupted cell-cell junctions and increased monolayer permeability. *Vasc. Cell* *4*, 12.

Krüger-Genge, A., Fuhrmann, R., Jung, F., and Franke, R.P. (2015). Morphology of primary human venous endothelial cell cultures before and after culture medium exchange. *Clin. Hemorheol. Microcirc.* *61*, 151–156.

Kuo, K.-C., Lin, R.-Z., Tien, H.-W., Wu, P.-Y., Li, Y.-C., Melero-Martin, J.M., and Chen, Y.-C. (2015). Bioengineering vascularized tissue constructs using an injectable cell-laden enzymatically crosslinked collagen hydrogel derived from dermal extracellular matrix. *Acta Biomater.*

Langer, H. (2006). Adherent Platelets Recruit and Induce Differentiation of Murine Embryonic Endothelial Progenitor Cells to Mature Endothelial Cells In Vitro. *Circ. Res.* *98*, e2–e10.

Laschke, M.W., and Menger, M.D. (2017). Spheroids as vascularization units: From angiogenesis research to tissue engineering applications. *Biotechnol. Adv.* *35*, 782–791.

Lee, H., and Park, J.-B. (2017). Evaluation of the effects of dimethylsulphoxide on morphology, cellular viability, mRNA, and protein expression of stem cells culture in growth media. *Biomed. Rep.* *7*, 291–296.

Lee, S.H., Lee, J.H., Yoo, S.Y., Hur, J., Kim, H.-S., and Kwon, S.M. (2013). Hypoxia Inhibits Cellular Senescence to Restore the Therapeutic Potential of Old Human Endothelial Progenitor Cells via the Hypoxia-Inducible Factor-1 $\alpha$ -TWIST-p21 Axis Significance. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *33*, 2407–2414.

Lee, S.H., Lee, J.H., Asahara, T., Kim, Y.S., Jeong, H.C., Ahn, Y., Jung, J.S., and Kwon, S.-M. (2014). Genistein Promotes Endothelial Colony-Forming Cell (ECFC) Bioactivities and Cardiac Regeneration in Myocardial Infarction. *PLoS ONE* *9*, e96155.

Lee, S.H., Lee, J.H., Han, Y.-S., Ryu, J.M., Yoon, Y.M., and Han, H.J. (2015). Hypoxia accelerates vascular repair of endothelial colony-forming cells on ischemic injury via STAT3-BCL3 axis. *Stem Cell Res. Ther.* *6*.

Leung, D.W., Cachianes, G., Kuang, W.J., Goeddel, D.V., and Ferrara, N. (1989). Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science* *246*, 1306–1309.

Lewis, D.M., Abaci, H.E., Xu, Y., and Gerecht, S. (2015). Endothelial progenitor cell recruitment in a microfluidic vascular model. *Biofabrication* *7*, 045010.

- Li, A., Cheng, X.J., Moro, A., Singh, R.K., Hines, O.J., and Eibl, G. (2011). CXCR2-Dependent Endothelial Progenitor Cell Mobilization in Pancreatic Cancer Growth. *Transl. Oncol.* 4, 20–28.
- Lin, Y., Weisdorf, D.J., Solovey, A., and Hebbel, R.P. (2000). Origins of circulating endothelial cells and endothelial outgrowth from blood. *J. Clin. Invest.* 105, 71.
- Liu, W., Shen, S.-M., Zhao, X.-Y., and Chen, G.-Q. (2012). Targeted genes and interacting proteins of hypoxia inducible factor-1. *Int. J. Biochem. Mol. Biol.* 3, 165.
- Lozano-Gerona, J., and García-Otín, Á.-L. (2018). ImageJ-based semiautomatic method to analyze senescence in cell culture. *Anal. Biochem.* 543, 30–32.
- Luo, J., Qiao, F., and Yin, X. (2011). Hypoxia Induces FGF2 Production by Vascular Endothelial Cells and Alters MMP9 and TIMP1 Expression in Extravillous Trophoblasts and Their Invasiveness in a Cocultured Model. *J. Reprod. Dev.* 57, 84–91.
- Mahey, S., Kumar, R., Arora, R., Mahajan, J., Arora, S., Bhardwaj, R., and Thukral, A.K. (2016). Effect of cobalt(II) chloride hexahydrate on some human cancer cell lines. SpringerPlus 5.
- Mathew John, C., Khaddaj Mallat, R., George, G., Kim, T., Mishra, R.C., and Braun, A.P. (2018). Pharmacologic targeting of endothelial Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels: A strategy to improve cardiovascular function. *Channels* 12, 126–136.
- Matthaei, M., Meng, H., Meeker, A.K., Eberhart, C.G., and Jun, A.S. (2012). Endothelial *Cdkn1a* ( *p21* ) Overexpression and Accelerated Senescence in a Mouse Model of Fuchs Endothelial Corneal Dystrophy. *Investig. Ophthalmology Vis. Sci.* 53, 6718.
- Mazzucchelli, I., Lisini, D., Garofoli, F., Dragoni, S., Angelini, M., Pozzi, M., Bonetti, E., Tziolla, C., Kramer, B.W., Spinillo, A., et al. (2015). Expression and function of toll-like receptors in human circulating endothelial colony forming cells. *Immunol. Lett.* 168, 98–104.
- McCartney, C.E., McClafferty, H., Huibant, J.-M., Rowan, E.G., Shipston, M.J., and Rowe, I.C. (2005). A cysteine-rich motif confers hypoxia sensitivity to mammalian large conductance voltage- and Ca-activated K (BK) channel  $\alpha$ -subunits. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 17870–17876.
- McGregor, F., Muntoni, A., and Fleming, J. (2002). Molecular Changes Associated with Oral Dysplasia Progression and Acquisition of Immortality : Potential for Its Reversal by 5-Azacytidine. 12.
- McMahon, S., Charbonneau, M., Grandmont, S., Richard, D.E., and Dubois, C.M. (2006). Transforming Growth Factor  $\beta$ 1 Induces Hypoxia-inducible Factor-1 Stabilization through Selective Inhibition of PHD2 Expression. *J. Biol. Chem.* 281, 24171–24181.

- Mead, L.E., Prater, D., Yoder, M.C., and Ingram, D.A. (2008). Isolation and Characterization of Endothelial Progenitor Cells from Human Blood. In *Current Protocols in Stem Cell Biology*, M. Bhatia, A.G. Elefanty, S.J. Fisher, R. Patient, T. Schlaeger, and E.Y. Snyder, eds. (Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.), p.
- Metzen, E., Wolff, M., Fandrey, J., and Jelkmann, W. (1995). Pericellular  $P_{O_2}$  and  $O_2$  consumption in monolayer cell cultures. *Respir. Physiol.* *100*, 101–106.
- Michel, C.C., Nanjee, M.N., Olszewski, W.L., and Miller, N.E. (2015). LDL and HDL transfer rates across peripheral microvascular endothelium agree with those predicted for passive ultrafiltration in humans. *J. Lipid Res.* *56*, 122–128.
- Michiels, C., Arnould, T., and Remacle, J. (2000). Endothelial cell responses to hypoxia: initiation of a cascade of cellular interactions. *Biochim. Biophys. Acta BBA-Mol. Cell Res.* *1497*, 1–10.
- Minami, Y., Nakajima, T., Ikutomi, M., Morita, T., Komuro, I., Sata, M., and Sahara, M. (2015). Angiogenic potential of early and late outgrowth endothelial progenitor cells is dependent on the time of emergence. *Int. J. Cardiol.* *186*, 305–314.
- Minet, E., Ernest, I., Michel, G., Roland, I., Remacle, J., Raes, M., and Michiels, C. (1999). HIF1A Gene Transcription Is Dependent on a Core Promoter Sequence Encompassing Activating and Inhibiting Sequences Located Upstream from the Transcription Initiation Site and cis Elements Located within the 5'UTR. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *261*, 534–540.
- Möbius-Winkler, S., Höllriegel, R., Schuler, G., and Adams, V. (2009). Endothelial progenitor cells: Implications for cardiovascular disease. *Cytometry A* *75A*, 25–37.
- Molin, K., Fredman, P., and Svennerholm, L. (1986). Binding specificities of the lectins PNA, WGA and UEA I to polyvinylchloride-adsorbed glycosphingolipids. *FEBS Lett.* *205*, 51–55.
- Moreb, J.S. (2008). Aldehyde dehydrogenase as a marker for stem cells. *Curr. Stem Cell Res. Ther.* *3*, 237–246.
- Mund, J.A., Estes, M.L., Yoder, M.C., Ingram, D.A., and Case, J. (2012). Flow Cytometric Identification and Functional Characterization of Immature and Mature Circulating Endothelial Cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *32*, 1045–1053.
- Murayama, T., Tepper, O.M., Silver, M., Ma, H., Losordo, D.W., Isner, J.M., Asahara, T., and Kalka, C. (2002). Determination of bone marrow-derived endothelial progenitor cell significance in angiogenic growth factor-induced neovascularization in vivo. *Exp. Hematol.* *30*, 967–972.

Musilli, C., Paccosi, S., Graziani, G., Caporale, R., Gelli, A.M.G., and Parenti, A. (2015). Endothelial Soluble Factors Mediate Differentiation of Circulating Endothelial Precursors. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* *66*, 223–227.

Nácher, M., and Serrano-Mollar, A. Nuevos aspectos patogénicos en el síndrome de apneas e hipopneas durante el sueño (SAHS). *8*.

Nakayama, M., Takahashi, K., Murakami, O., Shirato, K., and Shibahara, S. (1999). Induction of adrenomedullin by hypoxia in cultured human coronary artery endothelial cells. *Peptides* *20*, 769–772.

Newby, D., Marks, L., and Lyall, F. (2005). Dissolved oxygen concentration in culture medium: assumptions and pitfalls. *Placenta* *26*, 353–357.

Nichols, G.A., Schroeder, E.B., Karter, A.J., Gregg, E.W., Desai, J., Lawrence, J.M., O'Connor, P.J., Xu, S., Newton, K.M., Raebel, M.A., et al. (2015). Trends in Diabetes Incidence Among 7 Million Insured Adults, 2006–2011. *Am. J. Epidemiol.* *181*, 32–39.

Nielsen, J.S., and McNagny, K.M. (2008). Novel functions of the CD34 family. *J. Cell Sci.* *121*, 4145–4145.

Nijmeh, H., Balasubramaniam, V., Burns, N., Ahmad, A., Stenmark, K.R., and Gerasimovskaya, E.V. (2014). High proliferative potential endothelial colony-forming cells contribute to hypoxia-induced pulmonary artery vasa vasorum neovascularization. *AJP Lung Cell. Mol. Physiol.* *306*, L661–L671.

Ohtani, K., Vlachojannis, G.J., Koyanagi, M., Boeckel, J.-N., Urbich, C., Farcas, R., Bonig, H., Marquez, V.E., Zeiher, A.M., and Dimmeler, S. (2011). Epigenetic Regulation of Endothelial Lineage Committed Genes in Pro-Angiogenic Hematopoietic and Endothelial Progenitor Cells. *Circ. Res.* *109*, 1219–1229.

Ortiz-Barahona, A., Villar, D., Pescador, N., Amigo, J., and del Peso, L. (2010). Genome-wide identification of hypoxia-inducible factor binding sites and target genes by a probabilistic model integrating transcription-profiling data and in silico binding site prediction. *Nucleic Acids Res.* *38*, 2332–2345.

Ott, I. (2005). Endothelial-like cells expanded from CD34+ blood cells improve left ventricular function after experimental myocardial infarction. *FASEB J.*

Pampaloni, F., Reynaud, E.G., and Stelzer, E.H.K. (2007). The third dimension bridges the gap between cell culture and live tissue. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *8*, 839–845.

Patel, J., Wong, H.Y., Wang, W., Alexis, J., Shafiee, A., Stevenson, A.J., Gabrielli, B., Fisk, N.M., and Khosrotehrani, K. (2016). Self-Renewal and High Proliferative Colony Forming Capacity of Late-Outgrowth Endothelial Progenitors Is Regulated by Cyclin-Dependent Kinase Inhibitors Driven by Notch Signaling: Endothelial Progenitor Quiescence. *STEM CELLS* *34*, 902–912.

- dela Paz, N.G., and D'Amore, P.A. (2009). Arterial versus venous endothelial cells. *Cell Tissue Res.* 335, 5–16.
- Pesce, M. (2003). Myoendothelial Differentiation of Human Umbilical Cord Blood-Derived Stem Cells in Ischemic Limb Tissues. *Circ. Res.* 93, 51e – 62.
- Pettersen, E.O., Larsen, L.H., Ramsing, N.B., and Ebbesen, P. (2005). Pericellular oxygen depletion during ordinary tissue culturing, measured with oxygen microsensors. *Cell Prolif.* 38, 257–267.
- Pittman, R.N. (2011). Oxygen gradients in the microcirculation: Oxygen gradients in microvessels. *Acta Physiol.* 202, 311–322.
- Premer, C., Blum, A., Bellio, M.A., Schulman, I.H., Hurwitz, B.E., Parker, M., Dermarkarian, C.R., DiFede, D.L., Balkan, W., Khan, A., et al. (2015). Allogeneic Mesenchymal Stem Cells Restore Endothelial Function in Heart Failure by Stimulating Endothelial Progenitor Cells. *EBioMedicine* 2, 467–475.
- Prieto, D., and Sanchez, C.C. and A. (2014). Endothelial Dysfunction, Obesity and Insulin Resistance.
- Prisco, A.R., Prisco, M.R., Carlson, B.E., and Greene, A.S. (2014). TNF Increases Endothelial Progenitor Cell Adhesion to the Endothelium by Increasing Bond Expression and Affinity. *AJP Heart Circ. Physiol.*
- Rajendran, P., Rengarajan, T., Thangavel, J., Nishigaki, Y., Sakthisekaran, D., Sethi, G., and Nishigaki, I. (2013). The Vascular Endothelium and Human Diseases. *Int. J. Biol. Sci.* 9, 1057–1069.
- Rayess, H., Wang, M.B., and Srivatsan, E.S. (2012). Cellular senescence and tumor suppressor gene p16. *Int. J. Cancer* 130, 1715–1725.
- Rehman, J., Li, J., Parvathaneni, L., Karlsson, G., Panchal, V.R., Temm, C.J., Mahenthiran, J., and March, K.L. (2004). Exercise acutely increases circulating endothelial progenitor cells and monocyte-/macrophage-derived angiogenic cells. *J. Am. Coll. Cardiol.* 43, 2314–2318.
- Reinisch, A., Hofmann, N.A., Obenauf, A.C., Kashofer, K., Rohde, E., Schallmoser, K., Flicker, K., Lanzer, G., Linkesch, W., Speicher, M.R., et al. (2009). Humanized large-scale expanded endothelial colony-forming cells function in vitro and in vivo. *Blood* 113, 6716–6725.
- Ribatti, D. (2007). The discovery of endothelial progenitor cells. *Leuk. Res.* 31, 439–444.
- Ribatti, D., Nico, B., Vacca, A., Roncali, L., and Dammacco, F. Endothelial Cell Heterogeneity and Organ Specificity. 10.

- Rookmaaker, M.B., Verhaar, M.C., de Boer, H.C., Goldschmeding, R., Joles, J.A., Koomans, H.A., Grone, H.-J., and Rabelink, T.J. (2007). Met-RANTES reduces endothelial progenitor cell homing to activated (glomerular) endothelium in vitro and in vivo. *AJP Ren. Physiol.* 293, F624–F630.
- Rosová, I., Dao, M., Capoccia, B., Link, D., and Nolte, J.A. (2008). Hypoxic Preconditioning Results in Increased Motility and Improved Therapeutic Potential of Human Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells* 26, 2173–2182.
- Royo-Bordonada, M.Á., Armario, P., Bejarano, J.M.L., and Pedro, J. (2016). ADAPTACIÓN ESPAÑOLA DE LAS GUÍAS EUROPEAS DE 2016 SOBRE PREVENCIÓN DE LA ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR EN LA PRÁCTICA CLÍNICA. *Rev Esp Salud Pública* 90, 24.
- Ruijter, J.M., Ramakers, C., Hoogaars, W.M.H., Karlen, Y., Bakker, O., van den Hoff, M.J.B., and Moorman, A.F.M. (2009). Amplification efficiency: linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data. *Nucleic Acids Res.* 37, e45–e45.
- SAILA, O. MINISTERIO DE SANIDAD Y CONSUMO. 181.
- Salter, M.M. Culture and Characterization of Endothelial Colony Forming Cells from Peripheral Blood, Bone Marrow, and Umbilical Cord Blood of Horses. 94.
- Sato, H., Oyanagi, J., Komiya, E., Ogawa, T., Higashi, S., and Miyazaki, K. (2014). Amino-terminal fragments of laminin  $\gamma$ 2 chain retract vascular endothelial cells and increase vascular permeability. *Cancer Sci.* 105, 168–175.
- Schneider, C.A., Rasband, W.S., and Eliceiri, K.W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Meth* 9, 671–675.
- Schwartz, S.M., and Benditt, E.P. (1976). Clustering of replicating cells in aortic endothelium. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 73, 651–653.
- Sender, R., Fuchs, S., and Milo, R. (2016). Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body. *PLOS Biol.* 14.
- Senoune, S.R., Arutunyan, A., del Rosario, C., Castro-Marin, R., Hussain, F., and Martinez-Zaguilan, R. (2014). V-ATPase regulates communication between microvascular endothelial cells and metastatic cells. *Cell. Mol. Biol. Noisy--Gd. Fr.* 60, 19–25.
- Severino, J., Allen, R.G., Balin, S., Balin, A., and Cristofalo, V.J. (2000). Is  $\beta$ -Galactosidase Staining a Marker of Senescence in Vitro and in Vivo? *Exp. Cell Res.* 257, 162–171.



Shah, S., and Kang, K.-T. (2018). Two-Cell Spheroid Angiogenesis Assay System Using Both Endothelial Colony Forming Cells and Mesenchymal Stem Cells. *Biomol. Ther.* 26, 474–480.

Siddiq, A., Aminova, L.R., Troy, C.M., Suh, K., Messer, Z., Semenza, G.L., and Ratan, R.R. (2009). Selective inhibition of hypoxia-inducible factor prolyl-hydroxylase 1 mediates neuroprotection against normoxic oxidative death via HIF and CREB independent pathways. *J. Neurosci.* 29, 8828–8838.

Sieveking, D.P., Buckle, A., Celermajer, D.S., and Ng, M.K.C. (2008). Strikingly Different Angiogenic Properties of Endothelial Progenitor Cell Subpopulations. *J. Am. Coll. Cardiol.* 51, 660–668.

Simonsen, L.O., Harbak, H., and Bennekou, P. (2012). Cobalt metabolism and toxicology—A brief update. *Sci. Total Environ.* 432, 210–215.

Skagius, E., Siegbahn, A., Bergqvist, D., and Henriksson, A. (2008). Activated Coagulation in Patients with Shock due to Ruptured Abdominal Aortic Aneurysm. *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.* 35, 37–40.

Smadja, D.M., Bièche, I., Helley, D., Laurendeau, I., Simonin, G., Muller, L., Aiach, M., and Gaussem, P. (2007). Increased VEGFR2 expression during human late endothelial progenitor cells expansion enhances in vitro angiogenesis with up-regulation of integrin  $\alpha_6$ . *J. Cell. Mol. Med.* 11, 1149–1161.

Smadja, D.M., d’Audigier, C., Bieche, I., Evrard, S., Mauge, L., Dias, J.-V., Labreuche, J., Laurendeau, I., Marsac, B., Dizier, B., et al. (2011). Thrombospondin-1 Is a Plasmatic Marker of Peripheral Arterial Disease That Modulates Endothelial Progenitor Cell Angiogenic Properties. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 31, 551–559.

Smadja, D.M., Duong-van-Huyen, J.-P., Dal Cortivo, L., Blanchard, A., Bruneval, P., Emmerich, J., and Gaussem, P. (2012). Early endothelial progenitor cells in bone marrow are a biomarker of cell therapy success in patients with critical limb ischemia. *Cytotherapy* 14, 232–239.

Solomon, I., O’Reilly, M., Ionescu, L., Alphonse, R.S., Rajabali, S., Zhong, S., Vadivel, A., Shelley, W.C., Yoder, M.C., and Thébaud, B. (2016). Functional Differences Between Placental Micro- and Macrovascular Endothelial Colony-Forming Cells: Endothelial Progenitor Cells in Placenta. *STEM CELLS Transl. Med.* 5, 291–300.

Spadaro, M., Montone, M., and Cavallo, F. (2014). Generation and Maturation of Human Monocyte-derived DCs. *BIO-Protoc.* 4.

Spencer, J.A., Ferraro, F., Roussakis, E., Klein, A., Wu, J., Runnels, J.M., Zaher, W., Mortensen, L.J., Alt, C., Turcotte, R., et al. (2014). Direct measurement of local oxygen concentration in the bone marrow of live animals. *Nature* 508, 269–273.

Stroncek, J.D., Grant, B.S., Brown, M.A., Povsic, T.J., Truskey, G.A., and Reichert, W.M. (2009). Comparison of endothelial cell phenotypic markers of late-outgrowth endothelial progenitor cells isolated from patients with coronary artery disease and healthy volunteers. *Tissue Eng. Part A* *15*, 3473–3486.

Stücker, M., Struk, A., Altmeyer, P., Herde, M., Baumgärtl, H., and Lübbbers, D.W. (2002). The cutaneous uptake of atmospheric oxygen contributes significantly to the oxygen supply of human dermis and epidermis. *J. Physiol.* *538*, 985–994.

Sturtzel, C., Lipnik, K., Hofer-Warbinek, R., Testori, J., Ebner, B., Seigner, J., Qiu, P., Bilban, M., Jandrositz, A., Preisegger, K.-H., et al. (2018). FOXF1 Mediates Endothelial Progenitor Functions and Regulates Vascular Sprouting. *Front. Bioeng. Biotechnol.* *6*.

Subczynski, W.K., Hopwood, L.E., and Hyde, J.S. (1992). Is the mammalian cell plasma membrane a barrier to oxygen transport? *J. Gen. Physiol.* *100*, 69–87.

Suh, W., Kim, K.L., Kim, J.-M., Shin, I.-S., Lee, Y.-S., Lee, J.-Y., Jang, H.-S., Lee, J.-S., Byun, J., Choi, J.-H., et al. (2005). Transplantation of Endothelial Progenitor Cells Accelerates Dermal Wound Healing with Increased Recruitment of Monocytes/Macrophages and Neovascularization. *Stem Cells* *23*, 1571–1578.

Tadokoro, H., Umezu, T., Ohyashiki, K., Hirano, T., and Ohyashiki, J.H. (2013). Exosomes Derived from Hypoxic Leukemia Cells Enhance Tube Formation in Endothelial Cells. *J. Biol. Chem.* *288*, 34343–34351.

Tasev, D., van Wijhe, M.H., Weijers, E.M., van Hinsbergh, V.W.M., and Koolwijk, P. (2015). Long-Term Expansion in Platelet Lysate Increases Growth of Peripheral Blood-Derived Endothelial-Colony Forming Cells and Their Growth Factor-Induced Sprouting Capacity. *PLOS ONE* *10*, e0129935.

Tasev, D., Konijnenberg, L.S.F., Amado-Azevedo, J., van Wijhe, M.H., Koolwijk, P., and van Hinsbergh, V.W.M. (2016). CD34 expression modulates tube-forming capacity and barrier properties of peripheral blood-derived endothelial colony-forming cells (ECFCs). *Angiogenesis* *19*, 325–338.

Tateishi-Yuyama, E., Matsubara, H., Murohara, T., Ikeda, U., Shintani, S., Masaki, H., Amano, K., Kishimoto, Y., Yoshimoto, K., Akashi, H., et al. (2002). Therapeutic angiogenesis for patients with limb ischaemia by autologous transplantation of bone-marrow cells: a pilot study and a randomised controlled trial. *The Lancet* *360*, 427–435.

Tepper, O.M. (2002). Human Endothelial Progenitor Cells From Type II Diabetics Exhibit Impaired Proliferation, Adhesion, and Incorporation Into Vascular Structures. *Circulation* *106*, 2781–2786.

Tirziu, D., and Simons, M. (2009). Endothelium as master regulator of organ development and growth. *Vascul. Pharmacol.* *50*, 1–7.

- Toussaint, O., Weemaels, G., Debaq-Chainiaux, F., Scharffetter-Kochanek, K., and Wlaschek, M. (2011). Artefactual effects of oxygen on cell culture models of cellular senescence and stem cell biology. *J. Cell. Physiol.* 226, 315–321.
- Tsai, A.G., Friesenecker, B., Cabrales, P., Hangai-Hoger, N., and Intaglietta, M. (2006). The vascular wall as a regulator of tissue oxygenation. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* 15, 67–71.
- Vallon, M., Chang, J., Zhang, H., and Kuo, C.J. (2014). Developmental and pathological angiogenesis in the central nervous system. *Cell. Mol. Life Sci.* 71, 3489–3506.
- Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A., and Speleman, F. (2002). Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* 3, research0034–1.
- Viñas, J.L., Burger, D., Zimpelmann, J., Haneef, R., Knoll, W., Campbell, P., Gutsol, A., Carter, A., Allan, D.S., and Burns, K.D. (2016). Transfer of microRNA-486-5p from human endothelial colony forming cell-derived exosomes reduces ischemic kidney injury. *Kidney Int.*
- Voyta, J.C. (1984). Identification and isolation of endothelial cells based on their increased uptake of acetylated-low density lipoprotein. *J. Cell Biol.* 99, 2034–2040.
- Wang, L., Zhang, J., Yu, J., Yang, J., Den, M., Kang, H., and Huang, L. (2015). Reduction of store-operated Ca<sup>2+</sup> entry correlates with endothelial progenitor cell dysfunction in atherosclerotic mice. *Stem Cells Dev.*
- Wenger, R.H. (2002). Cellular adaptation to hypoxia: O<sub>2</sub>-sensing protein hydroxylases, hypoxia-inducible transcription factors, and O<sub>2</sub>-regulated gene expression. *FASEB J.* 16, 1151–1162.
- Williams, P.A., and Silva, E.A. (2015). The Role of Synthetic Extracellular Matrices in Endothelial Progenitor Cell Homing for Treatment of Vascular Disease. *Ann. Biomed. Eng.* 43, 2301–2313.
- Williamson, K., Stringer, S.E., and Alexander, M.Y. (2012). Endothelial Progenitor Cells Enter the Aging Arena. *Front. Physiol.* 3.
- Wojakowski, W., Kucia, M., Kazmierski, M., Ratajczak, M.Z., and Tendera, M. (2008). Circulating progenitor cells in stable coronary heart disease and acute coronary syndromes: relevant reparatory mechanism? *Heart* 94, 27–33.
- Woon Kim, K., Paul, P., Qiao, J., and Chung, D.H. (2013). Autophagy mediates paracrine regulation of vascular endothelial cells. *Lab. Invest.* 93, 639–645.

Wu, L., Song, Z., Liu, X., Li, S., Han, Z., and Uzan, G. (2012). [Method of expansion of late endothelial progenitor cells]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 92, 2574–2577.

Wykoff, C.C., Beasley, N.J.P., Watson, P.H., Turner, K.J., Pastorek, J., Sibtain, A., Wilson, G.D., Turley, H., Talks, K.L., Maxwell, P.H., et al. (2000). Hypoxia-inducible Expression of Tumor-associated Carbonic Anhydrases. 10.

Xie, F., Xiao, P., Chen, D., Xu, L., and Zhang, B. (2012). miRDeepFinder: a miRNA analysis tool for deep sequencing of plant small RNAs. *Plant Mol. Biol.* 80, 75–84.

Xue, Y., Xing, Z., Bolstad, A.I., Dyke, T.E.V., and Mustafa, K. (2013). Co-culture of human bone marrow stromal cells with endothelial cells alters gene expression profiles. *Int. J. Artif. Organs* 36, 650–662.

Yang, M.-H., and Wu, K.-J. (2008). TWIST activation by hypoxia inducible factor-1 (HIF-1): Implications in metastasis and development. *Cell Cycle* 7, 2090–2096.

Ye, L. (2015). Enhancing endothelial progenitor cell for clinical use. *World J. Stem Cells* 7, 894.

Yoder, M.C. (2010). Is Endothelium the Origin of Endothelial Progenitor Cells? *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 30, 1094–1103.

Yoder, M.C. (2012). Human Endothelial Progenitor Cells. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2, a006692–a006692.

Yoder, M.C. (2015). Differentiation of pluripotent stem cells into endothelial cells: *Curr. Opin. Hematol.* 22, 252–257.

Yoder, M.C., Mead, L.E., Prater, D., Krier, T.R., Mroueh, K.N., Li, F., Krasich, R., Temm, C.J., Prchal, J.T., and Ingram, D.A. (2007). Redefining endothelial progenitor cells via clonal analysis and hematopoietic stem/progenitor cell principals.

Zan, T., Li, H., Du, Z., Gu, B., Liu, K., and Li, Q. (2015). Enhanced endothelial progenitor cell mobilization and function through direct manipulation of hypoxia inducible factor-1  $\alpha$ : ENDOTHELIAL PROGENITOR CELL ACTIVATION THROUGH MANIPULATION OF HIF-1A. *Cell Biochem. Funct.* n/a-n/a.

Zhang, B., Guo, W., Yu, L., Wang, F., Xu, Y., Liu, Y., and Huang, C. (2013). Cobalt chloride inhibits tumor formation in osteosarcoma cells through upregulation of HIF-1 $\alpha$ . *Oncol. Lett.* 5, 911–916.

Zhang, D., Sun, X., Liu, J., Xie, X., Cui, W., and Zhu, Y. (2015). Homocysteine Accelerates Senescence of Endothelial Cells via DNA Hypomethylation of Human Telomerase Reverse Transcriptase. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 35, 71–78.

Zhao, Y., Hague, S., Manek, S., Zhang, L., Bicknell, R., and Rees, M.C. PCR display identifies tamoxifen induction of the novel angiogenic factor adrenomedullin by a non estrogenic mechanism in the human endometrium. *7*.

Zhdanov, A.V., Ogurtsov, V.I., Taylor, C.T., and Papkovsky, D.B. (2010). Monitoring of cell oxygenation and responses to metabolic stimulation by intracellular oxygen sensing technique. *Integr. Biol.* *2*, 443.

Zhdanov, A.V., Okkelman, I.A., Collins, F.W.J., Melgar, S., and Papkovsky, D.B. (2015). A novel effect of DMOG on cell metabolism: direct inhibition of mitochondrial function precedes HIF target gene expression. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg.* *1847*, 1254–1266.

Zhou, P., Tan, Y., Wang, H., and Wang, G. (2017). Hypoxic preconditioning-induced autophagy enhances survival of engrafted endothelial progenitor cells in ischaemic limb. *J. Cell. Mol. Med.* *21*, 2452–2464.

(2007). Ley 14/2007, de 3 de Julio, de Investigación Biomédica. Publicada en B.O.E. número 159, del 4 de Julio de 2007.

(2011). Real Decreto 1716/2011, de 18 de noviembre, de funcionamiento de los biobancos con fines de investigación biomédica y del tratamiento de las muestras biológicas de origen humano. Publicado en B.O.E. número 290, del 2 de Diciembre de 2011.

(2018). WMA DECLARATION OF HELSINKI – ETHICAL PRINCIPLES FOR MEDICAL RESEARCH INVOLVING HUMAN SUBJECTS.

KEGG PATHWAY: HIF-1 signaling pathway.

## **12 Anexos**

### **12.1 Anexo I.**

Macro para el programa ImageJ con las instrucciones para el contaje automático de las células teñidas en una imagen.



```

//Determinar de dónde coger cosas y dónde
dejar lo analizado
dir1 = getDirectory("Escoger Directorio
Fuente");
dir2 = getDirectory("Escoger Directorio
Destino");
list = getFileList(dir1);
x=getNumber("Número máximo de objetos a
contar en papeles", 50);
//Inicio del Loop
setBatchMode(true);
for (i=0; i<list.length; i++){
    //print (list[i]);
    open(dir1+list[i]);
    name=File.nameWithoutExtension;
    nombre=getInfo("image.filename");
    //Instrucciones del Análisis
    setBackgroundColor(255, 255, 255);
    run("Duplicate...", "title=[1.jpg]");
    rename(nombre+"1");
    run("Duplicate...", "title=[2.jpg]");
    rename(nombre+"2");
    //Recortar sólo si hay una selección
hecha
    if (selectionType()==-1){ }
    else {run("Clear Outside");
        print("selection");
        }
    run("Select All");
    run("8-bit");
    //Esta opción tal vez requiera un
retoque según el método de tinción
    run("Bandpass Filter...",
"filter_large=40 filter_small=3 suppress=None
tolerance=5 autoscale saturate");
    setOption("BlackBackground", false);
    run("Make Binary");
    run("Analyze Particles...", "size=x-
Infinity pixel circularity=0.00-1.00
show=Outlines display clear summarize add
in_situ");
    run("Images to Stack", "method=[Copy
(center)] name=Stack title=[] use");
    //Guardar resultados
    saveAs("Tiff",
dir2+nombre+" Analisis");
    run("Close All");
    }
selectWindow("Summary");
saveAs("Results", dir2+nombre+"Contaje.xls");
run("Close");
waitForUser("Pause", "He acabado");

```







## 12.2 Anexo II.

### Accepted Manuscript

ImageJ-based semiautomatic method to analyze senescence in cell culture

Javier Lozano-Gerona, Ángel-Luis García-Otín

PII: S0003-2697(17)30476-1

DOI: [10.1016/j.ab.2017.11.020](https://doi.org/10.1016/j.ab.2017.11.020)

Reference: YABIO 12851

To appear in: *Analytical Biochemistry*

Received Date: 7 July 2017

Revised Date: 10 November 2017

Accepted Date: 27 November 2017



Please cite this article as: J. Lozano-Gerona, Á.-Luis. García-Otín, ImageJ-based semiautomatic method to analyze senescence in cell culture, *Analytical Biochemistry* (2017), doi: 10.1016/j.ab.2017.11.020.

This is a PDF file of an unedited manuscript that has been accepted for publication. As a service to our customers we are providing this early version of the manuscript. The manuscript will undergo copyediting, typesetting, and review of the resulting proof before it is published in its final form. Please note that during the production process errors may be discovered which could affect the content, and all legal disclaimers that apply to the journal pertain.

**Title****ImageJ-based semiautomatic method to analyze senescence in cell culture.****Authors**Javier Lozano-Gerona<sup>1,\*</sup>, Ángel-Luis García-Otín<sup>1</sup>.<sup>1</sup> Aragon Institute of Health Sciences & IIS Aragon, 50009-Zaragoza, Spain.

\* Corresponding author. E-mail: jlozanog.iacs@aragon.es.

**Abstract**

$\beta$ -Galactosidase accumulates in the lysosomes of senescent cells of certain tissues. Cell staining with X-gal is a common procedure to detect senescent cells in culture. However, the organelle nature of the staining makes automatic count impossible, requiring time-consuming manual counting or expensive alternative techniques such as flow cytometry to effectively determine the amount of stained cells. Here we present an analysis strategy for images of X-gal stained cells which can be implemented into a macro for the ImageJ software overcoming some of the drawbacks of computational analysis of organelle staining.

**Keywords**ECFC; microscopy;  $\beta$ -Galactosidase; senescence; ImageJ.**Abbreviations**

X-gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranoside
UV	Ultraviolet
SA- $\beta$ -Gal	lysosomal $\beta$ -Galactosidase
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
ECFC	Endothelial Colony Forming Cell

**1. Introduction**

Counting cells on images has become usual procedure in cellular biology. A number of software applications has been developed (ImageJ (1), CellProfiler (2)) that fulfil this task. However, there are still cases where these applications fail to correctly distinguish individual cells or events that the researcher wants to measure. The only way is then to analyze those images by eye, one by one, which is time consuming and often subjective.

In particular, this problem comes up when analyzing SA- $\beta$ -Gal activity in cell culture using the X-gal cytochemical staining. Since the discovery in 1995 that this enzyme accumulates in the senescent cells (3), this method is widely accepted as a convenient way to detect senescent cells, and broadly applied to many cell types in culture or tissue sections. Senescence detection by X-gal staining is accurate when the cells are not in a confluent state since SA- $\beta$ -Gal expression is, among other factors, increased with cell confluence (4), although recent studies (5) indicate that this effect may be avoidable by working at the optimal pH for the enzyme activity. The usual protocols work at a suboptimal pH of 6 in order to not stain non-senescent cells (6).

Actually, X-gal staining labels lysosomal organelles, not the entire cells. As a consequence, cell counting algorithms could consider each organelle as a single event, which gives rise to too-high estimates of the number of senescent cells.

Several approaches have been undertaken to make the quantitation less subjective and more precise (7). Some of them make use of flow cytometry to distinguish the signal emitted from each single cell. However, flow cytometry is expensive in terms of equipment and reagents. Others use SA- $\beta$ -Gal activity measurement in total protein extracts (8), which is appropriate for global comparisons but can not determine the actual number of senescent cells. Considering cell counting by eye, Shlush et al. (5) proposed that the subjective error could be fixed by measuring the amount of green and blue pixels of images. However, for this one needs to manually select cells, which may be even more time consuming.

Here, we describe an alternative approach that is based on the simultaneous analysis of pairs of images from the same microscopic field: One to locate the cell nuclei by counterstaining with DAPI, and the other to detect X-gal staining in organelles according to previously described protocols. We programmed a macro, named *Senescence Counter*, implemented into ImageJ, which computes numeric results and saves a considerable amount of time.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Endothelial Colony Forming Cells isolation and culture

Endothelial colony forming cells (ECFC) were obtained following established protocols (9) from adult peripheral blood or cord blood from the Aragon Biobank after approval of the local Research Ethics Committee. Briefly, mononuclear cells were isolated by density gradient centrifugation and seeded into collagen-coated flasks at a  $4 \times 10^6$  cells/cm<sup>2</sup> density with EGM-2 MV (Lonza) medium changed daily in the first week and thereafter every second day until the appearance of ECFC colonies, normally after 2-3 weeks. Clones of ECFC were isolated by using cloning rings and subcultured. After the third passage, cell cultures were virtually clean of other cells and ECFC showed typical endothelial markers and morphology.

### 2.2. SA- $\beta$ -Gal activity detection by X-gal staining

The staining procedure has been described in more detail elsewhere (10). Briefly, cells were seeded on round coverslips coated with collagen. After washing with phosphate-buffered saline (PBS) and fixation with 0.2% glutaraldehyde and 1.85% formaldehyde in PBS for 3-5 minutes at room temperature, cells were washed again twice with PBS and the staining mix (Potassium ferricyanide 5mM, Potassium ferrocyanide 5mM, Magnesium Chloride 2mM, Sodium Chloride 150mM and X-gal 2.45mM in Citrate/Phosphate buffer pH 6.0), previously filtered through a 22 $\mu$ m pore filter, was added to the cells and incubated for 18-24h at 37°C, afterwards the mix was retired and two more PBS washes were done.

The important additional step that our method requires is the mounting of the coverslips onto microscope slides using a DAPI containing mounting medium (Fluoroshield™, Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri). For this it is crucial that the slides dry out completely and are kept away from light to avoid DAPI degradation.

An Olympus IX81 microscope equipped with ultraviolet illumination source and filter settings for DAPI was used to take images at 40x magnification. 20 fields from several replicates were captured using the same instrument settings for proper comparison, both with bright-field illumination and excitation with UV light. So, for each observation field, two matching images were generated and analyzed simultaneously.

### 2.3. Macro

The *Senescence Counter* is written in the ImageJ macro language, in the 1.48 version. Briefly, it localizes the nuclei in the UV image, despite their intensity, then detects in the bright-field image the amount of blue, green, and red in the immediate zone, which is the whole cell. Finally it pinpoints each cell either positive or negative according to the limit value given by the user (see Figure 1).

Figure 1: (A) UV image, (B) bright-field image, (C) superposition of both, (D) count of the nuclei, (E) outline of the process followed by the *Senescence Counter*.

Both the *Senescence Counter* itself and the user's manual are available as Supplementary material for this article.

### 2.4. Counting Trial

We analyzed 140 images from two independent experiments (80 and 60 images, respectively). In experiment 1 ECFC overexpressing adrenomedullin (AM), preproadrenomedullin (PPAM), fibroblast growth factor 2 (FGF2) were compared to a control group, whereas in experiment 2 ECFC were exposed to different oxygen concentrations; normoxia (21% O<sub>2</sub>), hypoxia (3% O<sub>2</sub>) and severe hypoxia (1% O<sub>2</sub>). Manual counting, by another researcher, independently and in a blinded fashion, was considered the standard counting procedure against which the results of the automatic procedure were compared.

### 2.5. Statistics

Difference in percentage of senescent cells according to each method for each image was calculated, and the mean value is presented for each experiment. Results from manual and automatic counting were compared by t-test in each experimental group, considering p values lower than 0.05 as statistically significant.

Mean values obtained for each condition were compared on each experiment by ANOVA test with SPSS program v15.0.1 (SPSS Inc.). Statistical significance was considered for p values inferior to 0.05. This comparison was done both for data from manual counting and automatic counting.

## 3. Results

Two independent experiments on ECFC were analyzed by either manual counting or with the *Senescence Counter* on the same set of images. Experiment 1 compared 4 experimental conditions, consisting of 20 images per group, that is a total of 80 images. Of these, 8 images could not be processed by the *Senescence Counter*. Experiment 2 compared 3 experimental conditions, with 20 images per group, a total of 60 images, of which one could not be processed by the

ACCEPTED MANUSCRIPT

*Senescence Counter*. Withdrawal of images from analysis was due to a defective DAPI staining unrelated to experimental treatment, which impeded nuclei localization and subsequent algorithm completion.

Manual counting by a trained observer took about 3 minutes on average per image, which lead to a total analysis time of approximately 4 and 3 hours respectively for each experiment. In contrast, with the *Senescence Counter* a trained operator needed approximately 20 minutes to set-up parameters and it took 30-40 minutes of PC automatic calculation for each experiment.

Considering the results for each individual image analyzed with the application of the ImageJ resulted in a mean absolute deviation from manual counting of 2.49% for Experiment 1 and 3.04% for Experiment 2. As a point for comparison, absolute deviation in senescent cell counting between two independent observers for a subset of images was 1.58% on average.

A summary of the results obtained for each experiment by each analysis method can be found in Table 1. Differences between the two counting methods were not statistically significant for any of the experimental groups of any experiment. However, in Experiment 1, a trend to slightly underestimated senescent cell counts compared to manual counting was observed, and the opposite was found in Experiment 2. Dispersion of data obtained remained quite similar between both methods for each experimental group.

Experiment 1					Experiment 2				
Condition	Mean % Senescence (±SEM)		Difference	t-test p value	Condition	Mean % Senescence (±SEM)		Difference	t-test p value
	Macro	Manual				Macro	Manual		
Control	1.44±1.38	1.81±0.95	-0.37	0.825	1% O <sub>2</sub>	6.41±1.18	4.51±0.74	+1.90	0.179
AM	5.70±0.96	7.50±1.08	-1.81	0.220	3% O <sub>2</sub>	17.94±1.9 2	13.51±1.50	+4.42	0.078
PPAM	5.07±1.07	6.89±0.96	-1.82	0.214	21% O <sub>2</sub>	5.88±0.98	4.81±0.90	+1.08	0.411
FGF2	9.74±1.59	12.64±1.86	-2.90	0.248					

Table 1: Comparison between Manual and semiautomatic counting. Shown are p values from t-test comparing the percentage of senescent cells obtained by each counting method for each experimental condition.

Importantly, when statistical analysis of experimental data was performed, both cell counting methods yielded similar results. For both Experiment 1 and Experiment 2, ANOVA on manual counting data or automated counting data yielded statistically significant p-values and detected differences among experimental groups in a similar fashion (see Supplementary material for details). Therefore, both counting methods could be considered as equivalents regarding the final objective of the experimental settings, which is to reveal statistically significant differences due to the conditions applied to the experimental groups.

#### 4. Discussion and Conclusions

In this report we describe a method to analyze *in vitro* cell senescence experiments as well as a macro developed for ImageJ, which implements automatic counting of senescent cells. By localizing the nuclei independently from the X-gal staining it no longer counts lysosomes but whole cells. It provides similar results to manual counting with two main advantages: it offers unbiased and reproducible results when compared to manual counting, which can be essentially affected by observers' subjectivity, and time saving, as far as it performs analysis faster and in a partially unsupervised mode, with more time saved the larger the set of images.

Some limitations could be envisaged regarding the proposed method of analysis. One of them is derived from the need of having two images of the same microscopy field captured with different techniques, one with bright-field illumination to detect X-gal stained cells, and the other with UV light to detect nuclei stained with DAPI. The other one has to do with the quality of the images to be analyzed, which must attain a minimal degree in order to be correctly interpreted by the *Senescence Counter*.

Supplementary material (online) is provided that describes in a detailed way instructions for using the *Senescence Counter*, as well as particular cases, in which it may no be functioning.

We expect that this simple add-on in the free software ImageJ will provide new possibilities for studies that require the measurement of senescence *in vitro*. Additionally, although this algorithm is designed to measure the amount of blue and green staining, and therefore will not work properly with different color stains, if necessary, it can be easily adapted to meet other experimental requirements. We encourage the interested user to modify the present application so that it better fits to their individual needs.

## 5. Supplementary material

The next files are available online as supplementary material for this article

File 1: ANOVA results for test experiments.

File 2: Instructions for installing and using the *Senescence Counter*.

File 3: *Senescence Counter* macro in ImageJ code language.

File 4: *UV checking macro* in ImageJ code language.

## 6. Conflicts of interest

The authors manifest no conflicts of interest.

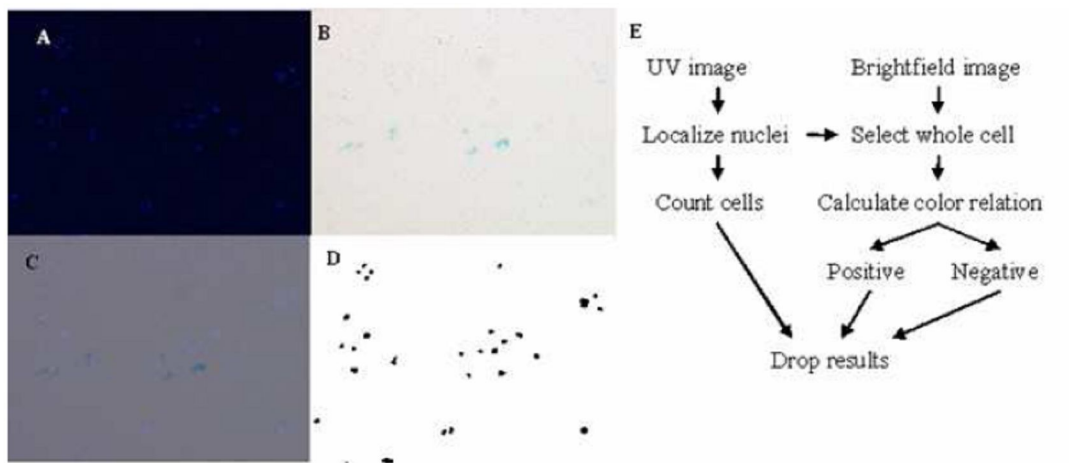
## 7. Acknowledgements

Javier Lozano-Gerona enjoys a PhD scholarship from the Gobierno de Aragón (Spain). The research group of Ángel-Luis García-Otín is funded by Gobierno de Aragón (B-105) and by ISCIII/MINECO (PI16/02112). The authors thank David Lozano-Gerona and Andrea Lorda for their technical assistance and also to the Microscopy Service Facility of the Aragon Institute of Health Sciences.

## 8. References

1. Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Meth.* 2012 Jul;9(7):671–5.
2. Carpenter AE, Jones TR, Lamprecht MR, Clarke C, Kang IH, Friman O, et al. CellProfiler: image analysis software for identifying and quantifying cell phenotypes. *Genome Biol.* 2006;7(10):R100.
3. Dimri GP, Lee X, Basile G, Acosta M, Scott G, Roskelley C, et al. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci.* 1995;92(20):9363–7.
4. Severino J, Allen RG, Balin S, Balin A, Cristofalo VJ. Is  $\beta$ -Galactosidase Staining a Marker of Senescence in Vitro and in Vivo? *Exp Cell Res.* 2000 May;257(1):162–71.
5. Shlush LI, Itzkovitz S, Cohen A, Rutenberg A, Berkovitz R, Yehezkel S, et al. Quantitative digital in situ senescence-associated  $\beta$ -galactosidase assay. *BMC Cell Biol.* 2011;12(1):16.
6. Lee BY, Han JA, Im JS, Morrone A, Johung K, Goodwin EC, et al. Senescence-associated  $\beta$ -galactosidase is lysosomal  $\beta$ -galactosidase. *Aging Cell.* 2006 Apr;5(2):187–95.
7. Noppe G, Dekker P, de Koning-Treurniet C, Blom J, van Heemst D, Dirks RW, et al. Rapid flow cytometric method for measuring senescence associated  $\beta$ -galactosidase activity in human fibroblasts. *Cytometry A.* 2009 Nov;75A(11):910–6.
8. Bassaneze V, Miyakawa AA, Krieger JE. A quantitative chemiluminescent method for studying replicative and stress-induced premature senescence in cell cultures. *Anal Biochem.* 2008 Jan;372(2):198–203.
9. Mead LE, Prater D, Yoder MC, Ingram DA. Isolation and Characterization of Endothelial Progenitor Cells from Human Blood. In: Bhatia M, Elefany AG, Fisher SJ, Patient R, Schlaeger T, Snyder EY, editors. *Current Protocols in Stem Cell Biology* [Internet]. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.; 2008 [cited 2017 Jun 8]. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/9780470151808.sc02c01s6>
10. Debacq-Chainiaux F, Erusalimsky JD, Campisi J, Toussaint O. Protocols to detect senescence-associated beta-galactosidase (SA- $\beta$ gal) activity, a biomarker of senescent cells in culture and in vivo. *Nat Protoc.* 2009 Dec;4(12):1798–806.

ACCEPTED MANUSCRIPT



Macro para el programa ImageJ con las instrucciones desarrolladas para analizar el ensayo de senescencia de tinción con X-gal y DAPI.





```

//Senescence Counter Macro
//version 1.1 for Windows 10 ImageJ code Language
//Created by Javier Lozano-Gerona for free use
//Indicate where to take images and where to leave results
dir1 = getDirectory("Choose_Fluorescence_Images_File");
dir2 = getDirectory("Choose_Senescence_Images_File");
dir3 = getDirectory("Choose_Results_File");
//Determine lists of images
list1 = getFileList(dir1);
list2 = getFileList(dir2);
//Test that both lists have the same length
if(list1.length != list2.length) {print("Length differs!");
    waitForUser( "Pause", "Stop the process!");
}
//Ask for the number of trials
//Indicate number of trials
Dialog.create("Number of trials (1 to 6)");
Dialog.addNumber("Number of trials:", 1);
Dialog.show();
nintentos1= Dialog.getNumber();
//Ask for variables
Dialog.create("Variables for the analysis (1 to 6)");
for (nintentos2=0; nintentos2<nintentos1;
nintentos2++){
    Dialog.addNumber("Area to increase in
pixels"+nintentos2+":", 60);
    Dialog.addNumber("Absolute value to
consider positive"+nintentos2+":", 0.5);
}
Dialog.show();
if(nintentos1== 1) {
    z1= Dialog.getNumber();
    s1= Dialog.getNumber();
}
if(nintentos1==2) {
    z1= Dialog.getNumber();
    s1= Dialog.getNumber();;
    z2= Dialog.getNumber();;
    s2= Dialog.getNumber();;
}
if(nintentos1==3) {
    z1= Dialog.getNumber();
    s1= Dialog.getNumber();;
    z2= Dialog.getNumber();;
    s2= Dialog.getNumber();;
    z3= Dialog.getNumber();;
    s3= Dialog.getNumber();;
}
if(nintentos1==4) {
    z1= Dialog.getNumber();
    s1= Dialog.getNumber();;
    z2= Dialog.getNumber();;
    s2= Dialog.getNumber();;
    z3= Dialog.getNumber();;
    s3= Dialog.getNumber();;
    z4= Dialog.getNumber();;
    s4= Dialog.getNumber();;
}
if(nintentos1==5) {
    z1= Dialog.getNumber();
    s1= Dialog.getNumber();;
    z2= Dialog.getNumber();;
    s2= Dialog.getNumber();;
    z3= Dialog.getNumber();;
    s3= Dialog.getNumber();;
    z4= Dialog.getNumber();;
    s4= Dialog.getNumber();;
    z5= Dialog.getNumber();;
    s5= Dialog.getNumber();;
}
if(nintentos1==6) {
    z1= Dialog.getNumber();
    s1= Dialog.getNumber();;
    z2= Dialog.getNumber();;
    s2= Dialog.getNumber();;
}
z3= Dialog.getNumber();;
s3= Dialog.getNumber();;
z4= Dialog.getNumber();;
s4= Dialog.getNumber();;
z5= Dialog.getNumber();;
s5= Dialog.getNumber();;
z6= Dialog.getNumber();;
s6= Dialog.getNumber();;
}
if(nintentos1 != 1){
    if(nintentos1 != 2){
        if(nintentos1 !=3){
            if(nintentos1 !=4){
                if(nintentos1
!=5){
                    if(nintentos1 !=6){print("number of trials no
considered");
                        waitForUser("Pause", "Stop the process");
                    }
                }
            }
        }
    }
}
//Trials Loop
for (nintentos3=0; nintentos3<nintentos1; nintentos3++){
    //Rewrite the variables according to the number of
trials
        if(nintentos3==0) {
            z=z1;
            s=s1;
        }
        if(nintentos3==1) {
            z=z2;
            s=s2;
        }
        if(nintentos3==2) {
            z=z3;
            s=s3;
        }
        if(nintentos3==3) {
            z=z4;
            s=s4;
        }
        if(nintentos3==4) {
            z=z5;
            s=s5;
        }
        if(nintentos3==5) {
            z=z6;
            s=s6;
        }
}
//Create a table where save the final results
open(dir1+list1[0]);
name=File.nameWithoutExtension;
run("Measure");
selectWindow(name+".tif");
run("Close");
selectWindow("Results");
run("Clear Results");
setResult("NameTotal", 0, 0);
setResult("CellNumberTotal", 0, 0);
setResult("SumSenAbsTotal", 0, 0);
setResult("%SenAbsTotal".0,0);
saveAs("Results",
dir3+"Total"+nintentos3+".xls");
//Start Loop
//For some unknown reason it does not work
properly if using the Batchmode
//setBatchMode(true);
for (k=0; k<list1.length; k++){

```

```

open(dir1+list1[k]);
name=File.nameWithoutExtension;
//Determine parameters to find with
"Measure"
run("Set Measurements...", "area center
integrated area_fraction limit display redirect=None
decimal=3");
run("Set Scale...", "distance=0
known=0 pixel=1 unit=pixel global");
//Instructions of the analysis
setBackgroundColor(255, 255, 255);
run("Select All");
run("Duplicate...", "title=[1.jpg]");
run("Select All");
run("8-bit");
run("Subtract Background...",
"rolling=50");
run("Invert");
setOption("BlackBackground", false);
run("Make Binary");
//Counting
run("Select All");
roiManager("Add");
run("Analyze Particles...", "size=60-
Infinity pixel circularity=0.00-1.00 show=Masks display
clear summarize record add in_situ");
roiManager("Show All with labels");
roiManager("Show All");
run("Images to Stack", "method=[Copy
(center)] name=Stack title=[] use");
//Determine the selection list
list3=roiManager("count");
//Save results
saveAs("Tiff", dir3+name+"
"+"Analisis.tif");
run("Close");
//Open Senescence images
open(dir2+list2[k]);
nombre=File.nameWithoutExtension;
run("Duplicate...", "title=2");
//Enlarge the selection to include the
whole cell
for (p=0; p<list3; p++){
selectWindow("2");
roiManager("Select", p);
run("Enlarge...", "enlarge=z
pixel");
run("Fit Circle");
roiManager("Update");
}
//Add the whole image selection
run("Select All");
roiManager("Add");
//Update selection list
list4=roiManager("count");
//Continue
selectWindow("2");
run("Close");
selectWindow(nombre+".tif");
run("Close");
open(dir2+list2[k]);
run("Duplicate...", "title=2");
//Create results table
selectWindow("Results");
run("Clear Results");
setResult("CellNumber", 0, 0);
setResult("Red", 0, 0);
setResult("Blue", 0, 0);
setResult("Green", 0, 0);
setResult("(B+G)/(B+G+R)",0,0);
setResult("Mas",0,0);
saveAs("Results",
dir3+"ColorTable"+nombre+".xls");
selectWindow("Results");
run("Close");
//Selection list Loop
limitlist4=limitlist4-1;
for (j=0; j<limitlist4-1; j++){
//Histogram analysis
selectWindow("2");
//Select the cell and check it
is inside the image
roiManager("Select", j);
roiManager("Select",list3);
roiManager("Select",
newArray(j,limitlist4));
roiManager("AND");
//Histogram
run("Color Histogram");
saveAs("Results",
dir3+"Results"+j+".xls");
open(dir3+"Results"+j+".xls");
//Obtaining the variables
Red=getResult("mean", 0);
Green=getResult("mean",
1);
Blue=getResult("mean", 2);
Calculo=(Green+Blue)/(Red+Green+Blue);
Mas=1000*(log(Calculo+0.3333)/log(2));
selectWindow("Histogram
of 2");
run("Close");
selectWindow("Results");
run("Close");
//Update the results table
open(dir3+"ColorTable"+nombre+".xls");
setResult("CellNumber", j,j);
setResult("Red",j,Red);
setResult("Green",j,Green);
setResult("Blue", j,Blue);
setResult("(B+G)/(B+G+R)",j,Calculo);
setResult("Mas",j,Mas);
saveAs("Results",dir3+"ColorTable"+nombre+".xl
s");
File.delete(dir3+"Results"+j+".xls");
}
//Erase nuclei list
if(list3!=0){
roiManager("Delete");
}
selectWindow("ROI Manager");
run("Close");
//Once finished create the image to
save
run("Images to Stack", "method=[Copy
(center)] name=Stack title=[] use");
run("Close");
//Fuse both images to check they are
the same
open(dir1+list1[k]);
name=File.nameWithoutExtension;
rename("primera");
open(dir2+list2[k]);
nombre=File.nameWithoutExtension;
rename("segunda");
imageCalculator("Average create",
"primera", "segunda");
//Save all images in a single stack
open(dir3+name+" "+"Analisis.tif");
run("Stack to Images");
run("Images to Stack", "method=[Copy
(center)] name=Stack title=[] use");

```

```

saveAs("Tiff", dir3+name+
"+"conjunto");
//Erase intermediate stacks
File.delete(dir3+name+
"+"primera.tif");
File.delete(dir3+name+
"+"Analisis.tif");
//Add rows in the results table
open(dir3+"ColorTable"+nombre+".xls");
p=nResults;
setResult("senescenteAbs", 0, 0);
setResult("SumSenAbs",0,0);
setResult("%SenescenciaAbs",0,0);

//Determine senescence with the
absolute value "Mas" calculated with the measure
for (j=0; j<nResults; j++){
//If senescent (1) els (0)
if(getResult('Mas',j)>s){

setResult("senescenteAbs", j,1);
}
updateResults();
//Sum of senescent cells
if(j==0){

setResult("SumSenAbs", j,
getResult('senescenteAbs', j));
}
else{

setResult("SumSenAbs", j,getResult('SumSenAbs',
j-1)+getResult('senescenteAbs',j));
}
updateResults();
//%Senescents

setResult("%SenescenciaAbs", j,
100*getResult('SumSenAbs', j)/(j+1));
updateResults();
}
selectWindow("Results");
saveAs("Results", dir3+nombre+
"+"Resumen.xls");

File.delete(dir3+"ColorTable"+nombre+".xls");
//Save final values to write in the final
table "Total"
NameTotal=name;
CellNumberTotal=p;

SumSenAbsTotal=getResult('SumSenAbs',p-1);

PerSenAbsTotal=getResult('%SenescenciaAbs',p-
1);
//Close the open results table
close();
//Write the measures in the final table
"Total"
open(dir3+"Total"+nintentos3+".xls");
setResult("NameTotal", k, NameTotal);
setResult("CellNumberTotal", k,
CellNumberTotal);
setResult("SumSenAbsTotal", k,
SumSenAbsTotal);
setResult("%SenAbsTotal", k,
PerSenAbsTotal);
updateResults();
saveAs("Results",
dir3+"Total"+nintentos3+".xls");
//Collect RAM no longer works
//run("Collect Garbage");
};
};

```





### 12.3 Anexo III.

#### Anticuerpos empleados en el marcaje

Anti	Isotipo	Clon	Marcaje	Marca
CD3	IgG1	UCHT1	APC	BD Pharmingen
CD13	IgG1	WM-15	FITC	eBioscience
CD14	IgG2a	TüK4	PO	Caltag
CD29	IgG1	TS2/16	FITC	eBioscience
CD31	IgG1	AC128	PE	Miltenyi
CD34	IgG1	581/CD34	FITC	BD Pharmingen
CD45	IgG1	2D1	APC-Cy7	BD Pharmingen
CD54	IgG1	15.2	FITC	AbD Serotec
CD62E	IgG2b	TEA2/1	PE	AbD Serotec
CD62P	IgG1	AK-6	Alexa647	AbD Serotec
CD73	IgG1	AD2	APC	AbD Serotec
CD90	IgG1	5.00E+10	FITC	eBioscience
CD105	IgG1	SN6	PE	eBioscience
CD106	IgG1	STA	PE	eBioscience
CD117	IgG1	104D2	PE	Caltag
CD133	IgG1	AC133	PE	Miltenyi
CD144	IgG1	55-7H1	FITC	BD Pharmingen
CD146	IgG1	541-10B2	PE	Miltenyi
VEGFR2	IgG1	89106	APC	R&D
HLA-ABC	IgG2a	W6/32	FITC	eBioscience
HLA-DR	IgG2b	LN3	PE	eBioscience

#### Anticuerpos empelados en el isotipado

Isotipos	Marcaje	Marca
IgG1	Alexa647	AbD Serotec
IgG1	APC	eBioscience
IgG1	APC	BD Pharmingen
IgG1	APC	R&D
IgG1	APC	Miltenyi
IgG1	APC-Cy7	BD Pharmingen
IgG1	FITC	eBioscience
IgG1	FITC	BD Pharmingen
IgG1	FITC	AbD Serotec
IgG1	PE	eBioscience
IgG1	PE	Invitrogen
IgG1	PE	Miltenyi
IgG2a	FITC	eBioscience
IgG2a	PE	R&D
IgG2a	PE	R&D
IgG2a	PE-Cy7	Biolegend

Isotipos	Marcaje	Marca
IgG2a	PO	Invitrogen
IgG2b	PE	eBioscience
IgG2b	PE	R&D
IgG2b	PE	AbD Serotec

#### Anticuerpos empleados en Western-Blot

Anticuerpo	Isotipo	Selección	Catálogo	Marca
Primario	Mouse-IgG2b	HIF1 $\alpha$	NB100-105	NovusBio
Primario	Rabbit-IgG	HIF1 $\alpha$	PA5-23031	ThermoFisher
Primario	Mouse-IgG2b	HIF1 $\alpha$	Sc-53546	Santa Cruz
Primario	Rabbit-IgG	HIF2 $\alpha$	PA5-24200	ThermoFisher
Primario	Rabbit-IgG	Actina	Sc-1616	Santa Cruz
Secundario	Donkey IgG	Ratón-HRP	Sc-2318	Santa Cruz
Secundario	Goat IgG	Ratón-HRP	31439	ThermoFisher
Secundario	Goat IgG	Conejo-HRP	31460	ThermoFisher
Secundario	Donkey IgG	Ratón-HRP	Cedido por Adipofat	



## 12.4 Anexo IV

Oligos cebadores empleados. Se muestra el gen medido, el oligo directo, el reverso (representados en la dirección 5' a 3') y el fragmento que se predice amplificará según la base de datos Blast.

Gen	Oligo	Dirección	Blast
HIF1 $\alpha$	GCA CTA GAC AAA GTT CAC CTG AGC CT	Directo	NM_001243084.1
	TGG GTT CTT TGC TTC TGT GTC TTC AG	Reverso	
VEGFA	GGA GGG CAG AAT CAT CAC GAA G	Directo	NM_001317010.1
	CAC ACA GGA TGG CTT GAA GAT G	Reverso	
GLUT1	TCT TCA GCC AGG GTC CAC GTC	Directo	NM_006516.2
	CGT AGG GAC CAC ACA GTT GCT C	Reverso	
CAIX	CTG GTG ACT CTC GGC TAC AGC T	Directo	NM_001216.2
	CTA GGA TGT CAC CAG CAG CCA GG	Reverso	
CDKN2A	GTG GAC CTG GCT GAG GAG	Directo	NM_001195132.1
	CTT TCA ATC GGG GAT GTC TG	Reverso	
CDKN1A	TAC CCT TGT GCC TCG CTC AG	Directo	NM_001291549.1
	CGG CGT TTG GAG TGG TAG A	Reverso	
AM	TCC CCC TAT TTT AAG ACG TGA ATG	Directo	NM_001124.2
	CAT GCA CAC AAA CAC ACT CAC AT	Reverso	
FGF2	CTG GCT ATG AAG GAA GAT GGA	Directo	NM_002006.4
	TGC CCA GTT CGT TTC AGT G	Reverso	
RPLP0	CCA TTC TAT CAT CAA CGG GTA CAA	Directo	NM_001002.3
	TCA GCA AGT GGG AAG GTG TAA TC	Reverso	
GAPDH	GCC ATC AAT GAC CCC TTC AT	Directo	NR_152150.1
	GCC ATG GAA TTT GCC AT	Reverso	
ACTB	CCC TGG CAC CCA GCA C	Directo	NM_001101.4
	GCC GAT CCA CAC GGA GTA C	Reverso	
B2MG	AAT CCA AAT GCG GCA TCT	Directo	NM_004048.2
	GAG TAT GCC TGC CGT GTG	Reverso	
KDR	GTA ACC CGG AGT GAC CAA GG	Directo	NM_002253.3
	AAC CAA GGT ACT TCG CAG GG	Reverso	
NOS3	GTG GCT GGT ACA TGA GCA CT	Directo	NM_001160111.1
	GTG GTC CAC GAT GGT GAC TT	Reverso	
TFRC	GTC GCT GGT CAG TTC GTG ATT	Directo	NM_001313966.1
	AGC AGT TGG CTG TTG TAC CTC TC	Reverso	
RPLP27	GGT GGT TGC TGC CGA AAT GGG	Directo	NM_000988.4
	TGT TCT TCA CGA TGA CAG CTT TGC G	Reverso	
18s	AAA CGG CTA CCA CAT CCA AG	Directo	NR_146146.1
	CCT CCA ATG GAT CCT CGT TA	Reverso	