



**Universidad  
Zaragoza**

# Trabajo Fin de Máster en Biología Molecular y Celular

Determinación del Efecto de la Tensión de Oxígeno  
sobre las Células Progenitoras Endoteliales

Autor:

**Javier Lozano Gerona**

Director:

**Ángel-Luis García Otín**

Ponente:

**Miguel Pocoví Mieras**

Facultad de Ciencias

Hospital Universitario Miguel Servet

Instituto Aragonés de Ciencias de la Salud

Unidad de Investigación Traslacional

Laboratorio de Investigación Molecular

2013-2014



# Índice

Índice.....	1
Resumen.....	2
Introducción.....	3
El endotelio vascular y las células endoteliales.....	3
Las células progenitoras endoteliales.....	9
El Efecto de la Tensión de Oxígeno en el Medio.....	13
Antecedentes e Hipótesis.....	16
Objetivos.....	18
Metodología.....	19
Cultivo Celular.....	19
Obtención de las EPCs.....	20
Análisis de Crecimiento.....	22
Capacidad Clonogénica.....	24
Pruebas de Angiogénesis.....	25
Estudio de Marcadores de Superficie.....	26
Apoptosis.....	28
Análisis de Ciclo Celular.....	29
Resultados.....	30
Análisis de Crecimiento en Pases Sucesivos.....	30
Análisis de Crecimiento a tiempos Cortos.....	33
Ensayo Clonogénico.....	35
Apoptosis y Ciclo Celular.....	38
Marcadores de Superficie.....	40
Pruebas con Cloruro de Cobalto.....	42
Análisis de Crecimiento a Tiempos Cortos.....	42
Pruebas de Angiogénesis.....	43
Ciclo Celular y Apoptosis.....	44
Discusión.....	46
Conclusiones.....	52
Bibliografía.....	53

## Resumen

Las células progenitoras endoteliales son células procedentes de la médula ósea parcialmente diferenciadas a célula de la pared endotelial. Mantienen las capacidades de proliferar y de circular, en muy baja proporción, por el flujo sanguíneo hasta zonas donde el endotelio esté dañado o sea necesaria la creación de nuevos vasos (angiogénesis), lugar donde sustituyen a las células endoteliales dañadas o crean ramificaciones del sistema circulatorio. Por este hecho han sido propuestas como candidatas para su uso en terapia celular, pero requerirían una etapa de expansión *in vitro* que permitiera conseguir cantidades suficientes.

Se ha observado *in vivo* que su presencia está aumentada en condiciones de hipoxia, hecho que se explicaría porque una de las funciones de estas células es la generación de vasos sanguíneos *de novo* en zonas con una falta patológica de riego sanguíneo. Observaciones preliminares realizadas en el grupo donde se desarrolló este trabajo sustentaban la idea de que el uso de hipoxia en el medio de cultivo durante la expansión de estas células podría acelerar su crecimiento.

Por ello el objetivo propuesto fue analizar el efecto de la hipoxia en distintas variable relacionadas con el crecimiento de las células progenitoras endoteliales *in vitro*. Para ello se compararon las condiciones de cultivo estándar con el uso de oxígeno al 4% en atmósfera controlada.

No se observó un efecto significativo de la hipoxia en la proliferación global de las células, aunque sí en su capacidad clonogénica. De manera complementaria no se observaron diferencias en el índice de proliferación, pero sí una tendencia a que una menor proporción de células entraran en apoptosis en condiciones de hipoxia.

## Introducción

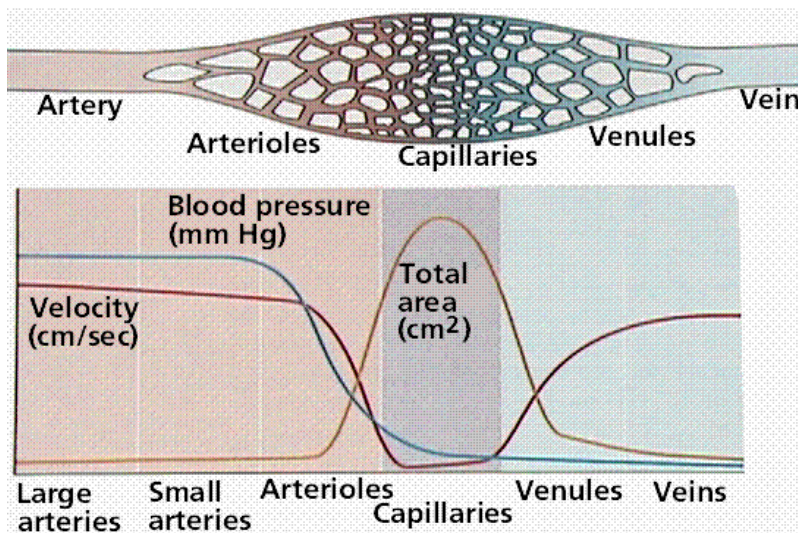
### El endotelio vascular y las células endoteliales

Debido a su tamaño los organismos superiores han desarrollado a lo largo de la evolución un complejo sistema de reparto de los nutrientes y recogida de los desechos capaz de alcanzar todas las células del individuo. Los circuitos más importantes que participan en esta conexión son el circulatorio sanguíneo, encargado del transporte y distribución de nutrientes, hormonas y células a las diferentes zonas, y el linfático, encargado de la recogida de fluidos y punto de concentración de la mayoría de células del sistema inmune para hacer frente a infecciones, dado que tarde o temprano los patógenos alcanzarán un ganglio linfático.

Estos vasos se componen de una serie de capas o sustratos formados por diversos tejidos que les confieren sus características. De esta forma, si realizamos un corte transversal de uno de ellos se pueden apreciar niveles concéntricos de células diferentes conformando el conducto en sí. Cada conducto, arterias, venas, capilares y vasos linfáticos, tienen funciones y un contenido (Kelly, 2013) marcadamente diferentes, y por lo tanto, su composición en cada uno de estos tejidos varía de acuerdo a las necesidades fisiológicas para poder cumplir dichas funciones.

- **Arterias:** Típicamente consideradas como los conductos salientes del corazón. Transportan sangre con un contenido rico en nutrientes y oxígeno y soportan una presión superior al resto de vasos (ver Figura 1), poseen tres capas principales en su estructura; la túnica íntima, formada por el endotelio en contacto con el flujo sanguíneo y el estroma de soporte, la túnica media formada por músculo que participa de la regulación de la presión según las necesidades del momento, y la túnica adventicia más externa con tejido conjuntivo que actúa como base estructural de la arteria (ver Figura 2).
- **Venas:** A diferencia de las arterias, las venas son aferentes hacia el corazón. Poseen menor musculatura ya que soportan menos presión (ver Figura 1), pero por este mismo motivo tienen válvulas dispuestas regularmente para evitar que la sangre circule en dirección contraria a la fisiológica. Histológicamente la túnica media, muscular, suele incluirse con la adventicia, conjuntiva, en una única capa, quedando sólo ésta y la íntima, endotelial (ver Figura 2). Son más elásticas y una de sus funciones más importantes es como reservorio de sangre cuando la tensión requerida en el cuerpo disminuye.

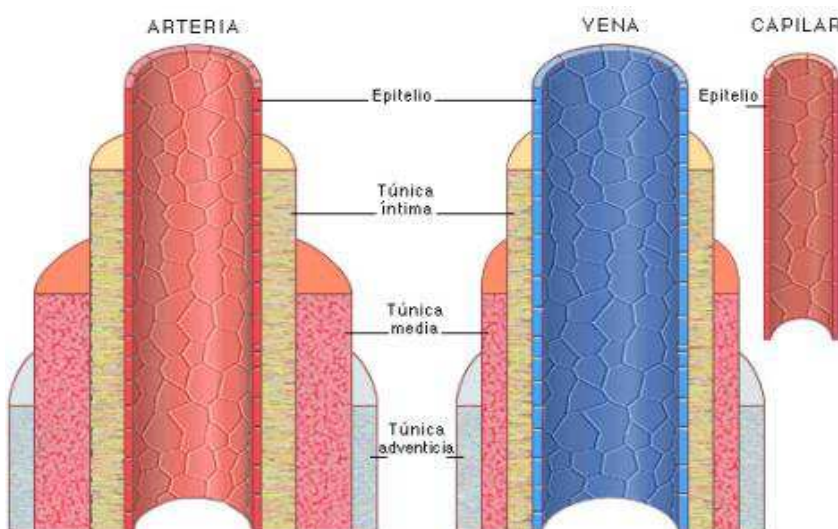
## Determinación del efecto de la tensión de oxígeno sobre las Células Progenitoras Endoteliales



**Figura 1:** Muestra la estructura de los diferentes conductos del sistema vascular así como las características de su flujo. Extraída de Wikipedia.

- Capilares: Mucho más estrechos y únicos con capacidad de intercambiar su contenido con los tejidos circundantes, los capilares tienen, por necesidad, una pared mucho más estrecha compuesta casi únicamente por las células endoteliales y el estroma de soporte de aquellas. Algunos llegan a encontrarse fenestrados, con zonas en las que no hay contactos cerrados entre las células, para facilitar aún más este intercambio. A pesar de esta estrechez, gracias al alto número de capilares, soportan una presión menor a los vasos más grandes (ver Figura 1).
- Conductos linfáticos: Su estructura es muy similar a los capilares y las venas, dado que su función es recoger el exceso de líquido vertido sobre los tejidos, que acaba volcándose en el torrente sanguíneo de nuevo, en las venas cava superior y subclavia izquierda.

Como se puede observar, las diferencias entre los diferentes conductos son muchas y muy importantes, pero un elemento omnipresente es el endotelio. Esto se debe a que las células endoteliales son las



**Figura 2:** Gráfico de un corte histológico comparando una arteria, una vena y un capilar. Imagen extraída de Wikipedia.

## Determinación del efecto de la tensión de oxígeno sobre las Células Progenitoras Endoteliales

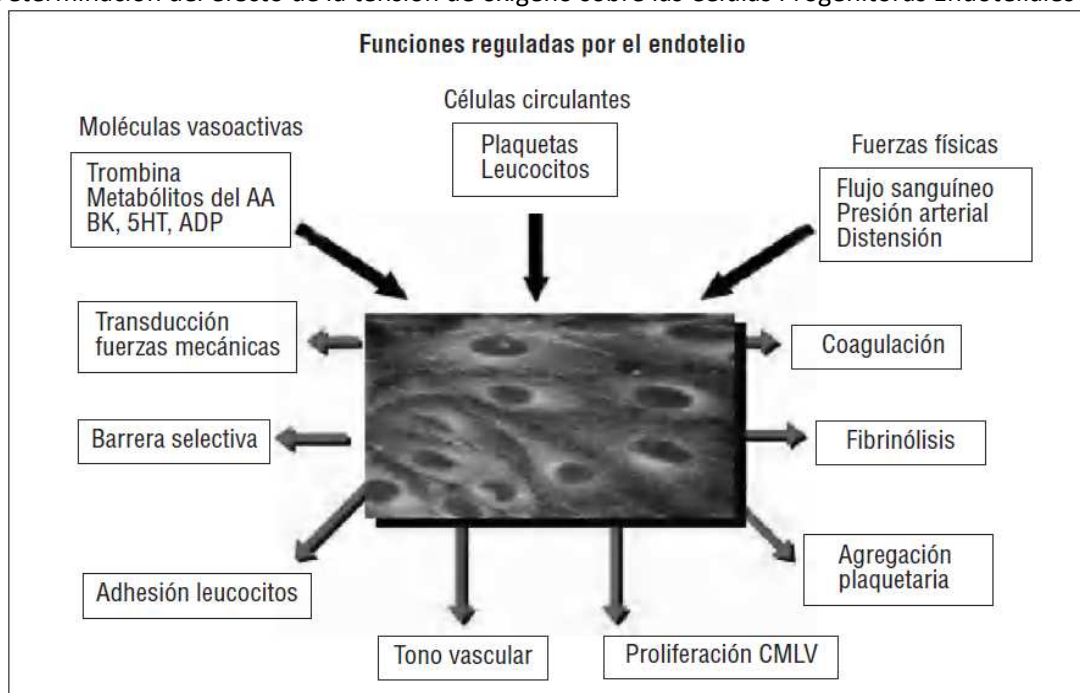
encargadas de realizar diversas funciones imprescindibles en todos ellos. Gracias a una producción de proteínas finamente regulada, detectan modificaciones químicas, como la concentración de ciertas hormonas o citoquinas proinflamatorias, y estímulos mecánicos, como el estrés hemodinámico debido a hipertensión, y así responder apropiadamente, ellas mismas o induciendo un cambio en los tejidos circundantes (Badimón, 2006).

Las células endoteliales se especializan para cumplir sus diferentes cometidos durante el desarrollo embrionario del organismo, llegando al punto en que la respuesta que ofrecen a las diferentes señales entrantes, su composición proteica e incluso su expresión genética se hace diferente, no sólo entre los diferentes vasos, ya que se han encontrado diferencias de importancia incluso entre el mismo tipo de vasos provenientes de diferentes órganos (Ribatti, 2002). Unas diferencias originadas tanto por señales proporcionadas por el tejido circundante como por la expresión genética propia de las células de cada zona (De la Paz, 2008).

Las células endoteliales son las encargadas de regular la tensión arterial de acuerdo a la información que reciben respecto a la presión soportada en un momento dado o las necesidades del organismo de acuerdo a moléculas detectadas en el flujo sanguíneo, como la insulina (Bäck, 2012) que induce la generación de óxido nítrico, por activación de la Óxido Nítrico Sintasa Inducible, que provoca la relajación de las células musculares lisas de la túnica media, regulando así el tono vascular. Son las encargadas de regular el paso desde la luz vascular a los tejidos circundantes, no sólo de nutrientes y compuestos, también de macromoléculas, como las lipoproteínas, y células como los linfocitos, exponiendo los receptores adecuados para su retención, captación y reclutamiento a las zonas donde son requeridos. Además son participantes de gran importancia en el proceso de coagulación, emitiendo factores para activar las plaquetas y la cascada de coagulación, así como inhibir todo este proceso mientras no sea necesario que se produzca, exponiendo a la luz vascular una superficie antiagregante y antitrombocítica (ver Figura 3) (Badimón, 2006).

Si la capa endotelial se rompe, el contenido de los vasos sanguíneos entrará en contacto con el tejido conjuntivo subyacente que soporta al músculo en la túnica media, y éste activará la cascada de coagulación (Cooley, 2012). Siendo por tanto de extrema importancia el mantenimiento de la integridad del endotelio en condiciones fisiológicas, ya que de lo contrario podría dar lugar a severos problemas pudiendo llegar a causar la muerte (Skagius, 2008) por formación de coágulos o trombos.

### Determinación del efecto de la tensión de oxígeno sobre las Células Progenitoras Endoteliales



**Figura 3:** esquema de la información entrante al endotelio y las respuestas que éste produce. Imagen extraída de (Badimón, 2006).

Para cumplir su función de pared y frontera las células endoteliales poseen una morfología muy característica, extendida y geométrica formando una monocapa, adquisición en la que parece participar el metabolismo del colesterol (Dick, 2013). Se adhieren con facilidad sobre superficies que lo permitan, lo que incluye colágeno, fibronectina, plástico empleado habitualmente en cultivos celulares e incluso, aunque con menos eficacia, vidrio sin tratar gracias a que poseen diversas proteínas de adhesión. Además entre ellas poseen uniones muy estrechas, denominadas en inglés “gap junctions”, formadas por poros formados por la proteína conexina 37 entre otras (Karen, 1993), que les permiten incluso el intercambio de ciertos mensajeros y moléculas pequeñas entre sus citosoles. Emplean esta comunicación para transmitir respuestas por una zona del endotelio y así coordinar su respuesta (Boedtkjer, 2013). Algunas enfermedades, como la diabetes o la isquemia, impiden una correcta comunicación entre las células endoteliales y producen efectos patológicos.

Las células endoteliales no sólo se encuentran en constante comunicación entre sí, sino que también reciben un importante flujo de información desde el propio flujo sanguíneo, siendo las receptoras de diferentes hormonas para transmitir la señal a los tejidos subyacentes o respondiendo ellas mismas. Se ha mencionado ya la insulina, que induce una reducción en la tensión arterial (Bäck, 2012), mecanismo relacionado con la hipertensión sufrida por los individuos diabéticos (Kim, 2006). El TNF- $\alpha$ , por el



contrario, induce inflamación del endotelio, como en otros tejidos, induciendo por parte de las células endoteliales la pérdida parcial de la proteína VE-cadherina para facilitar la extravasación de células del sistema inmune (Seynhaeve, 2014), a cuya inducción de apoptosis resiste gracias a la sobreexpresión de la proteína antiapoptótica TNFAIP3 (Guo, 2014).

Con el tiempo se ha observado que, de hecho, el papel de las células endoteliales en el desarrollo tumoral es de una importancia capital, no sólo por la necesidad de los tumores en rápida expansión de tener acceso a los nutrientes transportados por los vasos formados por aquellas, sino también para remodelar de forma efectiva la matriz extracelular. Esto se debe a la expresión de metaloproteinasas por parte de las células endoteliales para poder abrir hueco y generar nuevos vasos sanguíneos que rieguen todo el organismo (Mauro, 2010), además son capaces de producir por sí mismas esta matriz, secretando fibronectina (Korybalska, 2013). Gracias a estas capacidades también juegan un papel muy importante en la regeneración de tejidos dañados, como el óseo, donde se requiere un intenso trabajo de remodelado de la matriz (Xue, 2013). Además, el endotelio, en su papel de regulador del transporte entre el interior y exterior de los vasos sanguíneos, actúa como frontera que las células cancerígenas deberán superar para poder llevar a cabo la metástasis. Debido a estos dos puntos, se han encontrado multitud de casos en los que las células cancerígenas han alterado sus mecanismos de interacción con las células endoteliales, ya sea por contacto directo con proteínas de superficie (Sennoune, 2014), secreción de fragmentos proteicos señalizadores (Sato, 2014) o proteínas completas (Kim, 2013), o incluso mediante exosomas (Tadokoro, 2013).

En resumen, el endotelio, formado por células endoteliales, resulta de extrema importancia para la homeostasis de un organismo debido a sus funciones de organización del transporte vascular, recepción hormonal, regeneración de tejidos, ayuda al sistema inmune y lucha contra el proceso de metástasis. Por supuesto, en el momento en el que un tejido de esta importancia deja de funcionar correctamente aparecen problemas y enfermedades que pueden llegar a poner en riesgo la vida del paciente.

Un caso patológico especialmente grave para este tejido es la acumulación de colesterol y otras grasas en placas ateromatosas (Ross, 1999) (ver Figura 4). Cuando un exceso de grasas transportadas por las lipoproteínas de baja densidad se acumula en el endotelio receptor, induce una serie de problemas que resultan en la inflamación de la zona y remodelación de la matriz, gracias a las metaloproteinasas de que disponen las células endoteliales. Esta inflamación induce, como se ha comentado, la expresión de

Determinación del efecto de la tensión de oxígeno sobre las Células Progenitoras Endoteliales

proteínas de adhesión al flujo sanguíneo que captan monocitos. Estos monocitos reclutados a la zona afectada, en un intento de retirar las acumulaciones lipídicas, se diferencian a macrófagos y endocitan todo el material que les es posible, llegando a entrar en apoptosis e induciendo por tanto más factores de inflamación que no hacen sino reclutar más células del sistema inmune y agravar el problema (Fenyo, 2013). Además, las células endoteliales estresadas acaban entrando en senescencia, lo que reduce su capacidad proliferativa y aumenta su expresión de proteínas de adhesión solubles, sICAMs (Korybalska, 2013), que también ayudan a que, a la larga el resultado sea la formación de una placa aterosclerótica que obstruye la luz del vaso. En el momento en que esta obstrucción sea completa se provocará un infarto. Otra posibilidad es que quede al descubierto una zona sin cubrir por tejido endotelial, provocando el inicio de la cascada de coagulación que, como se ha explicado, en muchos casos genera

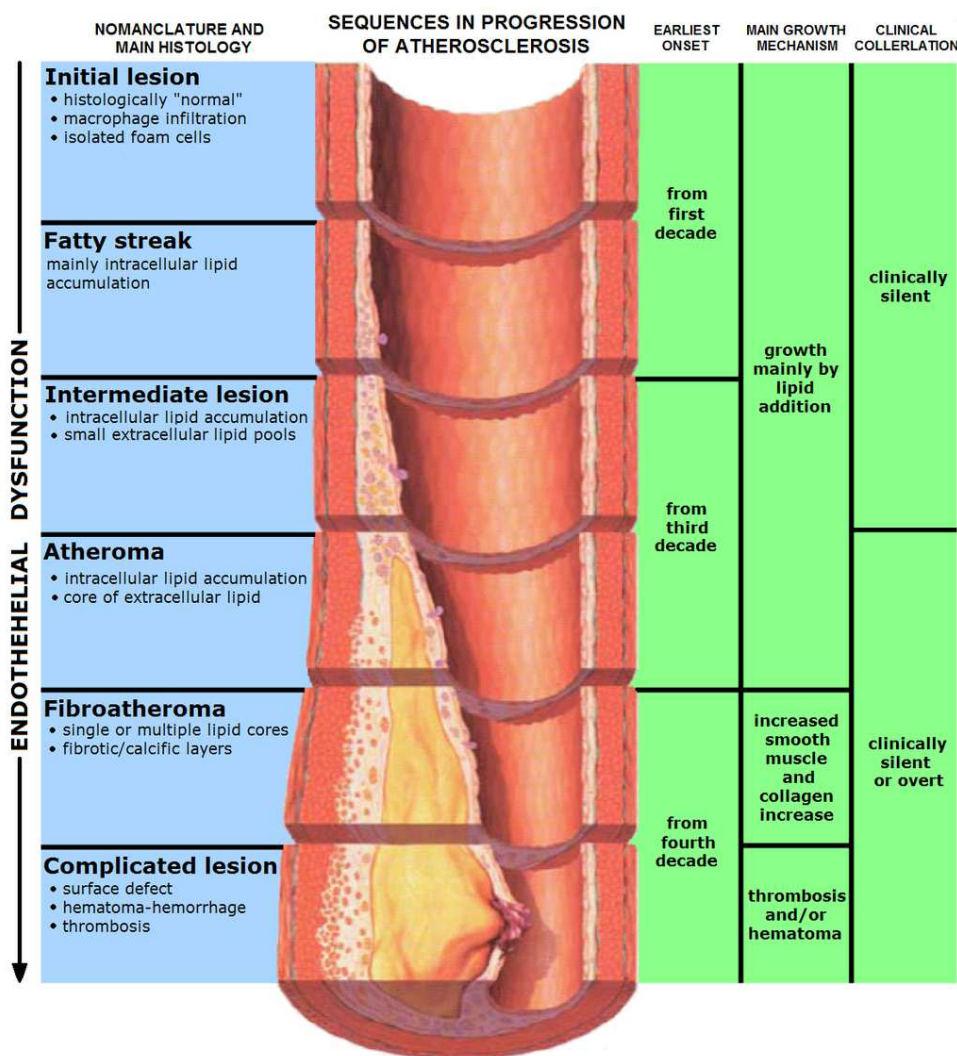


Figura 4: Diagrama que muestra la evolución progresiva de una placa ateromatosa. Extraída de Wikipedia.

Determinación del efecto de la tensión de oxígeno sobre las Células Progenitoras Endoteliales un trombo con la consiguiente posibilidad de infarto en otra zona.

## **Las Células Progenitoras Endoteliales**

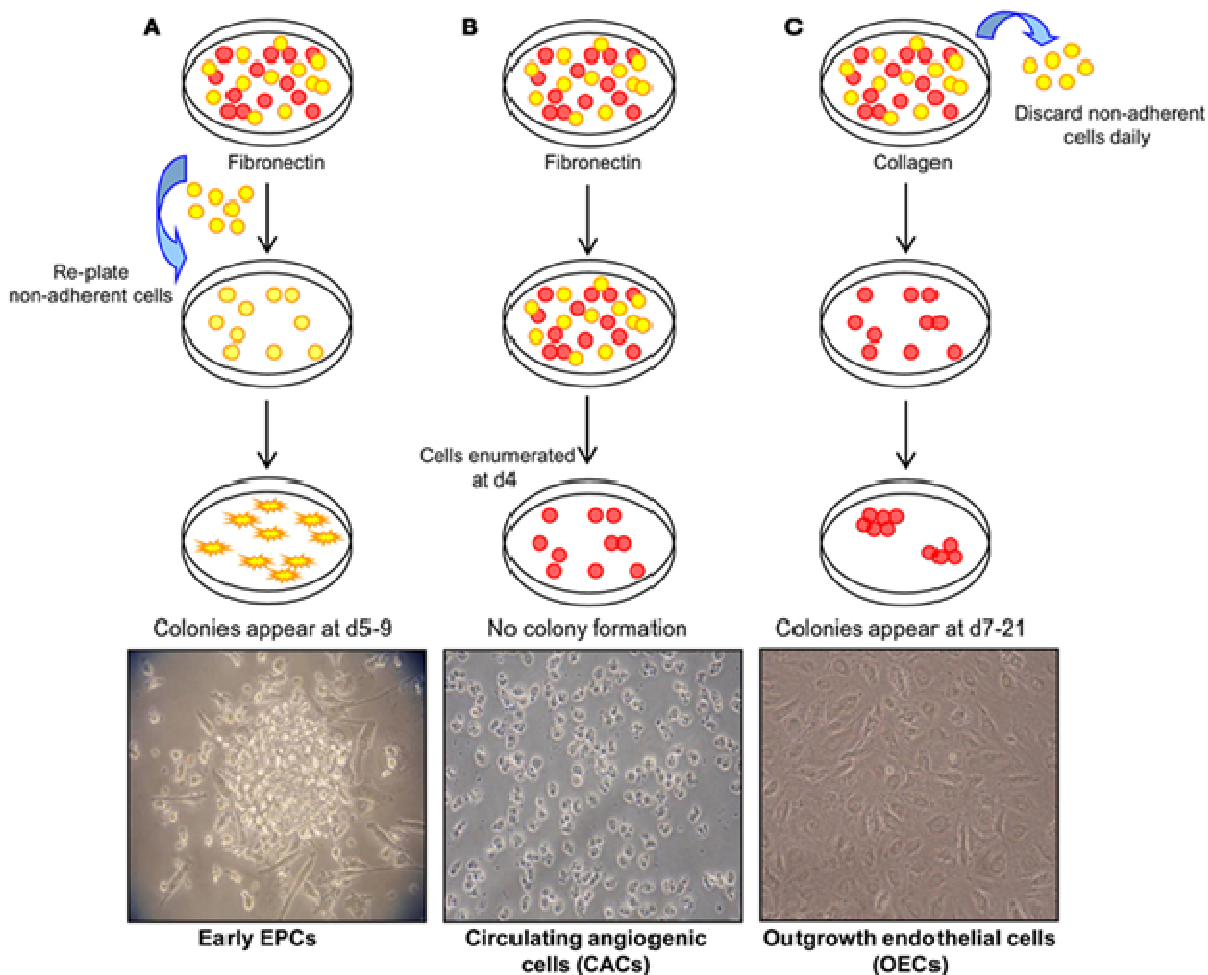
Como ya se ha comentado, las células endoteliales son células adultas, maduras, muy especializadas. Se ha observado que son capaces de llevar a cabo la angiogénesis, la extensión de vasos preexistentes para irrigar correctamente una zona, por ejemplo tras sufrir una herida. Sin embargo, como células diferenciadas que son, su capacidad proliferativa es habitualmente baja, tendiendo a extenderse para cubrir zonas antes que aumentar su número, capacidad excepcionalmente reducida en algunos tejidos, como el de riñón, que los hacen especialmente vulnerables a algunas patologías (Basile, 2012). Sí que se tiene constancia desde hace tiempo (Schwartz, 1976) de la existencia de zonas o reservorios celulares donde la proliferación de estas células es muy superior al resto. Este misterio fue resuelto en 1997 con el trabajo de Asahara et al. dando a conocer las células progenitoras endoteliales (Asahara, 1997).

La definición exacta de célula progenitora endotelial ha variado sensiblemente a lo largo de los años, sin embargo están generalmente aceptadas como una subpoblación minoritaria de las células blancas circulantes en sangre periférica de todos los individuos, tanto adultos como neonatos, que combinan características de célula madre hematopoiética y de célula endotelial. Esto quiere decir que son células que aún no han completado su diferenciación y por lo tanto son capaces de proliferar rápidamente, si resulta necesario, gracias a que poseen actividad telomerasa pero que ya no son multipotentes, si no que han comenzado a adquirir características de célula endotelial y únicamente pueden resultar en este tipo celular.

Tras su descubrimiento en 1997 (Asahara, 1997), pronto se observó que lo que originalmente se había supuesto como una población con únicamente una o dos subpoblaciones celulares era, en realidad, una heterogénea mezcla de clasificación bastante más compleja que aún hoy es fruto de debate. El problema reside en que las células progenitoras endoteliales (EPCs), que se encuentran en pleno proceso de diferenciación, varían con el tiempo sus características y contenido proteico, lo que incluye sus marcadores de superficie, haciendo que la selección por citometría de flujo no sea sencilla. Sin embargo, el FACS es la técnica de preferencia para confirmar la presencia de células progenitoras endoteliales debido a la bajísima proporción existente en la fracción de células blancas de sangre periférica, aproximadamente suponen entre una y diez de cada millón de células mononucleares en sangre,

## Determinación del efecto de la tensión de oxígeno sobre las Células Progenitoras Endoteliales

teniendo en cuenta que el conteaje habitual se encuentra entre 2 y 3 millones por mililitro de sangre y que un individuo normal posee unos 6 litros de sangre, se deduce que, de forma muy aproximada, el número de células progenitoras endoteliales circulando la sangre de un individuo en un momento dado oscila entre las 20.000 y las 200.000, un número irrisorio en biología celular que exige la utilización de técnicas que puedan manejar con facilidad grandes números de células como es la citometría de flujo. De hecho, diversos trabajos (Myka, 2010 y Mund, 2012) inciden en este asunto para buscar un protocolo que resulte apropiado para el problema, incluyendo en el set de anticuerpos empleados inmunoglobulinas contra marcadores propios de células inmaduras, como sería la glicoproteína de membrana CD133, así como marcadores propios de célula endotelial, como sería el receptor de VEGF



**Figura 5:** Esquema de la obtención de células EPCs “tempranas” proangiogénicas, y EPCs “tardías” o “auténticas” que forman colonias endoteliales. Imagen extraída de (Williamson, 2012).

tipo 2 o KDR.

Las pruebas de cultivo tampoco son determinantes por sí mismas, dado que entre las células progenitoras endoteliales se pueden encontrar, también circulando en sangre, trazas de células madre hematopoiéticas (Yoder, 2007), subpoblación que no da lugar a células endoteliales, sino a monocitos. Estas células dificultaron aún más la clasificación correcta de las células progenitoras endoteliales, dado que se ha observado que *in vivo* también ayudan al proceso de extensión de los vasos sanguíneos, pero por otro mecanismo. Este nuevo grupo, también muy heterogéneo, se ha venido a llamar células circulantes angiogénicas (CAC) (Basile, 2014).

Algunas de estas CAC fueron encontradas creciendo junto a las auténticas EPCs en los primeros momentos del cultivo, en un principio son las predominantes, pero posteriormente su número decae hasta desaparecer. A diferencia de aquellas, estas células que originalmente se llamaron EPCs “tempranas” por su aparición en los primeros estadios del protocolo de aislamiento, poseen una expresión inferior de las proteínas VE-caderina, Flt-1 y KDR respecto de las que por entonces se denominaron EPCs “tardías”, llamadas así porque tardan más en ser predominantes en el cultivo, y que ahora se llaman células formadoras de colonias endoteliales, o ECFCs, ya que son las que sí dan lugar a colonias de células endoteliales (ver Figura 5). El funcionamiento de las EPCs “tempranas” o CACs, por el que dieron resultados positivos en las pruebas de angiogénesis y dieron lugar a la confusión, se basa en la secreción de citoquinas proangiogénicas, como serían el VEGF o la Interleukina 8, que ayudan a la proliferación y diferenciación de las auténticas células progenitoras endoteliales (Yoon, 2004).

Estas ECFCs, en principio, parecen ser realmente las células que confieren a los organismos adultos la capacidad de llevar a cabo la vasculogénesis, proceso por el cual se generan vasos sanguíneos *de novo* en una zona que lo requiera. Es un mecanismo de extensión del sistema vascular que, hasta hace un par de décadas, se creía exclusivo del desarrollo embrionario y se diferencia de la angiogénesis, que sí ocurre en individuos adultos, en que en la angiogénesis se produce una extensión de vasos preexistentes, mientras que en la vasculogénesis se crean vasos nuevos e independientes que posteriormente se conectan con el resto del sistema circulatorio. Las ECFCs, una vez aisladas por un protocolo de selección que incluye morfología, capacidad proliferativa y marcadores de superficie, dan lugar a colonias de células morfológicamente similares a células endoteliales normales, con aptitudes de secreción y comunicación también muy similares, así como la mayoría de sus marcadores de superficie, incluyendo diversas

## Determinación del efecto de la tensión de oxígeno sobre las Células Progenitoras Endoteliales

proteínas de adhesión como son las cadherinas o las integrinas, pero con la diferencia importante de poseer un potencial proliferativo muy superior a aquellas.

Precisamente atendiendo a su potencial proliferativo otros estudios (Ingram, 2004) aún las clasifican en subpoblaciones más específicas, concretamente encuentran las células formadoras de colonias endoteliales de alto poder proliferativo (HPP-ECFCs) en sangre extraída de cordón umbilical, asegurando que estas líneas son capaces de alcanzar más de 100 duplicaciones sin aparente pérdida de sus propiedades. Si bien la ausencia de estas células por el momento en muestras de sangre periférica de individuos adultos es debido al envejecimiento de todas las células del cuerpo o realmente se trata de una subpoblación sólo presente durante el desarrollo fetal no está claro.

Debido a que las ECFCs agrupan todas las cualidades buscadas a la hora de reparar endotelio dañado se han usado ya en estudios para determinar si sería posible su uso como biomarcador relacionado con el progreso en pacientes afectados de enfermedades cardiovasculares, y es que, salvo algún trabajo realizado antes de los estudios de optimización de su determinación en sangre (Güven, 2006), la mayoría de estudios al respecto (Fadini, 2012 y Rehman, 2004) parecen indicar que su nivel en sangre es inversamente proporcional al pronóstico del paciente. Este hecho se explicaría como que a mayor nivel de estas células en sangre más efectivos serán los mecanismos de reparación endotelial, tejido cuyo daño es el principal factor causante de estas patologías, aunque si su nivel es un efecto de otros factores de riesgo cardiovascular o una causa en sí misma está por resolver. El principal problema al que se enfrentan este tipo de estudio es el bajo número de estas células circulando requiriendo excelentes protocolos de citometría de flujo (Estes, 2010), o bien, contabilizar otras subpoblaciones que, aunque con menor efecto, también participan en la sustitución y crecimiento del endotelio.

Las pocas células ECFCs que encontramos circulando en un momento dado serían las encargadas del mantenimiento del endotelio, pero para hacer frente a problemas más graves como sería la isquemia o el infarto la importancia recae, más que en este número, en la capacidad de cada individuo de movilizar estas células cuyo reservorio se encuentra en la médula ósea (Asahara, 1999a y Parker, 2012). Se ha visto que en este reclutamiento juega un papel muy importante el VEGF (Asahara, 1999b), indicándose en algunos estudios de seguimiento de cohortes (Fadini, 2012) que el número de ECFCs de hecho baja conforme aumenta el riesgo de infarto pero sufre un brusco aumento cuando éste se produce, aunque sin alcanzar los niveles de los grupos control.

A partir de estas observaciones del efecto beneficioso que tendría un incremento en estas células en pacientes recuperándose de un episodio cardíaco, o que han sufrido por falta de riego en alguna zona, se ha considerado que se podría desarrollar un tratamiento celular a partir de estas células (Fadini, 2012) pudiendo incluso desbancar posibles usos de células madre embrionarias (Asahara, 2000), evitando algunas cuestiones éticas que plantean aquellas. La idea sería extraer de una muestra de sangre periférica esta fracción celular, incluyendo o no otras que podrían ayudarlas, expandirlas *in vitro* para posteriormente reinyectarlas en la zona dañada que requiera un aumento del riego recibido, para acelerar la recuperación tras un infarto, o tal vez incluso para reducir el daño en pacientes con aterosclerosis. No existirían problemas de rechazo ya que el origen de las células sería el propio paciente, pero de nuevo el mayor escollo se encuentra en el bajo número de las células, siendo el paso de expansión *in vitro* crítico para poder alcanzar un número con alguna utilidad. Ya se han realizado algún estudio al respecto con resultados que indican una ligera mejoría con respecto a los controles (Botham, 2013).

## **El Efecto de la Tensión de Oxígeno en el Medio**

De todos es sabido que las condiciones *in vivo* nunca son exactamente iguales *in vitro*, a pesar de todos nuestros intentos por imitarlas para así obtener resultados extrapolables. Una de las condiciones que habitualmente se desvía en cultivos de biología celular es la tensión de oxígeno en el medio, una característica muy importante para algunos tejidos y ante la que pueden responder de diferente forma (Toussant, 2011).

El motivo de esta desviación es, principalmente, la comodidad y facilidad de llevar a cabo el cultivo. En el interior de los organismos superiores la cantidad de oxígeno disponible, esto es disuelto en el medio en que crecen las células, se asemeja al que se obtendría con aproximadamente un 3% en el aire, con algunas excepciones como serían la dermis y epidermis que, gracias a la captación de oxígeno atmosférico, se acerca más al 6 y 18% respectivamente, siendo la epidermis un tejido que no requeriría de oxígeno suministrado por la sangre para respirar (Stücker, 2002). Esta concentración del 3% se desvía bastante de la que disponemos atmosféricamente, un 21%, y por lo tanto para alcanzarla se requieren mecanismos de incubación de mayor complejidad y precio para alterarlo. Típicamente uno de los métodos más empleados para controlar el oxígeno disponible en un incubador es el desplazamiento

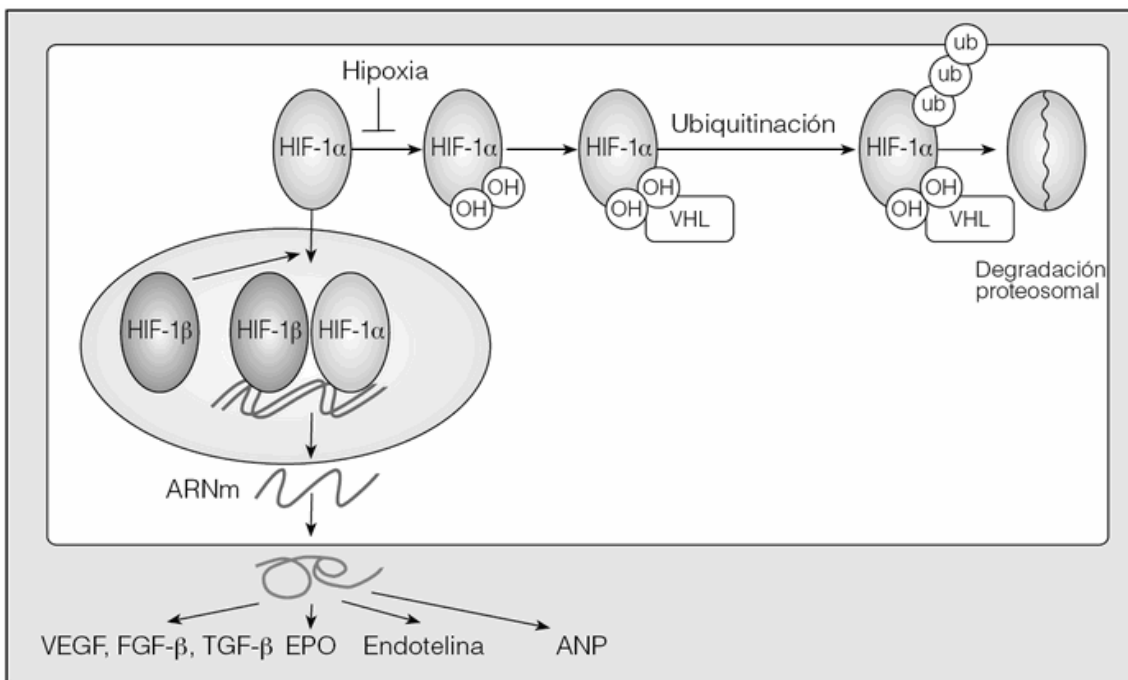


## Determinación del efecto de la tensión de oxígeno sobre las Células Progenitoras Endoteliales

añadiendo nitrógeno, un gas prácticamente inerte, lo que exige un sistema de bombas y sensores, así como un espacio regulable hermético y una fuente de dicho gas, aumentando bastante los costes de su mantenimiento.

La importancia especial del oxígeno disponible se debe a que las células requieren de éste para llevar a cabo la respiración, principal fuente de energía de las células aeróbicas, pero a altas concentraciones el estrés oxidativo causado resulta perjudicial (Kaneko, 2012). Se ha observado que las células procedentes de organismos superiores poseen un margen óptimo de concentración de oxígeno que varía según el tejido, si se supera aumenta la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) que pueden dar lugar a daños en el DNA y estrés oxidativo, y si no resulta suficiente la célula no obtendrá la energía que necesita, pudiendo llegar a iniciar el proceso de apoptosis, y sorprendentemente aumentando también la producción de ROS por mal funcionamiento de la cadena de transporte electrónica mitocondrial (Guzy, 2006).

Dada la importancia de este elemento, las células poseen un sistema sensor de oxígeno que desencadena importantes respuestas en forma de factores de transcripción. Uno de los mecanismos principales, y más estudiados, es el factor inducible por hipoxia 1 (HIF-1) (Abaci, 2010). Se trata de una proteína heterodimérica compuesta por una subunidad alfa de 120 kDa y una beta de 94 kDa, en



**Figura 6:** Regulación del factor de transcripción inducible por hipoxia HIF-1. Imagen extraída de (Nácher, 2007).



condiciones normales la subunidad alfa se mantiene a un nivel basal muy bajo. Esto es debido a la presencia en la célula de prolin-hidroxilasas, con hierro en su centro activo, que catalizan de forma dependiente del oxígeno disponible la adición sobre la subunidad alfa de grupos hidroxilo. Estos grupos hidroxilo actúan, con participación de la proteína supresora tumoral de Von Hippel-Lindau, como diana para la ubiquitinación de HIF-1 $\alpha$ , el cual es rápidamente degradado en el proteasoma (ver Figura 6). Ahora bien, si la disponibilidad de oxígeno baja la subunidad pasa a estar estabilizada, se asocia a la beta y actúa como factor de transcripción de diversos genes. Entre estos genes se encuentran algunos proapoptóticos, como sería el gen NIP3 o p53 (OMIM 603348) para evitar que la célula con una falta de oxígeno continuada de lugar a mutaciones graves, pero también genes para adaptarse a la situación, como serían las enzimas de la ruta de la glicolisis, como GLUT-1 (Abaci, 2010), para aumentar la obtención de energía por rutas independientes de oxígeno como es el ciclo de Krebs. Sin embargo su importancia para con el sistema vascular es que también desencadena la producción de VEGF (Asahara, 1999b), STAT3 (Mattagajasingh, 2012) y afecta al sistema NF- $\kappa$ B (Valen, 2004 y Tabruyn, 2009), importantes promotores de la angiogénesis por parte de las células endoteliales y de las células progenitoras endoteliales. El consumo de oxígeno, además está regulado por el óxido nítrico producido por las células endoteliales y se ha observado que ante una falta de este mediador reducen de forma proporcional su consumo (Clementi, 1999).

La razón por la que la hipoxia desencadena esta respuesta sería para recuperar la normalidad en el tejido isquémico, esto es, con falta de riego. Si no llega oxígeno suficiente a la zona será debido a una mala irrigación y por consiguiente se hace necesaria la remodelación del sistema vascular para que más capilares lleguen al tejido y proporcionen los nutrientes que, en ese momento, no son suficientes. Se ha observado, no obstante, que para los niveles de EPCs una hipoxia generalizada y continuada en el tiempo no resulta beneficiosa para un individuo sano, ya que su nivel cae drásticamente en cuestión de horas, se observó también que pasaban a sobreexpresar la proteína de membrana CXCR-4 que facilita su migración hacia zonas de isquemia (Colombo, 2012).

## Antecedentes e Hipótesis

Se han realizado diversos estudios al respecto, buscando averiguar el efecto y el mecanismo concreto por el que la hipoxia actúa sobre el crecimiento endotelial, la mayoría de los cuales se aproximan a este campo desde el punto de vista de las patologías, ya que hay varias cuya base se encuentra en este efecto. Los tumores sólidos, por ejemplo, debido a su crecimiento acelerado acaban generando un microambiente en su interior donde no llegan los nutrientes que éste requiere, incluyendo el oxígeno por lo que es bastante hipóxico, atrayendo y activando en beneficio del tumor por estos mecanismos las EPCs (Mollet, 2012), llegando a aprovechar dicha influencia para llevar a cabo la transición epitelio-mesenquimal y metastatizar (Yang, 2008). Otro caso en el que el crecimiento de vasos por efecto de la hipoxia es un proceso a evitar es el de la hipertensión pulmonar, enfermedad en la que aumenta la presión en la vasculatura pulmonar conduciendo a problemas cardíacos e hipoxia en la zona. Se ha observado que a la zona se reclutan gran cantidad de células formadoras de colonias endoteliales (ECFCs), o células progenitoras endoteliales “auténticas”, que causan un importante remodelado de los vasos pulmonares y pueden provocar problemas graves (Nijmeh, 2014).

En nuestro grupo se planteó la otra posibilidad, el empleo de las células progenitoras endoteliales como base de un tratamiento celular para paliar efectos de la isquemia o la aterosclerosis. Dada la importante utilidad que tendría semejante técnica es posible encontrar protocolos en los que se ha trabajado para perfeccionar las condiciones de expansión (Hofmann, 2009 y Reinisch, 2009), e incluso el grupo chino de Wu et al. (Wu, 2012) estudia la posibilidad de realizar la expansión sobre una capa de células de soporte, obteniendo al parecer un crecimiento mucho más rápido. Otros grupos han analizado si, tras la expansión a gran escala, las células mantienen sus propiedades (Smadja, 2007), encontrando sólo una sobreexpresión del receptor 2 del VEGF (VEGFR2), y es que no sería útil generar un alto número de células si se pierden sus propiedades terapéuticas en el proceso. Moon y colaboradores (Moon, 2013) plantean el uso de sangre de cordón umbilical guardada como fuente de células progenitoras endoteliales más activas, como se ha comentado antes su capacidad proliferativa es mayor, así como extraer del propio cordón la mayoría del material necesario para la expansión y así evitar el riesgo de contaminación existente al emplear material de cultivo proveniente de animales.

Sin embargo pocos son los trabajos que realizan la conexión entre el efecto proangiogénico de la hipoxia con la necesidad que tendría el hipotético tratamiento de una rápida expansión *in vitro* de las células

extraídas de la fase de células mononucleares de la sangre periférica del paciente. El grupo de Lee et al. (Lee, 2013) realiza un estudio al respecto, determinando la eficacia de la Hipoxia para evitar la senescencia de las células progenitoras endoteliales tras varios pases de crecimiento sucesivos, aunque emplean células circulantes angiogénicas (CACs) en lugar de las, en principio más útiles, células formadoras de colonias endoteliales (ECFCs).

Siguiendo una idea parecida a la hora de plantear este proyecto de Máster Se decidió realizar un estudio de proliferación y mantenimiento de las capacidades angiogénicas a lo largo de sucesivos pases de expansión in vitro de diversas líneas de células formadoras de colonias endoteliales, las células progenitoras endoteliales tardías o auténticas, obtenidos de muestras de sangre periférica de donantes sanos así como de sangre extraída de cordón umbilical de recién nacidos.

Nuestro interés radica en observar si se producen diferencias apreciables cuando las células son mantenidas en un medio adecuado variando la disponibilidad de oxígeno entre el atmosférico habitual en cultivos celulares (21%) y una hipoxia moderada, lo que supone una cantidad de oxígeno en el aire del 4%. Observaciones no sistemáticas al respecto realizadas previamente por el grupo parecen indicar que la hipoxia favorece la proliferación de células progenitoras endoteliales, siendo la idea por tanto llevar a cabo observaciones de forma más rigurosa y sistemática. Para poder determinar si tras la expansión en una u otra condición estas células sufren algún detrimento en sus aptitudes se fueron realizando pruebas a lo largo de los pases comparando los resultados de ambas condiciones. Por último, aprovechando la disponibilidad de las muestras procedentes tanto de adulto como de recién nacido y conocidas las importantes diferencias que parecen existir entre las poblaciones celulares procedentes de una u otra fuente (Ingram, 2004), se realizaron las pruebas con ambas, para poder comparar tanto si se producían diferencias entre las líneas de distinta procedencia como si la diferencia en las condiciones tenía un efecto preponderante en función del origen de las células.

La hipótesis de trabajo es, por todo lo expuesto, que las condiciones de hipoxia en el mantenimiento y expansión de células formadoras de colonias endoteliales en cultivo pueden afectar favorablemente a su capacidad proliferativa y al mantenimiento de sus propiedades, efecto que puede que difiera según el origen de las células.

## Objetivos

Los objetivos planteados en este proyecto son los siguientes:

- Comprobar las diferencias proliferativas entre células procedentes de un donante adulto y un neonato.
- Determinar el ritmo de crecimiento de las células progenitoras endoteliales así como su vida útil, esto es, el número de pases que se mantienen en cultivo antes de alcanzar la senescencia.
- Averiguar si durante toda esa vida mantienen, disminuyen o si hay un momento óptimo para su aprovechamiento en una hipotética implementación sobre un futuro tratamiento celular con base en estas células.
- Observar las diferencias, si las hubiera, de todos los puntos anteriores entre un crecimiento a una tensión de oxígeno habitual en un laboratorio de biología celular, la atmosférica (21%), y un medio con hipoxia controlada del 4%.

Por otra parte, se plantean una serie de objetivos secundarios no directamente relacionados con la hipótesis de partida pero que resulta apropiado llevar a cabo. Éstos incluyen la necesaria puesta a punto en el laboratorio de las técnicas a emplear para cumplir los objetivos mencionados, guardar muestras biológicas de las diferentes condiciones, procedencias y estadíos para ampliar este estudio o llevar a cabo otros relacionados, y por último dilucidar, en la medida de lo posible, si resultará viable el uso de células formadoras de colonias endoteliales en un futuro tratamiento considerando si es ventajoso el empleo en el paso de expansión *in vitro* de una hipoxia moderada.

## Metodología

### Cultivo Celular

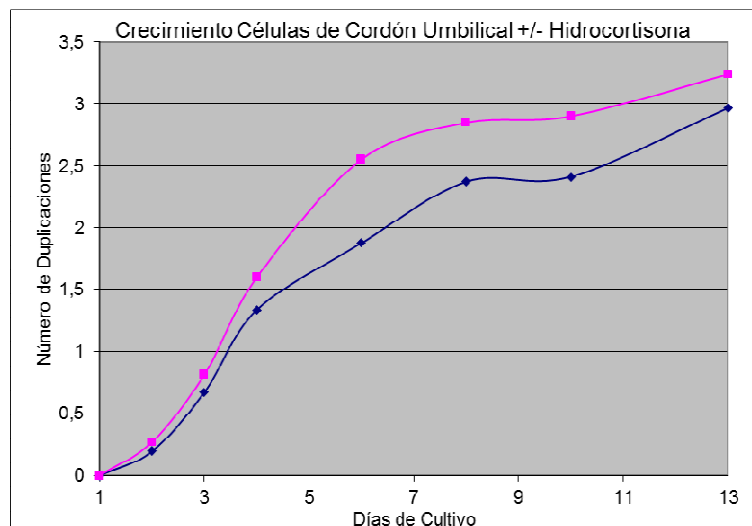
Utilizamos condiciones de cultivo habituales para células adherentes, haciendo especial caso a los protocolos publicados por Hofmann et al. (Hofmann, 2009 y Reinisch, 2009) para células progenitoras endoteliales.

Se utilizó un recubrimiento de la superficie de cultivo con colágeno tipo I (Beckton-Dickinson) procedente de cola de rata, para facilitar la adhesión que posibilita una mejor distribución de las células y un crecimiento mantenido en el tiempo. Si las ECFCs son sembradas sobre fibronectina u otras matrices adherentes, incluso sobre el plástico de las placas de cultivo desnudo, siguen siendo capaces de adherirse, pero a la larga estos cultivos presentan problemas, pierden su adhesión o ven reducida su capacidad proliferativa.

El medio empleado para su crecimiento fue el EGM-2 MV (Endothelial Growth Medium 2 Microvascular, Lonza). Se trata de un medio óptimo para el crecimiento de células endoteliales, de utilidad comprobada para las células progenitoras endoteliales y utilizada en la práctica totalidad de los trabajos publicados al respecto. Incluye medio basal, complementado con suero fetal bovino al 5%, ácido ascórbico, factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), factor de crecimiento similar a insulina 1 recombinante (R3-IGF-1), factor de crecimiento de fibroblastos recombinante (rhFGF) y factor de crecimiento endotelial recombinante (rhEGF) las concentraciones exactas son mantenidas en secreto por la casa comercial. El medio también incluye los antibióticos gentamicina y anfotericina para evitar o minimizar el riesgo de contaminación bacteriana o fúngica. Además desde la casa comercial se proporciona hidrocortisona como otro complemento más, pero gracias a la experiencia de este grupo así como de algún otro (Yang, 2011) se ha observado que este último resulta mejor no añadirlo al medio empleado para el crecimiento de las células progenitoras endoteliales procedentes de sangre de cordón umbilical debido a que su crecimiento se ve ligeramente ralentizado (ver Figura 7). Por lo tanto sólo se añadió en el caso de las células procedentes de donantes adultos, donde sí resulta beneficioso.

El manejo se realizó en un laboratorio con presión positiva, y empleando los protocolos apropiados para mantener la esterilidad en todo momento. Las células se manejaron dentro de este laboratorio en una cabina de cultivo de Telstar modelo BIO II A con la certificación EN 12469-2000.

## Determinación del efecto de la tensión de oxígeno sobre las Células Progenitoras Endoteliales



**Figura 7:** Prueba comparativa del crecimiento de ECFCs de sangre de cordón con (rombos azules) y sin (cuadrados rosas) hidrocortisona en el medio.

Se emplearon dos estufas incubadoras de temperatura (37°C) y concentración de CO<sub>2</sub> (5%) controladas y con filtros HEPA en la entrada de aire. Para los cultivos en normoxia una modelo Hera Cell (Haereus) y para hipoxia una incubadora Forma Series II HEPA Class 100 (Thermo Scientific) cuyo nivel de oxígeno era controlado por desplazamiento por nitrógeno.

## Obtención de las ECFCs

Las células formadoras de colonias endoteliales o células progenitoras endoteliales auténticas, base de este trabajo, eran obtenidas a partir de muestras de sangre de donantes sanos. De acuerdo a la legislación vigente (Ley 14/2007, de 3 de Julio, de Investigación Biomédica. Publicada en el B.O.E. número 159, del 4 de Julio de 2007) todos ellos dispusieron de la información relacionada con el proyecto de investigación y dieron su consentimiento informado, en el caso de la sangre procedente de cordones umbilicales el consentimiento lo proporcionó el tutor legal del neonato, la madre en todos los casos. Las muestras de sangre de cordón umbilical no eran apropiadas para trasplante. Para facilitar y agilizar el proceso se recurrió a la infraestructura del Biobanco de Aragón, entidad dependiente del Instituto Aragonés de Ciencias de la Salud (IACS) dedicada a la recogida y mantenimiento de muestras biológicas, tejidos y órganos para investigación. El grupo ya disponía de células procedentes de sangre de individuos adultos con las que trabajar, pero fue necesario aislar células procedentes de muestras frescas de sangre de cordón umbilical.

Para obtenerlas se siguió un protocolo puesto a punto previamente por el grupo, muy similar al publicado por Hofmann et. al. en 2009 (Hofmann, 2009 y Reinisch, 2009), primero se extrae la fracción

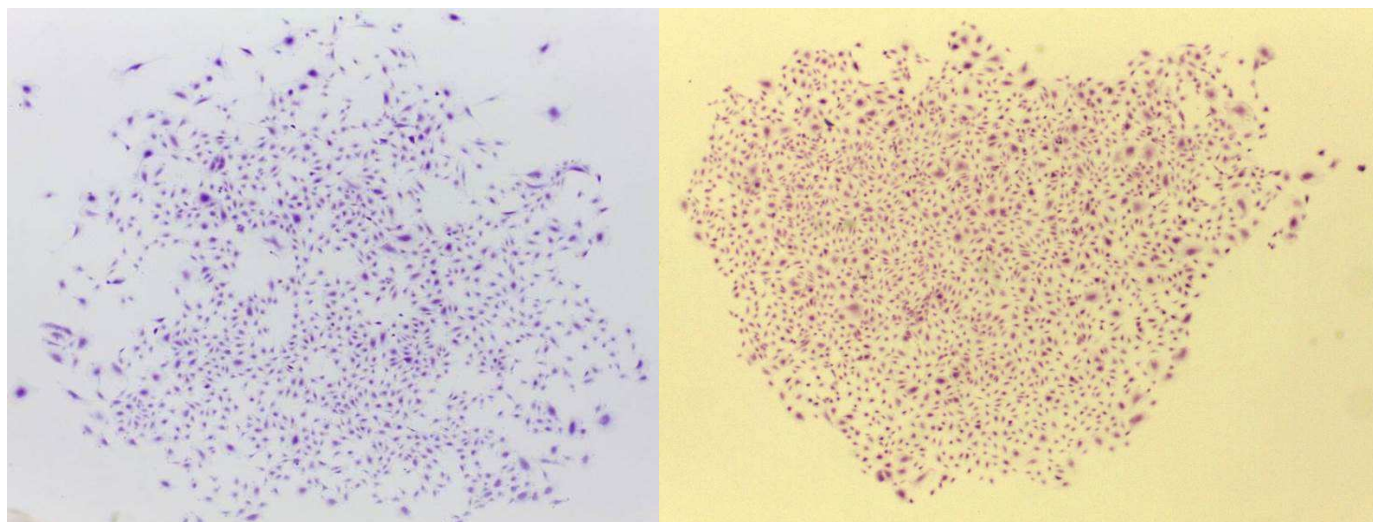
## Determinación del efecto de la tensión de oxígeno sobre las Células Progenitoras Endoteliales

de células mononucleares de la sangre recibida, mediante un procedimiento de separación en gradiente de ficoll:

La muestra de sangre se reparte en tubos falcon de 50mL con un volumen de Ficoll 1,077g/mL Histopaque® (Sigma-Aldrich) igual a la mitad del volumen de muestra que se va a añadir. Se trata de una solución cuya densidad se ajusta para coincidir entre los valores de la fracción de los glóbulos rojos y la de células blancas para separarlas y así permitir una extracción más sencilla de estas últimas. El tubo debe centrifugarse previa adición de la muestra para empaquetar el Histopaque® a 800g, 5 minutos a temperatura ambiente y sin freno en la centrífuga. El modelo empleado era una Laborzentrifugen 3k10 (Sigma-Aldrich).

Las muestras de sangre (que son recibidas con anticoagulantes como el EDTA o el citrato) son muy densas para manejarlas directamente, por lo tanto son diluidas a la mitad empleando una solución de una osmolaridad equivalente, en este caso se empleó la solución equilibrada de Hanks (Sigma-Aldrich). La muestra recibida se deposita entonces cuidadosamente sobre la superficie de Histopaque® procurando no desestabilizar la interfase. Según disponibilidad, también empleamos unos tubos con una membrana porosa, Accuspin® (Sigma-Aldrich) a la altura apropiada para mantener protegida en este paso la superficie del Histopaque® y evitar luego más fácilmente los glóbulos rojos. El tubo de 50 mL es entonces centrifugado de nuevo a 800g durante 15 minutos a temperatura ambiente y sin freno para evitar que se mezclen los componentes. El plasma es retirado con una pipeta Pasteur y luego la fracción de células blancas es recogida y transferida a un tubo limpio.

Una vez aisladas, las células blancas se cuentan y siembran sobre placas de cultivo recubiertas de colágeno a una densidad de  $5 \cdot 10^6$  cels/cm<sup>2</sup>. Se mantienen una semana cambiando el medio todos los días procurando no perder las células en suspensión. De esta forma todas aquellas con capacidad adherente quedarán pegadas a la superficie de colágeno. Como empleamos medio basal endotelial las células progenitoras endoteliales serán las que crezcan más, apenas habrá endoteliales maduras en la muestra ya que se trata de sangre circulante y, de haberlas, apenas formarían colonias dado que su poder proliferativo es mucho menor (Korybalska, 2013). A partir de una semana comienzan a apreciarse por visión directa bajo un microscopio las colonias de ECFCs, claramente distinguibles por su morfología típica de endotelio, con células creciendo en monocapa, de forma redondeada muy compacta y una morfología de las célula poligonal (ver Figura 8).



**Figura 8:** Ejemplos de colonias de células progenitoras endoteliales.

Una vez localizadas se las monitoriza, esperando que alcancen un tamaño de unos cientos de células, lo cual nos indicará que poseen un importante potencial proliferativo y que por tanto es muy probable que se trate, efectivamente, de células progenitoras endoteliales. En ese momento las colonias en cuestión son clonadas de forma individualizada sobre sus propias placas, empleando para ello un anillo de clonaje. Tras un par de pasos de expansión, cuyo número exacto depende del caso, y una comprobación por citometría de flujo de que, en efecto, se trata de las ECFCs que queremos, empleando para ello marcadores CD31, CD34, CD146, VEGFR2 y CXCR4 que deben resultar positivos, así como los marcadores CD14 y CD45 que deben resultar negativos. Se continúa la expansión in vitro hasta conseguir una cantidad de células suficiente para realizar los experimentos.

Es decir, la selección se realiza por criterios morfológicos, de capacidad proliferativa y de marcadores de superficie.

## **Análisis de Crecimiento**

Como ya se ha comentado, uno de los objetivos del proyecto era realizar una comparación en la capacidad proliferativa de las líneas de diferentes orígenes en las distintas condiciones. El estudio se realizó tanto con células procedentes de sangre de cordón umbilical como de sangre de adulto, llevándose a cabo tanto en condiciones de normoxia como de hipoxia, esto es, se realizaron 4 sets de pruebas. Para obtener las medidas de proliferación se llevaron a cabo, principalmente, dos ensayos:



## Determinación del efecto de la tensión de oxígeno sobre las Células Progenitoras Endoteliales

El primero consistió en un seguimiento a largo plazo de las células creciendo en distintas condiciones. Se sembraban 40.000 células en dos placas de 3 centímetros de diámetro, una para normoxia y otra para hipoxia, y se mantenían en cultivo, realizando un cambio de medio cada dos días, hasta que el cultivo se aproximaba a la confluencia. En ese momento las células eran tripsinizadas, centrifugadas, resuspendidas y contabilizadas en una cámara de Neubauer, obteniéndose así la medida de células que habían crecido en la placa y su viabilidad. Por último de esas células el mismo número que se sembró en un principio se sembraba en una nueva placa para repetir el proceso hasta que las células llegan a senescencia y dejan de proliferar.

Esta forma de cuantificar el crecimiento de las células nos proporciona una serie de datos a largo plazo respecto del comportamiento de las células, permitiéndonos prever el número de pases que una línea concreta, en una condición concreta, iba a aguantar antes de entrar en senescencia. A partir de las cifras obtenidas se determinó el número de duplicaciones que se produjo en cada pase mediante la ecuación:

$$[\text{Log}(\text{células finales}) - \text{Log}(\text{células sembradas})] / \text{Log}(2)$$

Haciendo una representación gráfica de las células vivas y las totales en ambas condiciones es posible visualizar fácilmente el ritmo y viabilidad de crecimiento de cada línea en cada condición en cada momento.

El otro ensayo consistió en la realización de un análisis de pocos días del crecimiento. Para ello sembrábamos una cantidad concreta de células, a 5.000 cels/cm<sup>2</sup> para darles margen para crecer, sobre placas con varios pocillos. Parte de las placas se mantenían en normoxia y parte en hipoxia tras la siembra para poder llevar a cabo la comparación. Se les permitía una o dos horas para adherirse a la placa y luego el medio era sustituido, retirando las células que pudiese haber muertas o no adherentes flotando, y se tomaba el primer punto de la curva de crecimiento.

Esta toma se realizaba por el mecanismo de fijar las células de los pocillos, que se hacían de tres en tres para obtener resultados estadísticamente válidos, mediante la adición de glutaraldehído diluido al 1%. Los pocillos eran detenidos de esta forma en las marcas de 1 hora, 24 horas, 48 horas, 3 días, 5 días, 7 días, 9 días y 12 días. Tras haber detenido la totalidad de los pocillos de la placa las células eran teñidas con cristal violeta y lavadas con agua, de tal forma que la cantidad de colorante restante en el pocillo se encontraba en el interior de las células fijadas cuya cantidad era proporcional al número de células vivas en el momento de realizar el fijado. Por último este colorante era extraído con una solución de ácido

## Determinación del efecto de la tensión de oxígeno sobre las Células Progenitoras Endoteliales

acético al 10% y era colocado sobre una placa donde se medía su absorbancia a 595 nm, proporcional a la cantidad de colorante, proporcional a su vez del número de células fijadas, proporcional del número de células vivas en el momento del fijado. Para la realización de estas medidas se empleó un espectrofotómetro de placas Synergy HT (BioTek).

Las medidas de absorbancia eran normalizadas respecto a la medida correspondiente al mismo día de la siembra y se determinaba el número de duplicaciones como el logaritmo en base 2 de esa cifra normalizada, a partir de la representación del número de duplicaciones podemos encontrar un período de crecimiento exponencial. Se calculó el tiempo que es requerido para llevar a cabo una duplicación en esa fase exponencial mediante la ecuación:

$$\text{N}^{\circ} \text{ días de fase exponencial} * \text{Log}(2) / \text{Log}(\text{Absorbancia al final} / \text{Absorbancia al principio})$$

Llevando a cabo el ensayo a lo largo de varios pases podemos apreciar la evolución de las propiedades proliferativas de cada línea en cada condición y comparar los tiempos necesarios para llevar a cabo una duplicación.

## Capacidad Clonogénica

El otro punto que nos interesaba comprobar era en qué condición las células eran más apropiadas para su futuro uso en un tratamiento celular. Y es que no resultaría muy útil poder disponer de unas condiciones de crecimiento que den como resultado un gran número de células pero que no sirvan para nuestros propósitos.

Como aproximación de qué condiciones proporcionarían células más apropiadas nos centramos en su capacidad clonogénica, comprobando su capacidad para formar a partir de una única célula sembrada una colonia completa, midiendo tanto el número de colonias formadas como el tamaño de éstas.

Para ello empleando una superficie amplia, placas de 6 pocillos, se realizaba una siembra de menos de 100 células por pocillo de 3 cm de diámetro, procurando de esta forma que sólo unas pocas llegaran a formar colonias para sí poder contabilizar. La dificultad técnica que suponía sembrar tan pocas células hace que no se pueda considerar la comparación entre el número de colonias por su alto error, sólo el tamaño de éstas, fue necesario desarrollar un protocolo de diluciones seriadas y varios contajes. El

crecimiento se mantenía 12 días en el caso de células procedentes de donante adulto y sólo 10 días las de sangre de cordón umbilical, su gran capacidad proliferativa impide distinguir las colonias si se mantiene más tiempo. De las células sembradas las hay que no son capaces de adherirse, y de las que sí lo hacen, al encontrarse completamente aisladas, bastantes son incapaces de proliferar y entran en apoptosis por falta de señales de supervivencia.

Al día siguiente tras la siembra se procedía a cambiar el medio e intentar localizar las células que se hubieran adherido. Posteriormente el medio se cambiaba cada dos días.

Al igual que hacíamos con los puntos de las curvas de crecimiento de unos pocos días, para el contaje de estas colonias se procedía a su fijado con glutaraldeído al 1% y se visionaban tras una tinción con cristal violeta con la lupa estereoscópica LEICA EZ4 HD (Leica) con cámara empleando el programa LEICA MicroSystemsFramework. Se tomaban imágenes de las colonias y posteriormente eran analizadas mediante el programa gratuito imageJ, mediante la serie de instrucciones que desarrollamos al efecto (ver Anexo).

## **Pruebas de Angiogénesis**

Una de las características más importantes de las células endoteliales, y también de las progenitoras endoteliales, es su capacidad para llevar a cabo la angiogénesis. Este proceso consiste en la extensión de los vasos sanguíneos que estas células conforman para irrigar nuevas zonas del organismo.

Trabajando in vitro esta capacidad puede observarse por la adquisición de una estructura en red específica de este tipo de células. Para ello es necesario colocar las células sobre la superficie de un gel que imite mejor la matriz extracelular que el mero colágeno. Nosotros empleamos Basement Membrane Extract Cultrex (Trevigen), 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 (Chris, 2010) que por encima de 10°C gelifica de forma irreversible. Sobre esta matriz el comportamiento de algunos tejidos se aproxima más al fisiológico, entre ellos el endotelio vascular.

Con el objetivo de comprobar que las células mantenían su capacidad angiogénica tras su expansión se realizó la siguiente prueba:

## Determinación del efecto de la tensión de oxígeno sobre las Células Progenitoras Endoteliales

Se añade el BME Cultrex sobre placas con pocillos  $\mu$ -angiogénesis (Ibidi) de 50 microlitros con doble bisel, estos pocillos especiales permiten un mejor aprovechado del gel gastando menos material. El gel se deja solidificar a 37°C durante 1 hora. Posteriormente se siembran 7500 células y se pone medio y las condiciones que se deseen observar. Esta siembra se mantiene 18 horas para permitir el desarrollo de la estructura en red mencionada. Tras este período deben tomarse imágenes porque las estructuras formadas se degradan progresivamente a partir de entonces. Para ello se fijaron las estructuras con paraformaldehído al 3%, previa retirada del medio y lavado con PBS, y dejamos actuar 30 minutos a temperatura ambiente. Una vez fijadas las células retiramos con PBS el paraformaldehído en exceso y teñimos con colorante Cultrex (Trevigen). El proceso de fijado preserva en gran medida la estructura formada, las imágenes se tomaron de nuevo con la lupa estereoscópica LEICA EZ4 HD (Leica).

El objetivo final era la aplicación de un análisis mediante el programa imageJ para cuantificar la complejidad de estas estructuras en cada caso. Dicho análisis no llegó a realizarse en este trabajo pero sí que se desarrolló la serie de instrucciones en Java necesarias al efecto (ver Anexo).

## Estudio de Marcadores de Superficie

Se realizó un análisis por citometría de flujo, recurriendo al Servicio de Citometría y Separación Celular del IACS en el Centro de Investigación Biomédica de Aragón (CIBA). Para realizar una de estas medidas levantábamos las células con acutasa (PAA), realizábamos un conteo, las resuspendíamos en PBS a 10.000 células en 50  $\mu$ L, las incubábamos con los anticuerpos marcados requeridos en cada caso.

La primera de las medidas que se realizaron mediante esta técnica fue una comprobación, para cada línea aislada, de que realmente se trataba de células progenitoras endoteliales. Tal y como se ha explicado en el apartado de Obtención de las ECFCs se usaron marcadores para CD14, CD31, CD34, CD45, CD146, VEGFR2 y CXCR4. En un análisis posterior para comprobar si había cambios a lo largo de varios pases en normoxia o hipoxia con una línea de células procedentes de sangre de cordón umbilical también se emplearon marcadores para CD3, CD13, CD29, CD54, CD62E, CD62P, CD73, CD90, CD105, CD106, CD117, CD133, CD144, HLA-ABC y HLA-DR. El equipo empleado fue un FACS Aria (Beckton-Dickinson) y el análisis de resultados se hizo con el software Kaluza (Beckman Coulter). La procedencia de los reactivos anticuerpos puede verse en la tabla 1, y en la tabla 2 la de los isotipos de control empleados:

**Tabla 1:** Listado de reactivos anticuerpos empleados en el marcaje celular.

Anti-	Isotipo	Clon	Marcaje	Marca
CD3	IgG1	UCHT1	APC	BD Pharmingen
CD13	IgG1	WM-15 (WM15)	FITC	eBioscience
CD14	IgG2a	TüK4	Pacific Orange	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
CD54	IgG1	15.2	FITC	AbD Serotec
CD62E	IgG2b	TEA2/1	PE	AbD Serotec
CD62P	IgG1	AK-6	Alexa Fluor 647	AbD Serotec
CD73	IgG1	AD2	APC	eBioscience
CD90	IgG1	eBio5E10 (5E10)	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
VEGF-R2	IgG1	89106	APC	R&D
HLA-ABC	IgG2a	W6/32	FITC	eBioscience
HLA-DR	IgG2b	LN3	PE	eBioscience

**Tabla 2:** Listado de reactivos isotipos empleados en el marcaje celular.

Isotipo	Marcaje	Marca
IgG1	FITC	eBioscience
IgG1	PE	eBioscience

## Determinación del efecto de la tensión de oxígeno sobre las Células Progenitoras Endoteliales

IgG1	APC	eBioscience
IgG1	APC	BD Pharmingen
IgG1	FITC	BD Pharmingen
IgG1	Alexa Fluor 647	AbD Serotec
IgG1	FITC	AbD Serotec
IgG1	APC	R&D
IgG1	PE	Invitrogen
IgG1	APC	Miltenyi
IgG2a	FITC	eBioscience
IgG2a	Pacific Orange	Invitrogen
IgG2a	PE	R&D
IgG2a	PE	R&D
IgG2b	PE	eBioscience
IgG2b	PE	R&D
IgG2b	PE	AbD Serotec
IgG1	PE	Miltenyi
IgG1	APC-Cy7	BD Pharmingen
IgG2a	PE-Cy7	Biolegend

## Apoptosis

Otra medida realizada por citometría consistió en una medida del grado de apoptosis en un cultivo de para cada línea dada en cada condición y pase concretos. Para ello se sembraba una placa de 5 cm de diámetro con 60.000 células para normoxia y otra para hipoxia, una vez alcanzaban la fase de crecimiento exponencial se levantaban con acutasa, momento en que nos interesaba conocer este dato. Posteriormente las muestras se incubaban con Anexina V con el fluoróforo FITC, compuesto que une con gran especificidad la fosfatidilserina de la membrana plasmática, expuesta hacia el exterior celular sólo durante la apoptosis. Simultáneamente se incubaban con Ioduro de Propidio, fluoróforo que se une al DNA y que sólo es capaz de acceder al núcleo de la célula cuando su membrana plasmática ha perdido su integridad, lo que ocurre cuando la célula está muerta. De esta forma disponíamos de la viabilidad de los

cultivos conociendo el porcentaje de células que estaban activando el proceso de apoptosis así como cuántas habían muerto ya, por la apoptosis u otras causas. El aparato empleado para realizar estas medidas fue, de nuevo, el FACS Aria (Beckton-Dickinson), y el software fue el FACS Diva (Beckton-Dickinson).

Los datos se muestran en los apartados correspondientes como nivel de apoptosis total, es decir, el porcentaje del total de células que han llevado a cabo o están procesando en el momento de la medida el proceso de apoptosis.

### **Análisis del Ciclo Celular**

La tercera de las medidas citométricas realizadas consistió en la comprobación del porcentaje de células que tenían su ciclo celular activado, es decir, que se encontraban en proceso de división. De nuevo se sembraban 60.000 células sobre una placa de 5 cm de diámetro para normoxia y otra para hipoxia, se levantaban las células con acutasa en el momento en que crecían de forma exponencial, y luego se realizaba una tinción con Ioduro de Propidio, previa permeabilización artificial suave de la membrana plasmática con etanol frío durante 24 horas. De esta forma el fluoróforo teñirá el DNA de la célula, siendo la medida de fluorescencia proporcional a la cantidad de éste. Cuando las medidas son recogidas en un sistema informático se observarán, mayoritariamente, dos poblaciones; una con la cantidad basal de DNA, correspondiente a las células en fase estacionaria del ciclo celular o que se acaben de dividir, y otra con el doble que corresponderá a aquellas que estén a punto de dividirse. Siempre habrá también un pequeño porcentaje de células con una cantidad intermedia de DNA, que lo estuvieran sintetizando en ese momento, pero mediante la aplicación de un programa informático se obtiene la medida del porcentaje de células que se encuentran en las fases S y G2 del ciclo celular, representativo de cuántas están creciendo en un momento dado, este dato se denomina índice de proliferación. El aparato y software empleados fueron FACS Array (Beckton-Dickinson), y el FACS Array Software System (Beckton-Dickinson) respectivamente.

## Resultados

### Análisis de Crecimiento en pases sucesivos

En total se realizaron ensayos de crecimiento a tiempo largo con 5 líneas, tanto en hipoxia como en normoxia.

La primera de las líneas que se estudió fue un vial de células formadoras de colonias endoteliales extraídas de una muestra de sangre periférica de un donante adulto sano que se muestra como A1. La misma prueba se fue realizando con todas las líneas nuevas procedentes de sangre de cordón umbilical obtenidas, gracias a su superior velocidad de crecimiento se pudieron llevar a cabo más curvas de crecimiento. Se recibieron dos muestras de cordón, de la primera pudieron aislarse 4 colonias, pero sólo dos de ellas mantuvo el crecimiento tras la primera semana, las denominadas C1 y C2. De la segunda sólo se pudo clonar una colonia, pero debido a su tamaño rebrotó de las células no extraídas y pudimos recolectar la misma colonia una segunda vez, obteniendo así las líneas denominadas C3.1 y C3.2. El crecimiento de las líneas A1, C1, C2 y C3.1 se muestra en la figura 8. Estas curvas de crecimiento se iniciaron en momento en que se dispuso de un suministro adecuado de las células, lo que significa que el primero de los puntos corresponde al pase 4 para la línea C1, pase 2 para la línea A1, pase 4 para la línea C2 y pase 4 para la línea C3.1

Con la línea A1 se realizaron 8 pases en 30 días hasta su senescencia. En su momento álgido llegaron a las 11,48 duplicaciones de células viables en normoxia y 12,54 en hipoxia.

De la línea C1 no llevamos a cabo más pruebas que esta preliminar para futuros estudios y nos limitamos a congelar todas las células en los primeros pases, no hicimos la comparación normoxia e hipoxia, limitándonos a comprobar cuánto tiempo nos será útil cuando descongelemos dichas células, se realizaron 8 pases a lo largo de 36 días alcanzando las 7,82 duplicaciones de células viables en su punto máximo.

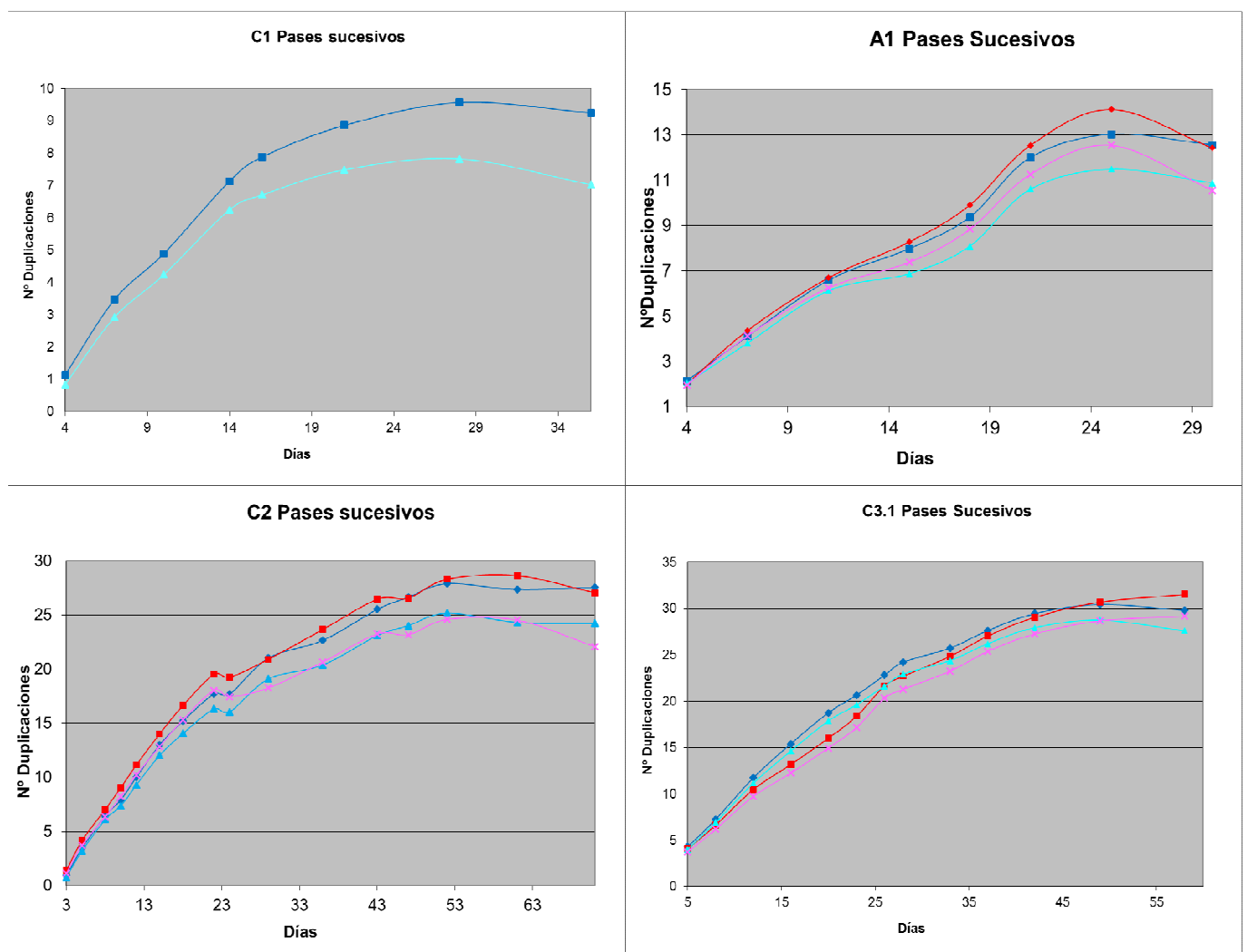
Con línea C3.2, que no se muestra en la figura, tuvimos un problema con las placas y no pudimos continuar su crecimiento más allá de cuatro pases en 16 días, pero no mostraban aspecto de que fueran a parar en los próximos pases, habiendo alcanzado las 12,38 duplicaciones viables en normoxia y 10,23 en hipoxia.



## Determinación del efecto de la tensión de oxígeno sobre las Células Progenitoras Endoteliales

Las líneas C2 y C3.1 estuvieron creciendo bastante tiempo. Sobre la primera se realizaron 16 pases a lo largo de 71 días llegando a las 25,19 duplicaciones en normoxia y 24,59 en hipoxia en su punto álgido. Sobre la línea C3.1 14 pases a lo largo de 58 días, y alcanzó las 28,74 duplicaciones en normoxia y 29,16 en hipoxia.

Hay un importante aumento en la longevidad, en el número y en la velocidad de replicación entre las líneas procedentes de muestras de sangre de cordón umbilical y las de sangre de individuo adulto, especialmente con las líneas C2 y C3.1. Todas las gráficas indican que estas células presentan una fase de crecimiento exponencial que se va agotando paulatinamente. Si calculamos los tiempos que les es

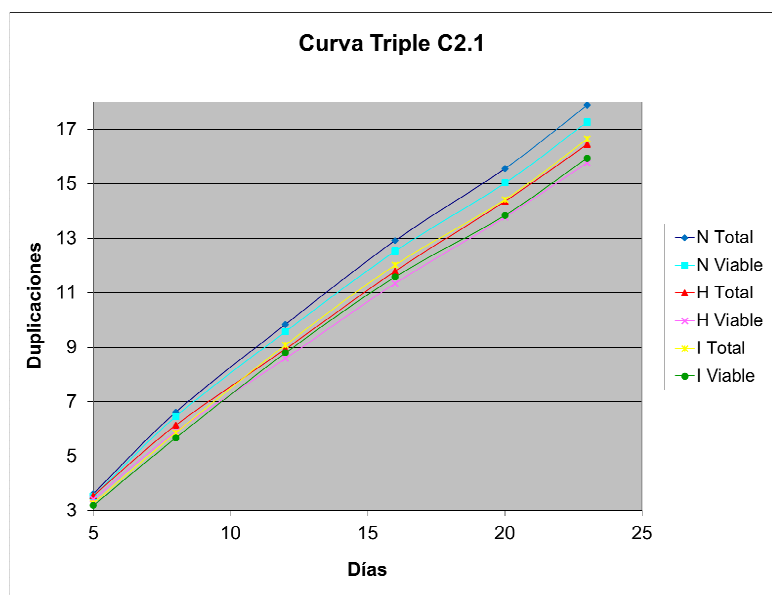


**Figura 9:** Número de duplicaciones obtenidas a lo largo del tiempo para la línea de sangre de adulto A1 y las líneas de sangre de cordón umbilical C1, C2 y C3.1. Se muestran las células viables en normoxia como triángulos azul claro, las viables en hipoxia como cruces rosas, el total de células vivas y muertas en normoxia como cuadrados azules y el total de células vivas y muertas en hipoxia como rombos rojos.

## Determinación del efecto de la tensión de oxígeno sobre las Células Progenitoras Endoteliales

requerido para llevar a cabo una duplicación en dicha fase a cada línea resulta: 2,76 días para A1, 2,24 días para C1, 1,22días para C2 y 1,20 días para C3.1.

Sin embargo prácticamente no se pueden apreciar diferencias entre las medidas realizadas en hipoxia respecto de las tomadas en normoxia, se consideró si podría haber algún factor negativo no considerado que causara una ralentizara el crecimiento en hipoxia contrarrestando su posible aceleración por falta de oxígeno. Como comprobación, se realizó una curva añadido posterior cambiando a diario las condiciones de crecimiento, un día el cultivo se mantenía en normoxia y al siguiente en hipoxia, de esta forma si existiera dicho factor las células se verían afectadas por él y la ralentización propia de las condiciones de normoxia sin darles tiempo a acostumbrarse en ningún momento a la hipoxia acelerante. Se empleó la línea C3.1 en estas tres condiciones: normoxia, hipoxia e intermitente (ver Figura 10). En este caso tampoco se alcanzó la senescencia por falta de tiempo, viéndonos obligados a detener la curva tras 6 pases, aunque ya con este tiempo podemos ver que el cultivo intermitente no se ve especialmente ralentizado respecto de las condiciones de normoxia o hipoxia normales, confirmándose la explicación más simple: las células progenitoras endoteliales no ofrecen por este ensayo muestras de verse afectadas en modo alguno por mantenerse en hipoxia.



**Figura 10:** Curva de crecimiento de la línea C2.1 en condiciones de normoxia, hipoxia e intermitente.

## **Análisis de Crecimiento a tiempos cortos**

Trabajando a tiempos cortos permitió obtener curvas de crecimiento propias de una serie de pases sucesivos. Se empleó una línea proveniente de una muestra de adulto, la A1, de la que se realizaron experimentos en los pases 2, 3, 4, 5 y 6, los 5 primeros pases útiles, tomando puntos a lo largo de 12 días de cultivo tal y como se ha explicado en el apartado de Metodología (ver Figura 11 izquierda).

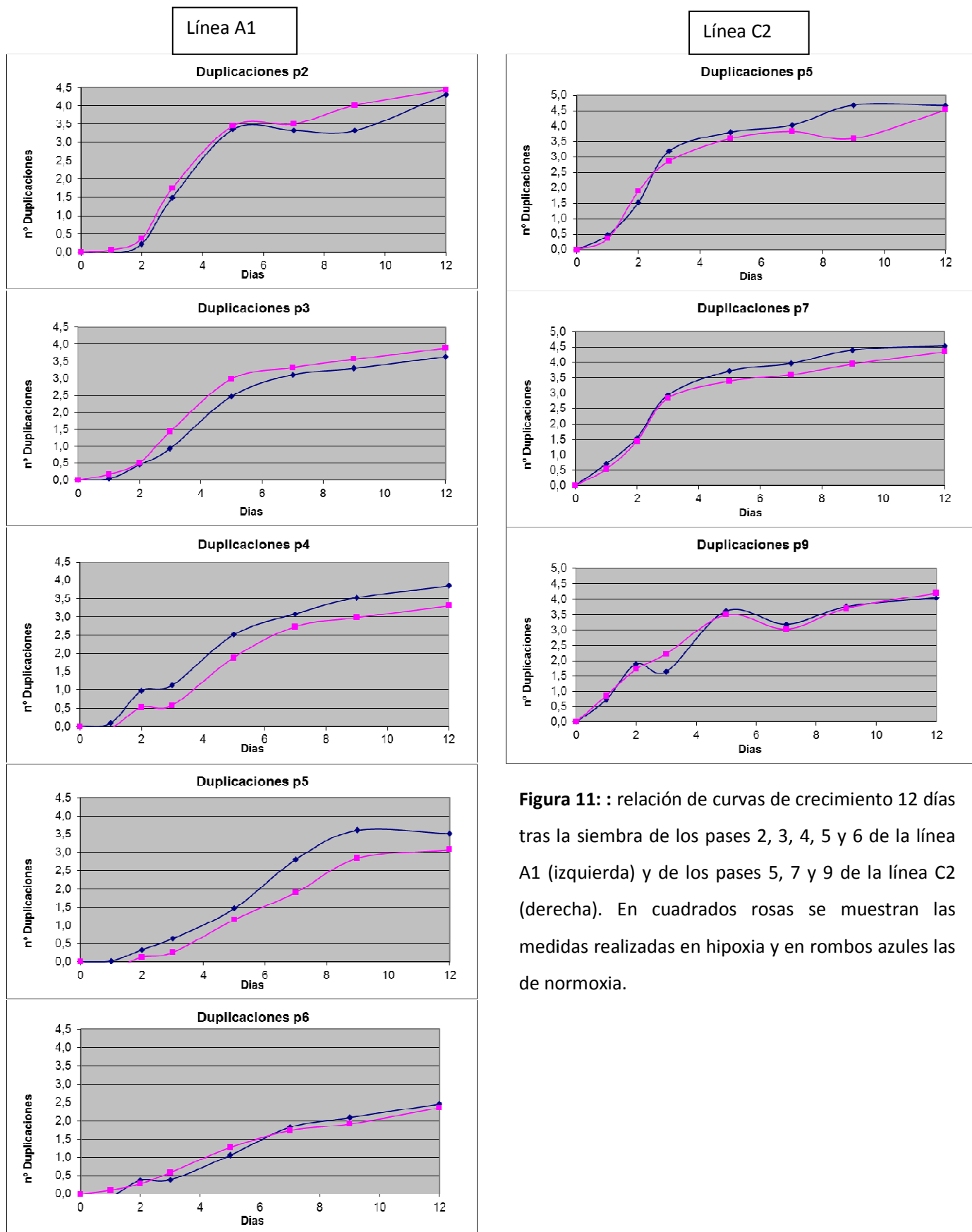
El mismo experimento se llevó a cabo empleando una línea proveniente de una muestra de sangre de cordón umbilical, la C2. También se tomaron medidas durante 12 días, pero debido al ritmo de crecimiento más rápido de esta línea proveniente de cordón se realizaron las pruebas sobre pases alternos, comenzando por el primer pase en el que la cantidad de células disponible era suficiente. Se tomaron entonces los pases 5, 7 y 9 como representación de su evolución (véase la figura 11 derecha).

Podemos observar un crecimiento celular típico, con una primera fase de latencia de adaptación, una de expansión exponencial y por último una fase estacionaria. Dado que el medio era sustituido regularmente esta detención del crecimiento ha de ser debida a que se alcanza la confluencia en los pocillos, ya que las células formadoras de colonias endoteliales crecen en monocapa. Conforme mayor es el pase más tarde se alcanza este plato en el crecimiento, indicativo de que el ritmo de crecimiento se reduce según envejecen las células, proceso bastante más acusado en aquellas células que procedían de sangre de donante adulto.

Se puede ver que a más alto es el pase, y por tanto más edad tienen las células, menor es el número de duplicaciones que se alcanzan al llegar a confluencia. Esto es debido a que las células endoteliales van perdiendo su capacidad de proliferación pero mantienen la necesidad de cubrir todo el espacio, por lo que se van haciendo más grandes, resultando en un número final de células menor. No obstante en el caso del pase 6 de la línea A1, donde el número final de duplicaciones es sensiblemente menor, es posible que el motivo sea que se haya reducido tanto la velocidad de proliferación que sencillamente no hayan llegado aún a confluencia.

También se aprecian picos no homogéneos de crecimiento en la fase exponencial, seguramente debidos al alto ritmo de crecimiento de las células que en algún caso podrían haber llegado a agotar el medio.

## Determinación del efecto de la tensión de oxígeno sobre las Células Progenitoras Endoteliales



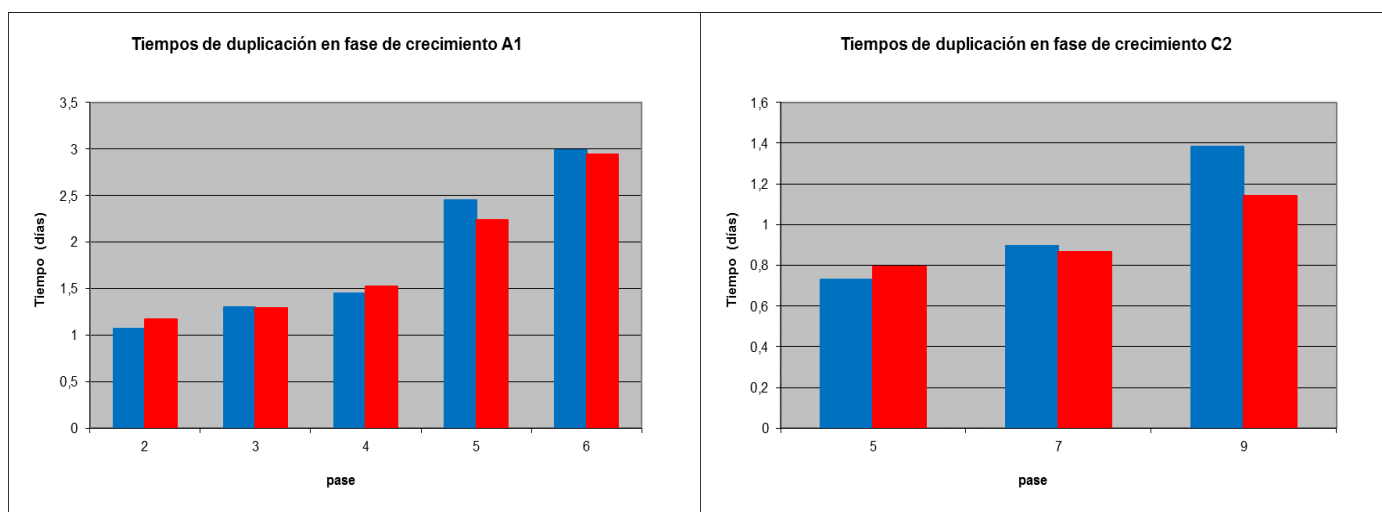
**Figura 11:** relación de curvas de crecimiento 12 días tras la siembra de los pases 2, 3, 4, 5 y 6 de la línea A1 (izquierda) y de los pases 5, 7 y 9 de la línea C2 (derecha). En cuadrados rosas se muestran las medidas realizadas en hipoxia y en rombos azules las de normoxia.

## Determinación del efecto de la tensión de oxígeno sobre las Células Progenitoras Endoteliales

Extrayendo la zona de cada curva en que la expansión se produce de forma exponencial y calculando el tiempo de duplicación para cada pase de cada condición obtenemos los datos reflejados en la figura 12. Aquí se muestra el resultado de dividir el número de días transcurridos en fase de crecimiento exponencial entre el número de duplicaciones producidas.

Mediante este cálculo podemos confirmar una vez más que el ritmo de crecimiento de las células procedentes de sangre de cordón umbilical es más rápido que la contraparte de adulto y que a mayor es el pase más tardan en producirse las duplicaciones.

También se determina una ausencia de diferencias de importancia entre los tiempos necesarios para llevar a cabo una duplicación entre las condiciones de hipoxia y normoxia, que son prácticamente iguales en la mayoría de casos.



**Figura 12:** Tiempos en días necesarios para producirse una duplicación en la fase exponencial de crecimiento en cada pase para las líneas A1 de adulto y C2 de cordón umbilical. Medidas tomadas en las condiciones de normoxia (mostradas en azul) e hipoxia (mostradas en rojo).

## Ensayo Clonogénico

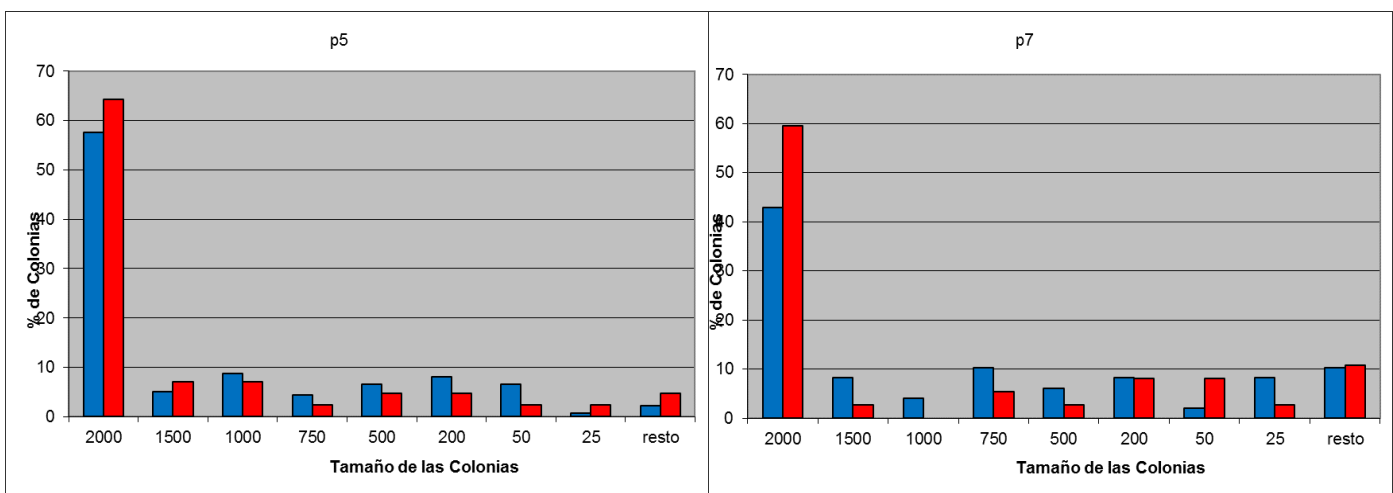
Como se ha comentado, aparte de la proliferación, el otro punto de importancia del proyecto era observar en qué condiciones las células poseían unas mejores capacidades para la formación de nuevos vasos sanguíneos y reparación de los dañados para aplicarlas como tratamiento celular. Consideración que aproximamos a su capacidad para formar colonias a partir de una única célula. Este ensayo se llevó a

## Determinación del efecto de la tensión de oxígeno sobre las Células Progenitoras Endoteliales

cabo empleando tres líneas celulares, las procedentes de donante adulto denominadas A1 y A3 (véase la figura 14) y la de cordón C2 (véase la figura 13). El ensayo se repitió para pases sucesivos y se compararon las condiciones de normoxia e hipoxia.

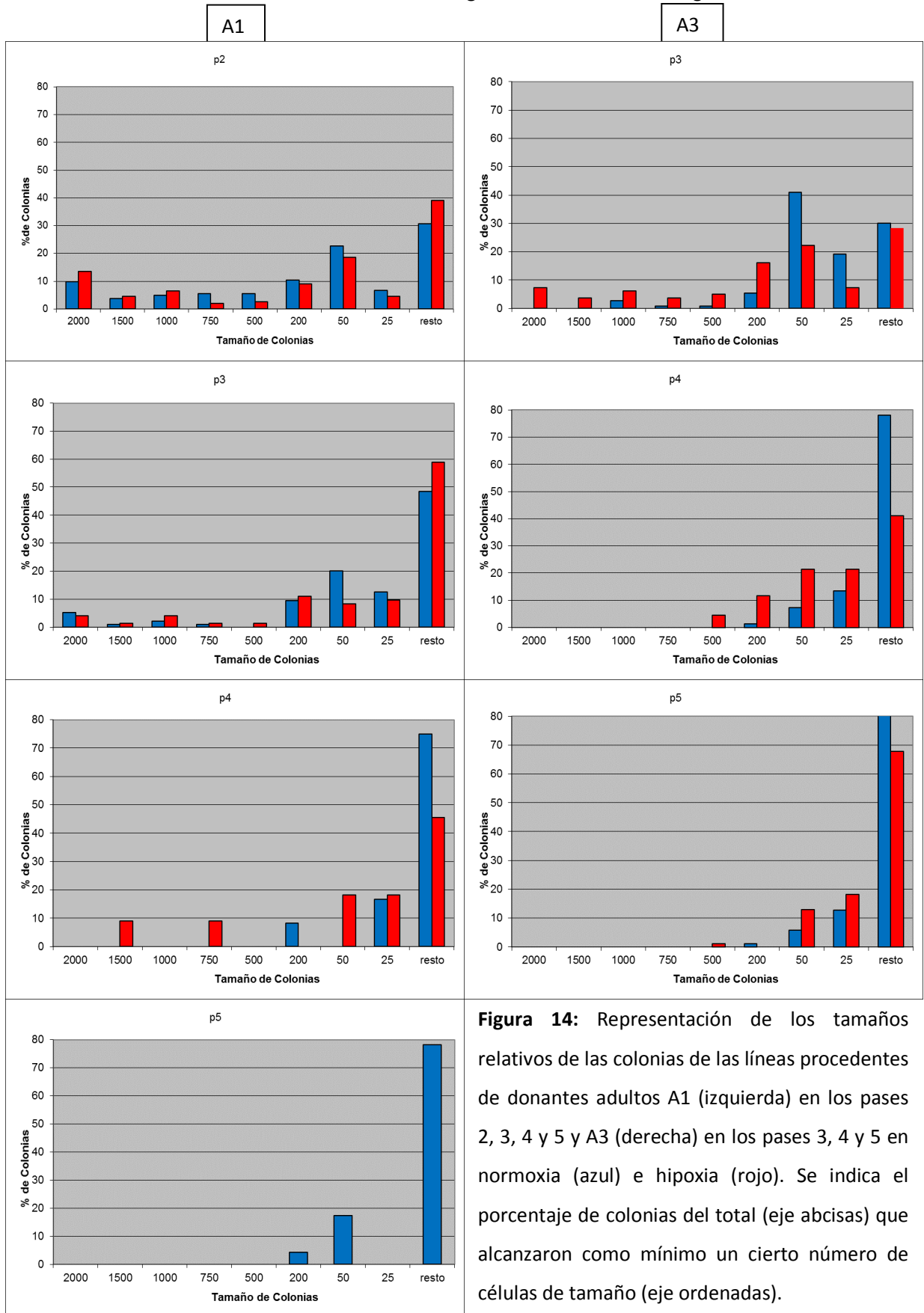
Con la idea de observar la evolución a lo largo de la vida útil de cada línea celular de su capacidad proliferativa se repitió para cada línea el experimento a lo largo de varios pases. En la línea A3 se realizó a lo largo de tres pases sucesivos. En la línea A1 pudo realizarse en ambas condiciones en cuatro pases sucesivos, intentamos continuar pero en el quinto pase prácticamente no se habían producido colonias en hipoxia, por lo que sólo podemos mostrar el resultado de la contabilización en normoxia. Pases sucesivos dieron cantidades aún menores de colonias, por lo que no se muestran aquí. El número de colonias obtenidas se muestra en la tabla 3.

De la línea de cordón, la C2, se muestran los resultados obtenidos para los pases 5 y 7. No se repitió el experimento en este caso en pases sucesivos debido a que esta línea proveniente de cordón creció a una velocidad muy superior a sus equivalentes de adulto, siendo por tanto impracticable coordinar tantos experimentos simultáneos optándose en vez por realizar la prueba únicamente sobre los pases impares como representación de su evolución. La razón de mostrar únicamente dos pases de esta línea es por mera falta de tiempo, tuvo que congelarse ya que podría haberse continuado varios pases más.



**Figura 13:** Representación de los tamaños relativos de las colonias de la línea procedentes de cordón umbilical C2 en los pases 5 y 7 en normoxia (azul) e hipoxia (rojo). Se indica el porcentaje de colonias del total (eje abcisas) que alcanzaron como mínimo un cierto número de células de tamaño (eje ordenadas).

## Determinación del efecto de la tensión de oxígeno sobre las Células Progenitoras Endoteliales



**Tabla 3:** Número de colonias obtenidas en los ensayos clonogénicos.

Línea	A1			A3			C2	
Condición	Hipoxia	Normoxia		Hipoxia	Normoxia		Hipoxia	Normoxia
p2	156	163	p3	81	110	p5	110	137
p3	73	95	p4	112	81	p7	37	49
p4	11	12	p5	93	86			
p5		23						

Queda patente de nuevo la mayor capacidad de las células provenientes de cordón umbilical que las de adulto, obteniéndose con aquellas colonias de tamaño extraordinariamente superior, máxime si tenemos en cuenta que debido a su rápida progresión dichas colonias estuvieron creciendo dos días menos que sus contrapartes de donantes adultos.

Sí se observan ahora diferencias reseñables entre las medidas realizadas en hipoxia respecto de las de normoxia, encontrando porcentajes mayores de colonias más grandes en el reparto, sugiriendo un efecto, al menos a este respecto, de las diferentes condiciones empleadas durante el ensayo.

Respecto al total de colonias obtenidas queda claro que, tal como se ha indicado, 100 células resulta un número demasiado bajo como para confiar en obtener información de este dato, ya que encontramos casos en que se obtuvieron más colonias que las células que se intentaron sembrar. Sí parecen indicar que a mayor pase menos células son capaces de sobrevivir por su cuenta e iniciar una colonia.

## Apoptosis y Ciclo Celular

Las pruebas de apoptosis y ciclo celular se realizaron de forma simultánea, para que los datos de ambas técnicas hicieran referencia a cada línea en las mismas condiciones. Se escogieron pases según la disponibilidad en el momento, debido a que debíamos coordinarnos con el Servicio de Citometría y Separación Celular del IACS. Escogiendo, no obstante, siempre un momento en que las células se encontrasen en pleno crecimiento para poder realizar comparaciones útiles.

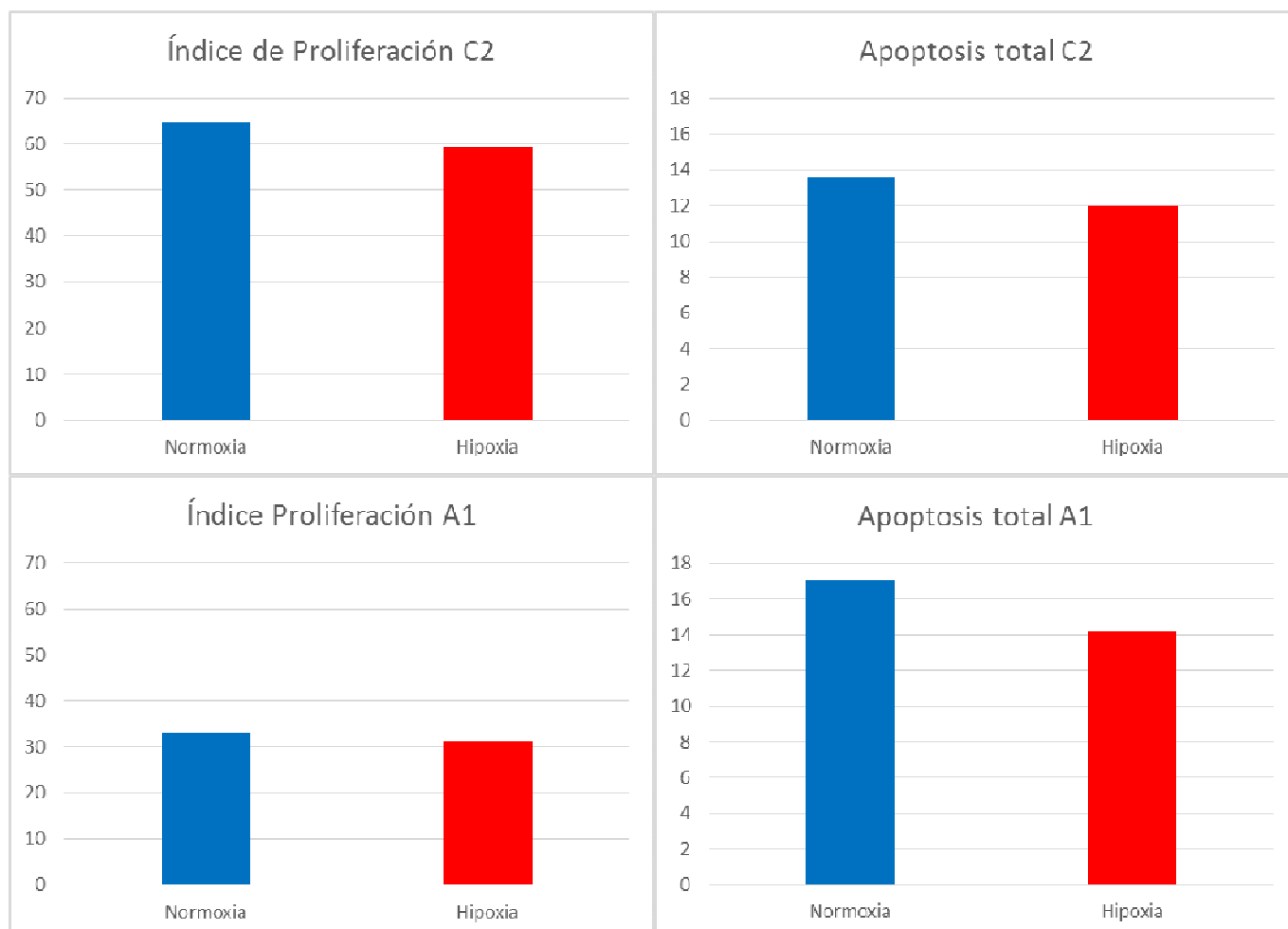
Se compararon en condiciones de normoxia e hipoxia células adultas y de cordón umbilical, empleando las líneas A1 en su pase 4 y C2 en su pase 8 (ver Figura 15) respectivamente. A pesar de la diferencia de



### Determinación del efecto de la tensión de oxígeno sobre las Células Progenitoras Endoteliales

pases podía apreciarse que en ese momento ambas líneas estaban lejos de alcanzar la senescencia. La línea C2 presentaba unos niveles anómalos de DNA en algunas células, por lo que se realizaron dos medidas, ambos resultados fueron similares y en la figura se muestra la media de ambas. El ajuste óptimo de estos datos por parte del programa informático empleado indicó que se trataba de una población aneuploide importante y en crecimiento, con un índice de proliferación de 58,7% en normoxia y 51,2% en hipoxia. Resulta sorprendente porque las células tetraploides suelen ser senescentes y no entran en el ciclo celular (Borradaile, 2010), y las poblaciones cancerígenas no acostumbran a tener una cantidad fija de DNA presentando un número de cromosomas muy variable (Thompson, 2011).

Las diferencias proliferativas son pequeñas, apenas de un 7%, pero parecen indicar que la proliferación en hipoxia es algo menor. Las diferencias en apoptosis, que rondan el 15%, indican que la hipoxia protege ligeramente de la muerte celular.



**Figura 15:** Índice de Proliferación y Apoptosis de las líneas C2 (arriba) de cordón umbilical y A1 (abajo) de adulto en normoxia (azul) e hipoxia (rojo).

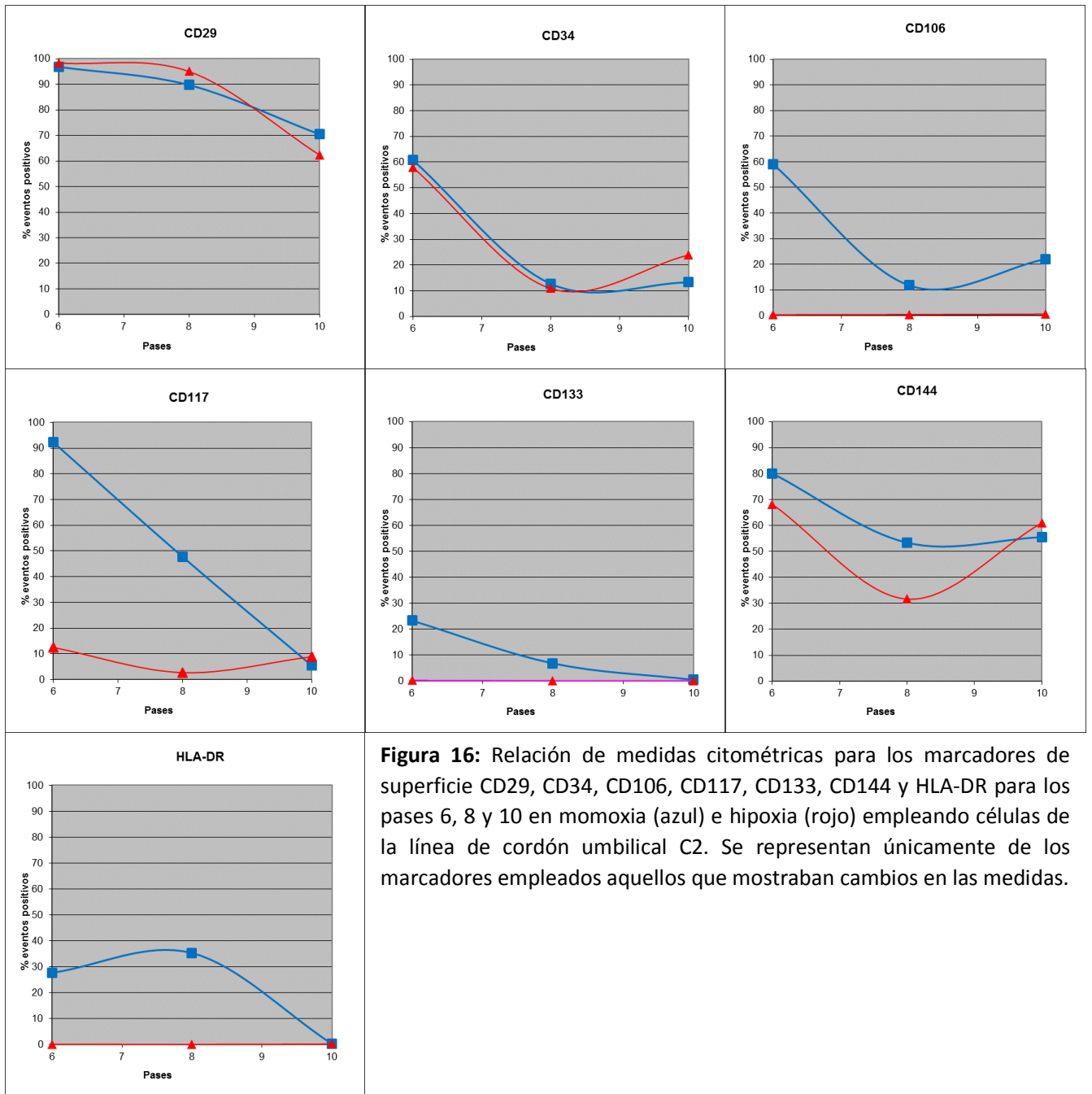
## **Marcadores de Superficie**

Las pruebas de marcadores de superficie se realizaron sobre la totalidad de las líneas aisladas, todas dieron los resultados esperables, positivo para CD31, CD34, CD146, VEGFR2 y CXCR4 y negativos para CD14 y CD45, indicando que se trataba siempre de células progenitoras endoteliales y no otra posible subpoblación.

Sobre células de la línea C2 procedente de sangre de cordón umbilical en los pases 6, 8 y 10, se realizó además un seguimiento tanto en normoxia como en hipoxia con un abanico más amplio de marcadores para apreciar si se producían variaciones de interés. 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.

La mayoría de los marcadores permanecían positivos o negativos en todas las medidas, sin embargo hubo algunos cuyos cambios podrían resultar interesantes, que son los representados en la figura 16. Aquí vemos una tendencia general a lo largo de los diversos pases a la pérdida de algunos marcadores que no son específicos de las células progenitoras endoteliales, un cambio común a las células mantenidas en ambas condiciones pero en la que las células cultivadas en hipoxia parecen llevar una cierta ventaja respecto a las de normoxia para la mayoría de los marcadores.

## Determinación del efecto de la tensión de oxígeno sobre las Células Progenitoras Endoteliales



**Figura 16:** Relación de medidas citométricas para los marcadores de superficie CD29, CD34, CD106, CD117, CD133, CD144 y HLA-DR para los pases 6, 8 y 10 en momoxia (azul) e hipoxia (rojo) empleando células de la línea de cordón umbilical C2. Se representan únicamente de los marcadores empleados aquellos que mostraban cambios en las medidas.

## Pruebas con Cloruro de Cobalto

Ante la presencia de modificaciones en el comportamiento de las células formadoras de colonias endoteliales según si se mantenían en normoxia o en hipoxia se consideró la participación del factor de transcripción inducible por hipoxia 1 (HIF-1). Con el objetivo de poder disponer de un marco de comparación para realizar pruebas de cantidad y expresión de esta proteína se recurrió a los cultivos con cloruro de cobalto. Al cultivar las células con este compuesto se ven expuestas al catión divalente de cobalto, el cual es capaz de sustituir al hierro en diversas enzimas, incluyendo el presente en el centro catalítico de las prolil-hidroxilasas encargadas de iniciar el proceso de degradación de la subunidad alfa de HIF-1 tal como se ha explicado en la introducción de esta memoria.

Sin embargo el  $\text{CoCl}_2$  resulta nocivo para los cultivos celulares porque ese mismo efecto inhibitorio es extensivo a muchas otras enzimas, por lo que como primer paso se decidió caracterizar en una serie de ensayos comparativos similares a los ya comentados si había diferencias entre cultivos mantenidos con concentraciones crecientes de la sal. Concretamente se usaron 50, 100 y 200 nM. Con el objetivo de que la comparación fuese total, se llevaron a cabo las pruebas simultáneamente tanto sobre líneas procedentes de muestras de sangre de donante adulto como de sangre obtenida de cordón umbilical.

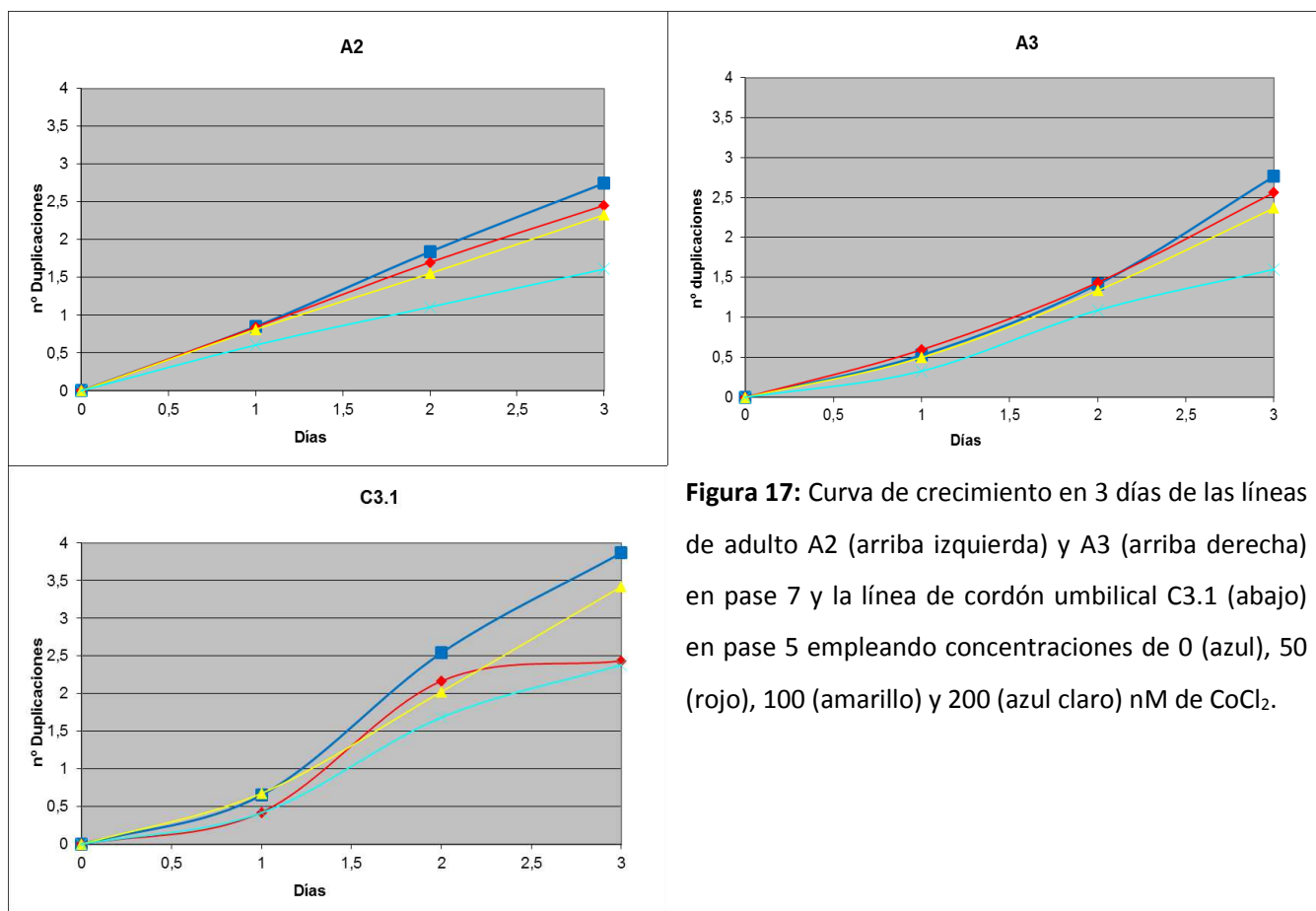
## Análisis de Crecimiento a Tiempos Cortos

Se realizaron pruebas de crecimiento similares a las descritas previamente, pero tomando medidas en los días 0, 1, 2 y 3, con el objetivo de comprobar si la velocidad de proliferación se veía afectada por el  $\text{CoCl}_2$  (ver Figura 17). Las concentraciones de sal empleadas fueron 0, 50, 100 y 200 nM cloruro de cobalto. Se trabajó con las líneas procedentes de donante adulto A2 en su pase 7 y A3 en su pase 7 y la línea procedente de cordón umbilical C3.1 en su pase 5.

Atendiendo a los resultados se deduce lo que cabría esperar de un compuesto nocivo añadido al medio de cultivo, a mayor es su concentración más impedido está el crecimiento, con la excepción de una medida errónea con la línea C3.1 con 50 nM de  $\text{CoCl}_2$ , siguen una evolución regular. Es de interés mencionar que el paso de 100 nM a 200 nM resulta en un impedimento muy superior que el paso de 50 nM a 100 nM, dando a entender que la nocividad aumenta de forma exponencial con la cantidad del

Determinación del efecto de la tensión de oxígeno sobre las Células Progenitoras Endoteliales compuesto añadido. También es reseñable el hecho de que, incluso con 200nM de  $\text{CoCl}_2$ , se aprecia crecimiento celular, que no llega a detenerse con las cantidades usadas en ningún caso.

La línea procedente de cordón umbilical muestra de nuevo una mayor capacidad proliferativa respecto las de adulto, aunque al ser de un pase más temprano no es un dato tan indicativo como en otras medidas.



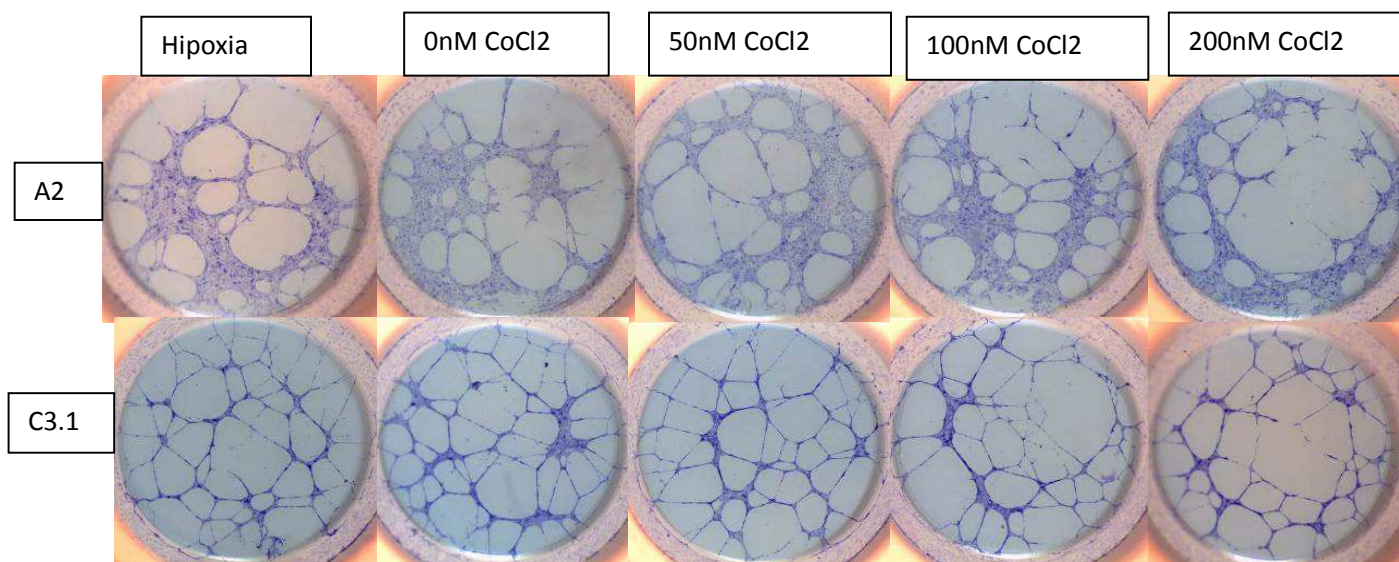
**Figura 17:** Curva de crecimiento en 3 días de las líneas de adulto A2 (arriba izquierda) y A3 (arriba derecha) en pase 7 y la línea de cordón umbilical C3.1 (abajo) en pase 5 empleando concentraciones de 0 (azul), 50 (rojo), 100 (amarillo) y 200 (azul claro) nM de  $\text{CoCl}_2$ .

## Pruebas de Angiogenesis

Tal y como se hizo con todas las líneas aisladas de células progenitoras endoteliales, era necesario comprobar que las células con  $\text{CoCl}_2$  mantenían su comportamiento endotelial. Para ello se realizó sobre ellas la prueba de sembrado sobre gel BME Cultrex, tal y como se explica en el apartado de Metodología. El resultado fue positivo en todos los casos (ver Figura 18) con ligeras diferencias indicando que una mayor concentración de cobalto suponía un pequeño impedimento para el normal comportamiento de las células. Se emplearon la línea A2 y C3.1 de sangre de cordón umbilical, ambas en pase 10. Esta última

## Determinación del efecto de la tensión de oxígeno sobre las Células Progenitoras Endoteliales

adquirió unas estructuras más complejas que la línea de adulto, de forma similar a otras medidas que indican un comportamiento más propio de célula progenitora endotelial para las células de neonato. Se realizó la prueba en condiciones de hipoxia así como de normoxia sin  $\text{CoCl}_2$  y con 50, 100 y 200 nM de  $\text{CoCl}_2$ .



**Figura 18:** Ensayo de angiogénesis sobre células de la línea de adulto A2 (arriba) en el pase 10 y la línea de cordón umbilical C3.1 (abajo) en pase 10 en hipoxia y normoxia con concentraciones de 0, 50, 100 y 200 nM de  $\text{CoCl}_2$ .

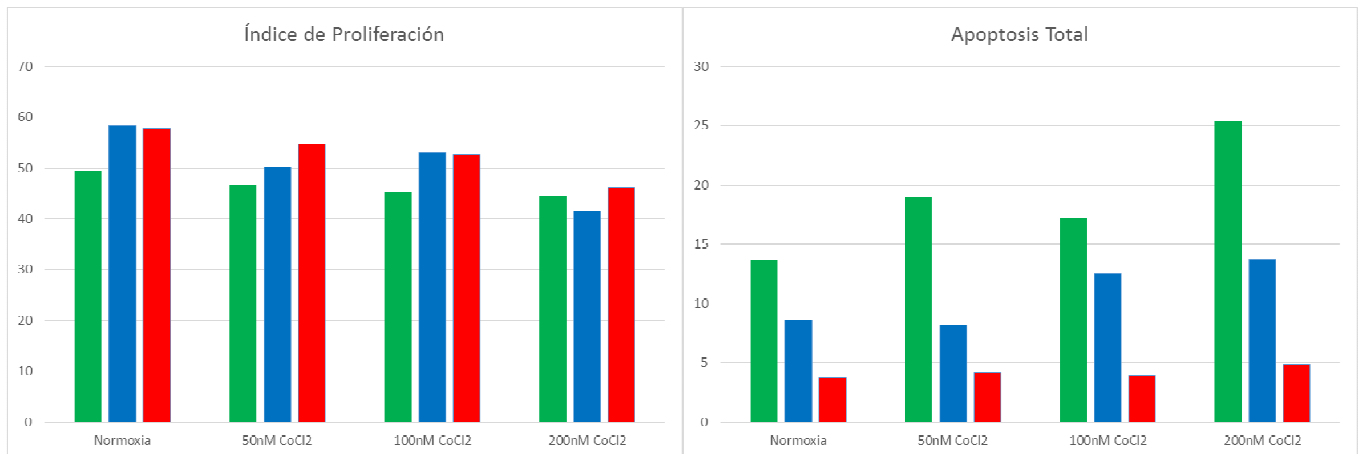
## Ciclo Celular y Apoptosis

Por último, como comprobación del efecto del  $\text{CoCl}_2$  sobre las células progenitoras endoteliales se llevó a cabo una medida por citometría de flujo, siguiendo la Metodología descrita, tanto del índice de proliferación como de la apoptosis. Se utilizaron de nuevo las líneas procedentes de donantes adultos A2 y A3 en su pase 7 así como la línea procedente de cordón umbilical C3.1 en su pase 5. Las concentraciones de  $\text{CoCl}_2$  empleadas fueron 0, 50, 100 y 200 nM (ver Figura 19).

De una forma muy similar a los resultados obtenidos con estas líneas en las pruebas proliferativas a tiempos cortos, vemos como acompañan al incremento en la concentración de la sal en el medio una reducción en el índice de proliferación y un aumento en el nivel de apoptosis. Las variaciones del índice de proliferación son relativamente pequeñas en comparación con las del índice de apoptosis que llegan a aumentar hasta un 60%.

## Determinación del efecto de la tensión de oxígeno sobre las Células Progenitoras Endoteliales

En este caso el índice de proliferación de la línea procedente de cordón umbilical sólo tiene una ligera ventaja en sus índices proliferativos, pero sí que tiene, como era de esperar, un nivel de apoptosis bastante menor que las células procedentes de donante adulto, aunque en este caso concreto la comparación no es tan indicativa como en anteriores al tratarse de un pase más joven.



**Figura 19:** Índice de Proliferación y Apoptosis de las líneas de adulto A2 (verde) y A3 (azul) a pase 7 y la línea de cordón C3.1 (rojo) a pase 5 empleando unas concentraciones de 0, 50, 100 y 200 nM de CoCl2.

## Discusión

En cuanto al protocolo de obtención de las células progenitoras endoteliales de muestras de sangre que se ha llevado a cabo para la obtención de las células de trabajo a lo largo de este proyecto, podemos decir que resulta exitoso. Si tenemos en cuenta el pequeño número de EPCs que hoy día se acepta como presente en todo el sistema vascular de un individuo sano, entre 20.000 y 200.000, no es de extrañar el encontrar una o dos colonias por muestra de sangre. Si a eso le añadimos que todas las comprobaciones, morfológicas, proliferativas y de marcadores de superficie, resultaron como se esperaba en todos los casos, se concluye que da como resultado la obtención de células formadoras de colonias endoteliales viables.

De las pruebas de crecimiento se confirma lo que ya indicaban otros grupos, las células provenientes de muestras de sangre de cordón umbilical tienen una capacidad proliferativa superior (Ingram, 2004) que las provenientes de sangre periférica de donantes adultos. Son capaces de permanecer en cultivo durante más pases antes de alcanzar la senescencia replicativa, entre 16 y 20 en nuestro caso, aunque trabajos publicados hablan de extraordinarios casos de más de 100. Por nuestras observaciones podemos decir que las células de adulto únicamente alcanzaban como mucho los 12 pases.

Asimismo el tiempo que les es requerido a las células progenitoras endoteliales de neonato para doblar su población es tan sólo una fracción del que les lleva a las adultas (20 y 30 horas respectivamente en el momento óptimo, ver Figura 12), propiedad que se mantiene a lo largo de toda su vida útil. Si bien es cierto que este tiempo, como era de esperar, aumenta progresivamente conforme se van realizando pases sucesivos.

Gracias a las pruebas de crecimiento a tiempos largos vemos que el crecimiento de las células formadoras de colonias endoteliales se ajusta a la forma de otros cultivos, con unos primeros pases de crecimiento más rápido que paulatinamente van decayendo hasta detenerse por completo (ver Figura 9). El momento exacto en que comienzan a detenerse depende de cada muestra, por lo que no podemos indicar unos valores absolutos al respecto, aunque por las medidas observadas es de esperar que ocurra a partir del pase 10.



Sin embargo por las pruebas realizadas a tiempos cortos durante 12 días (ver Figura 12), se deduce que el tiempo requerido para crecer a buena velocidad aumenta de forma importante mucho antes de llegar a ese límite replicativo. Serán necesarias más medidas para poder deducir un momento óptimo de uso.

En cuanto a capacidad clonogénica (ver Figuras 13 y 14) la diferencia entre células de neonato o de adulto también resulta muy importante, con un tamaño mayor de las colonias observadas en las siembras con líneas procedentes de cordón, y si tenemos en cuenta que nos vimos obligados a detener su crecimiento un poco antes que a las de adulto, podemos asegurar que la capacidad clonogénica de las ECFCs de cordón es muy superior en todo momento a la de las de adulto.

No obstante, cuando la comparación se realiza entre las condiciones de normoxia e hipoxia, las diferencias observadas en el crecimiento, tanto a largo como a corto plazo, son nimias o incluso inexistentes. Un resultado que choca con la hipótesis de partida y las observaciones previas del grupo. De confirmarse estos resultados, mostrarían que la importancia del oxígeno disponible no es tan importante como sospechábamos. Existen diversas explicaciones que podrían justificar estos resultados:

Puede ocurrir que, al vernos obligados a sacar las placas de cultivo de las condiciones de atmósfera controlada para manejarlas, las células experimenten una adaptación a las nuevas condiciones que les haga volver a la fase de latencia del crecimiento cada vez que realizábamos alguna medida o cambiábamos el medio, ralentizando su crecimiento hasta contrarrestar el hipotético efecto positivo del crecimiento en hipoxia. Para comprobarlo iniciamos una curva de crecimiento de pases sucesivos con una placa que cambiábamos de condición diariamente (ver Figura 10). Pero los resultados observados eran similares a las condiciones de normoxia e hipoxia normales, si las células realmente fuesen tan sensibles a estos cambios, la intermitencia supondría una traba para su crecimiento y los datos no lo indican así.

Otra posibilidad que debemos considerar es la posibilidad de que el hecho de compartir un mismo incubador para varios proyectos provoque que el nivel de oxígeno en el ambiente no llegue a los niveles deseados por el uso continuado de la estufa. Son necesarias varias horas para que la exposición a la concentración de oxígeno en fase gas deseada se traduzca en una concentración similar en el seno del líquido de cultivo. Pero las diferencias claras observadas en los experimentos clonogénicos indican que las condiciones en ambas estufas son, necesariamente, diferentes.

## Determinación del efecto de la tensión de oxígeno sobre las Células Progenitoras Endoteliales

Realizando un estudio más exhaustivo de la bibliografía se encuentran algunos trabajos en los que esta ausencia de diferencias queda patente (Abaci, 2010) en condiciones de hipoxia moderada (superior al 3%) y normoxia. De nuestro trabajo se deduce que, efectivamente, la tensión superficial de oxígeno utilizada no afecta al crecimiento de las células formadoras de colonias endoteliales.

Al contrario que la falta de diferencias en las pruebas de proliferación, los ensayos clonogénicos arrojan unos resultados que muestran diferencias significativas entre una y otra concentración de oxígeno. Incubadas con un 4% de oxígeno disponible, las colonias provenientes de una única célula crecen bastante más que cuando crecen con un 21% de oxígeno. Diferencia que, según las pruebas, se ve acentuada conforme las células escogidas para realizar las medidas proceden de pases mayores. Al parecer, tal como indican múltiples grupos (Guan, 2012, Lee, 2013 y Dai, 2008), la hipoxia tiene un efecto protector frente a la senescencia celular en las células progenitoras endoteliales, incrementando su capacidad para formar colonias y manteniéndola durante más tiempo.

Se deduce pues, que la hipoxia sí que tiene un efecto sobre el comportamiento de las células, aunque limitado, no afectando a su capacidad proliferativa global. El diseño del ensayo proliferativo de pases sucesivos, donde esperábamos que se acercasen a la confluencia, podría ocultar el hecho de que las células progenitoras endoteliales en realidad tuviesen un crecimiento inicial más acelerado que sustentaría los resultados obtenidos con los ensayos clonogénicos. Sin embargo, gracias a la realización de los ensayos proliferativos de 12 días podemos asegurar que no es el caso, ya que la forma de medir su crecimiento en este caso es más rigurosa. En las gráficas de crecimiento (ver Figura 11) no se aprecian diferencias entre las dos condiciones.

De manera complementaria a los estudios realizados se midió por citometría flujo el porcentaje de células que estaban sufriendo el proceso de apoptosis así como el porcentaje de ellas que se encontraban en proceso de división (ver Figura 15). En general, estas medidas indican lo que ya suponíamos por el resto de ensayos: las células provenientes de cordón proliferan más, pero no se observan efectos de importancia en condiciones de normoxia o hipoxia. Sí se aprecia, no obstante, una tendencia a la baja en la apoptosis observada en las células en hipoxia, de nuevo dando fuerza a la idea de que confiere una cierta protección contra la muerte celular programada.

La realización del estudio de ciclo celular mediante citometría de flujo se basa en la medida del contenido de DNA. Encontramos que en el caso de la línea de cordón C2 los resultados eran anómalos y

sugerían la presencia de una subpoblación no despreciable de células aneuploides que, según se interpretaba por el modelo de ajuste de datos, se encontraban en proceso de división. No es extraño que aparezcan células aneuploides cuando se trabaja con células endoteliales o similares (Thompson, 2011) por su tendencia a ocupar todo el espacio disponible haciéndose muy extensas, pero estas mutaciones acostumbran a venir asociadas a una pérdida de la capacidad proliferativa (Borradaile, 2010). Este hecho indica que el riesgo de aparición de células transformadas no es nulo durante la expansión *in vitro* de este tipo de células y por ello deben tenerse en cuenta consideraciones de seguridad si se pretenden utilizar en terapia celular. En cuanto a los resultados obtenidos en nuestros ensayos resulta difícil decir si esta subpoblación mutante ha podido afectarlos, ya que en otras pruebas son consistentes con el resto de medidas.

Respecto a las medidas obtenidas en la citometría empleando anticuerpos específicos (ver Figura 16). Sólo se han representado aquellos que mostraban cambios, y todos ellos parecen indicar un cambio en el fenotipo de las células hacia una disminución en la expresión de estos marcadores de superficie, e incluso podría decirse que este cambio es más rápido en las células en condiciones de hipoxia. Los marcadores CD29 y CD144, aquellos que no llegan a desaparecer, corresponden a moléculas de adhesión, mientras que el resto son marcadores característicos de células madre o progenitoras móviles (CD34, CD106, CD117 y CD133), pudiendo indicar un progresivo cambio hacia células endoteliales maduras, aunque mantienen una alta capacidad proliferativa en estos países.

Reuniendo los resultados de las pruebas proliferativas, clonogénicas y de marcaje surge la posible explicación de que estamos manejando desde un principio una población de células heterogénea con características específicas diferentes. De esta forma, en las condiciones de los ensayos proliferativos podrían predominar células más independientes del nivel de oxígeno disponible, células con una capacidad clonogénica menor y que tendieran a desaparecer en los primeros momentos de los ensayos clonogénicos. Las células con un mayor índice de crecimiento en hipoxia serían entonces las auténticas causantes de las diferencias observadas en el ensayo clonogénico. Si esto se demuestra cierto, las células aisladas que creíamos formadoras de colonias endoteliales se estarían enriqueciendo paulatinamente, según estas medidas de citometría, en las células con una mayor capacidad de crecimiento en hipoxia, motivo por el que el cambio parece más avanzado en esta condición.

## Determinación del efecto de la tensión de oxígeno sobre las Células Progenitoras Endoteliales

Las limitaciones de tiempo y recursos impidieron poder llevar a cabo medidas en un número suficiente de muestras como para poder hacer comparaciones efectivas entre las condiciones, motivo por el que los datos aquí expuestos se limitan a un par de líneas celulares en cada condición. Es por ello que el primero de los objetivos del trabajo era la recogida de muestras con las que poder trabajar posteriormente de cara a completar el estudio.

Asimismo la caracterización no se puede considerar completa sin una comparativa de las proteínas presentes en las células así como su nivel de expresión. Para conseguir esto, de cada línea cultivada en cada condición a lo largo de varios pases realizamos una extracción de proteínas de una placa de cultivo preparada al efecto por el método RIPA, así como de mRNA.

Como se ha comentado, el factor inducible por hipoxia 1 (HIF-1) es el principal mediador de los cambios que les acontecen a las células en condiciones de hipoxia, y por tanto suponemos que el principal causante de las variaciones observadas. Con el objetivo de determinar, como próximo paso de la investigación, la cantidad de este factor de transcripción en las células según las condiciones inició la puesta a punto un protocolo para llevar a cabo un Western-blot de esta proteína.

Para poder hacer comparativas de cantidad, se cultivaron varias líneas, tanto de cordón como de adulto, con diferentes concentraciones de cloruro de cobalto. Como se indica en la introducción, el ion divalente de cobalto en solución se introduce en las células y desplaza al hierro de multitud de enzimas con actividad oxidorreductasa, incluyendo las encargadas de iniciar el proceso de degradación de HIF-1 $\alpha$ . Así obtendríamos, ignorando otras actuaciones del cloruro de cobalto, como su toxicidad, células con diferentes cantidades de HIF-1. El uso de cloruro de cobalto en el medio de cultivo constituye un modelo de estudio que capta una serie de efectos producidos por la hipoxia, principalmente mediados por HIF-1 $\alpha$ .

Para comprobar el efecto que este compuesto tiene sobre el metabolismo de las células se comprobaron tanto su capacidad proliferativa (ver figura 13) como la estructura formada en matrigel que es una característica importante de las células con propiedades angiogénicas. El comportamiento de las células en presencia de CoCl<sub>2</sub> fue similar a los experimentos previos, viéndose algo impedido su crecimiento de manera dependiente de la concentración de la sal, sin llegar a detenerse, pero en todas las condiciones son capaces de proliferar y de formar las redes características en BME Cultrex.

### Determinación del efecto de la tensión de oxígeno sobre las Células Progenitoras Endoteliales

A partir de los extractos de estos cultivos podremos disponer de una escala donde encajar las medidas de Western-blot y RT-qPCR que realicemos con las muestras obtenidas de las diferentes líneas y orígenes cultivadas tanto en normoxia como en hipoxia, obteniendo finalmente una medida indicativa de la cantidad de HIF-1 presente. Esto nos permitirá corroborar que su nivel está aumentado en hipoxia, requisito indispensable para que sea el efector de las diferencias observadas.

## Conclusiones

- El método desarrollado para la obtención de células formadoras de colonias endoteliales a partir de muestras sanguíneas es efectivo.
- Las células procedentes de sangre de cordón tienen una capacidad proliferativa y clonogénica mayor que las de sangre periférica de adulto.
- El crecimiento a un 4% o un 21% de oxígeno no afecta a la proliferación global.
- La hipoxia sí confiere una capacidad clonogénica mayor y una ligera protección frente a la apoptosis.
- Las células progenitoras endoteliales sufren una serie de modificaciones de expresión durante su cultivo, bien porque cambian o porque se purifica una subpoblación.
- Este cambio parece acelerarse en hipoxia.
- Existe un riesgo de transformación celular en los cultivos *in vitro* de las ECFCs que deberá ser tenido en cuenta para un potencial uso terapéutico.

## Bibliografía

- Abaci HE, et al. *Am J Physiol Cell Physiol* 298: C1527–C1537, 2010. Adaptation to oxygen deprivation in cultures of human pluripotent stem cells, endothelial progenitor cells, and umbilical vein endothelial cells.
- Aghajanian H, et al. *J Biol Chem.* 2014 May 13. Sema3d and Sema3e Direct Endothelial Motility through Distinct Molecular Signaling Pathways.
- Asahara T, et al. *Science* 275, 964 (1997). Isolation of Putative Progenitor Endothelial Cells for Angiogenesis.
- Asahara T, et al. *Circ Res.* 1999a;85(3):221. Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization.
- Asahara T, et al. *EMBO J.* 1999b;18(14):3964. VEGF contributes to postnatal neovascularization by mobilizing bone marrow-derived endothelial progenitor cells.
- Asahara T, et al. *Gene Ther.* 2000;7(6):451. Stem cell therapy and gene transfer for regeneration.
- Attar A, et al. *Iran Biomed J.* 2013;17(3):146. Colony forming unit endothelial cells do not exhibit telomerase alternative splicing variants and activity.
- Auvinen K, et al. *Immunology.* 2014 May 15. Expression and function of endothelial selectins during human development.
- Bäck K, et al. *J Endocrinol.* 2012;215(1):89. Insulin and IGF1 receptors in human cardiac microvascular endothelial cells: metabolic, mitogenic and anti-inflammatory effects.
- Badimón L, Martínez-González J. *Rev Esp Cardiol Supl.* 2006;6(A):1-58. Disfunción endotelial.
- Barua RS, Ambrose JA. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2013;33(7):1460. Mechanisms of coronary thrombosis in cigarette smoke exposure.
- Basile DP, Yoder MC. *J. of Cell. Phys.* 2014 229(1): 10. Circulating and tissue resident endothelial progenitor cells.
- Basile DP, et al. *Microcirculation.* 2012; 19(7): 598. Low proliferative potential and impaired angiogenesis of cultured rat kidney endothelial cells.
- Boedtker E, et al. *J Physiol.* 2013; 591(Pt 6): 1447. Endothelial alkalisation inhibits gap junction communication and endothelium-derived hyperpolarisations in mouse mesenteric arteries.
- Borradaile NM, et al. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 2010;298(1):C66. Polyploidy impairs human aortic endothelial cell function and is prevented by nicotinamide phosphoribosyltransferase.
- Botham CM, et al. *Debaquey Heart Cent. J.* 2013;9(4):201. Clinical Trials of Adult Stem Cell Therapy For Peripheral Artery Disease.
- Burlacu A, et al. *Stem Cells Dev.* 2013;22(4):643. Factors secreted by mesenchymal stem cells and endothelial progenitor cells have complementary effects on angiogenesis in vitro.
- Clanton TL. *J Appl Physiol.* 2007;102: 2379. Hypoxia-induced reactive oxygen species formation in skeletal muscle.
- Clementi E. *Natl. Acad. Sci.* 1999 USA Vol. 96: 1559 Medical Sciences. On the mechanism by which vascular endothelial cells regulate their oxygen consumption.
- Collet G, et al. *Vascul Pharmacol.* 2012;56(5-6):252. Hypoxia control to normalize pathologic angiogenesis: potential role for endothelial precursor cells and miRNAs regulation.

## Determinación del efecto de la tensión de oxígeno sobre las Células Progenitoras Endoteliales

- Colombo E, et al. *J Physiol*. 2012;590(Pt 3):519. Fast reduction of peripheral blood endothelial progenitor cells in healthy humans exposed to acute systemic hypoxia.
- Cooley BC. *Thromb Res*. 2013;131(1):49. Collagen-induced thrombosis in murine arteries and veins.
- Dai T, et al. *Acta Pharmacol Sin*. 2008;29(12):1425. Hypoxia confers protection against apoptosis via the PI3K/Akt pathway in endothelial progenitor cells.
- De la Paz NG, et al. *Cell Tissue Res*. 2009;335(1):5. Arterial versus venous endothelial cells.
- Dick M, et al. *Life Sci*. 2013;92(14-16):859. Statin therapy influences endothelial cell morphology and F-actin cytoskeleton structure when exposed to static and laminar shear stress conditions.
- Estes ML, et al. *Jour. of the Internat. Soc. for Adv. of Cytom*. 77A: 831, 2010. Application of Polychromatic Flow Cytometry to Identify Novel Subsets of Circulating Cells with Angiogenic Potential.
- Fadini GP, et al. *Circ. Res*. 2012; 110: 624. Critical Reevaluation of Endotelial Progenitor Cell Phenotypes for Therapeutic and Diagnostic Use.
- Fenyo IM, Gafencu AV. *Immunobiology*. 2013;218(11):1376-84. The involvement of the monocytes/macrophages in chronic inflammation associated with atherosclerosis.
- Guan JZ, et al. *Arch Med Res*. 2012;43(1):15. Alteration of telomere length and subtelomeric methylation in human endothelial cell under different levels of hypoxia.
- Guo S, et al. *Int J Mol Sci*. 2014;15(3):3816. Role of A20 in cIAP-2 protection against tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )-mediated apoptosis in endothelial cells.
- Güven H, et al. *J. of the Am. Coll. of Card*. Vol 48, No 8, 2006. The number of endothelial progenitor cell colonies in the blood is increased in patients with angiographically significant coronary artery disease.
- Guzy RD, Schumacker PT. *Exp Physiol*. 2006;91(5):807. Oxygen sensing by mitochondria at complex III: the paradox of increased reactive oxygen species during hypoxia.
- Hofmann NA, et al. *J Vis Exp*. 2009;(32). pii: 1524. Isolation and large scale expansion of adult human endothelial colony forming progenitor cells.
- Hughes CS, et al. *PROTEOMICS* Volume 10, Issue 9, pages 1886–1890, No. 9 May 2010. Matrigel: A complex protein mixture required for optimal growth of cell culture.
- Hur J, et al. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004;24(2):288. Characterization of two types of endothelial progenitor cells and their different contributions to neovasculogenesis.
- Imanishi T, et al. *Ther Adv Cardiovasc Dis*. 2010;4(1):55. Endothelial progenitor cell senescence--is there a role for estrogen?
- Imanishi T, et al. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2004;31(7):407. Oxidized low-density lipoprotein induces endothelial progenitor cell senescence, leading to cellular dysfunction.
- Ingram DA, et al. *Blood*. 2004;104(9):2752. Identification of a novel hierarchy of endothelial progenitor cells using human peripheral and umbilical cord blood.
- Kaiser R, et al. *J Cell Mol Med*. 2012;16(10):2387. Effect of hypoxia on integrin-mediated adhesion of endothelial progenitor cells.
- Kaneko S, Takamatsu K (2012). *Cell Handling and Culture Under Controlled Oxygen Concentration*. Book: *Biomedical Tissue Culture*, Dr. Luca Ceccherini-Nelli (Ed.), ISBN: 978-953-51-0788-0.



## Determinación del efecto de la tensión de oxígeno sobre las Células Progenitoras Endoteliales

- Kelly E, et al. 2013;2:114.2-114.v1. eCollection 2013. Comparison of arterial and venous blood biomarker levels in chronic obstructive pulmonary disease.
- Kim J, et al. *Circulation*. 2006;113(15):1888. Reciprocal relationships between insulin resistance and endothelial dysfunction: molecular and pathophysiological mechanisms.
- Kim KW, et al. *Lab Invest*. 2013;93(6):639. Autophagy mediates paracrine regulation of vascular endothelial cells.
- Korybalska K, et al. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2013;68(3):250. Recovery of senescent endothelial cells from injury.
- Kuwana M, et al. *Arthritis Rheumatol*. 2014;66(5):1300. Brief report: impaired in vivo neovascularization capacity of endothelial progenitor cells in patients with systemic sclerosis.
- Le GY, et al. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014 May 24. Intracellular adenosine formation and release by freshly-isolated vascular endothelial cells from rat skeletal muscle: effects of hypoxia and/or acidosis.
- Lee SH, et al. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2013;33(10):2407. 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.
- Liu H, et al. *PLoS One*. 2014; 9(5): e98486. Identification of Nitric Oxide as an Endogenous Inhibitor of 26S Proteasomes in Vascular Endothelial Cells.
- Mattagajasingh SN, et al. *Biochim Biophys Acta*. 2012;1823(5):997. Activation of Stat3 in endothelial cells following hypoxia-reoxygenation is mediated by Rac1 and protein Kinase C.
- Mauro A, et al. *J Mol Histol*. 2010;41(6):367. Immunohistochemical and transcriptional expression of matrix metalloproteinases in full-term human umbilical cord and human umbilical vein endothelial cells.
- Moon SH, et al. *PLoS One*. 2013;8(9):e75224. Development of a xeno-free autologous culture system for endothelial progenitor cells derived from human umbilical cord blood.
- Mund JA, et al. *Arter., Thromb., and Vasc. Biol*. 2012;32:1045. Flow cytometric identification and functional characterization of immature and mature circulating endothelial cells.
- Murasawa S, et al. *Circulation*. 2002;106(9):1133. Constitutive human telomerase reverse transcriptase expression enhances regenerative properties of endothelial progenitor cells.
- Náchera M, et al. *Arch Bronconeumol*. 2007;43(Supl 2):40-7. - Vol. 43 Núm.Supl.2. Nuevos aspectos patogénicos en el síndrome de apneas e hipopneas durante el sueño (SAHS).
- Nijmeh H, et al. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2014;306(7):L661. High proliferative potential endothelial colony-forming cells contribute to hypoxia-induced pulmonary artery vasa vasorum neovascularization.
- Ozkurt S, et al. *Transplant Proc*. 2011;43(7):2606. Late effects of renal transplantation on endothelial functions and cardiac morphology.
- Parker SJ, et al. *Physiol Genomics*. 2012; 44(19): 925. Bone marrow mononuclear cells induce beneficial remodeling and reduce diastolic dysfunction in the left ventricle of hypertensive SS/MCWi rats.
- Porter KM, et al. *PLoS One*. 2014;9(6):e98532. Chronic Hypoxia Promotes Pulmonary Artery Endothelial Cell Proliferation through H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Induced 5-Lipoxygenase.
- Pu DR, et al. *Med Hypotheses*. 2008;70(2):338. HDL slowing down endothelial progenitor cells senescence: a novel anti-atherogenic property of HDL.

## Determinación del efecto de la tensión de oxígeno sobre las Células Progenitoras Endoteliales

Raber MN. *Clinical Methods: The History, Physical, and Laboratory Examinations*. 3rd edition. Walker HK, Hall WD, Hurst JW, editors. Boston: Butterworths; 1990. Chapter 157 Coagulation Tests.

Reed KE, et al. *J Clin Invest*. 1993;91(3):997. Molecular Cloning and Functional Expression of Human Connexin37, an Endothelial Cell Gap Junction Protein

Rehman J, et al. *Jour. of the Am. Coll. of Card. Vol 43, No 12, 2004*. Exercise acutely increases circulating endothelial progenitor cells and monocyte-/macrophage-derived angiogenic cells.

Reinisch A, et al. *Blood*. 2009;113(26):6716. Humanized large-scale expanded endothelial colony-forming cells function in vitro and in vivo.

Ribatti D, et al. *J of Hematother & Stem Cell Res*. 11:81–90 (2002). Endothelial Cell Heterogeneity and Organ Specificity.

Rocha SF, et al. *Angiogenesis*. 2009;12(2):139. Molecular differentiation and specialization of vascular beds.

Ross R. *N Engl J Med*. 1999 14;340(2):115. Atherosclerosis--an inflammatory disease.

Sato H, et al. *Cancer Sci*. 2014;105(2):168. Amino-terminal fragments of laminin  $\gamma 2$  chain retract vascular endothelial cells and increase vascular permeability.

Schulz C, et al. *Handb Exp Pharmacol*. 2012;(210):111. Platelets in atherosclerosis and thrombosis.

Schwartz SM, E P Benditt EP. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Feb 1976; 73(2): 651. Clustering of replicating cells in aortic endothelium.

Sennoune SR, et al. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*. 2014;60(1):19. V-ATPase regulates communication between microvascular endothelial cells and metastatic cells.

Seynhaeve AL, et al. *Surgery*. 2014;155(3):545. Exposing endothelial cells to tumor necrosis factor- $\alpha$  and peripheral blood mononuclear cells damage endothelial integrity via interleukin-1 $\beta$  by degradation of vascular endothelial-cadherin.

Shi Q, et al. *Stem Cells Dev*. 2013;22(4):631. Ex vivo reconstitution of arterial endothelium by embryonic stem cell-derived endothelial progenitor cells in baboons.

Skagius E, et al. 2008;35(1):37. Activated coagulation in patients with shock due to ruptured abdominal aortic aneurysm.

Smadja DM, et al. *J Cell Mol Med*. 2007;11(5):1149. Increased VEGFR2 expression during human late endothelial progenitor cells expansion enhances in vitro angiogenesis with up-regulation of integrin  $\alpha 6$ .

Stücker M, et al. *J Physiol*. 2002;538(Pt 3):985. The cutaneous uptake of atmospheric oxygen contributes significantly to the oxygen supply of human dermis and epidermis.

Tabruyn SP, et al. *Mol Cancer Ther*. 2009 8; 2645. NF- $\kappa$ B activation in endothelial cells is critical for the activity of angiostatic agents.

Tadokoro H, et al. *J Biol Chem*. 2013;288(48):34343. Exosomes derived from hypoxic leukemia cells enhance tube formation in endothelial cells.

Tang X, et al. *Front Physiol*. 2014; 5: 175. Mitochondria, endothelial cell function, and vascular diseases.

Thijs AMJ, et al. *Hypertension*. 2013;61(5):1060. Role of endogenous vascular endothelial growth factor in endothelium-dependent vasodilation in humans.

Thompson SL, Compton DA. *Chromosome Res*. 2011;19(3):433. Chromosomes and cancer cells.

## Determinación del efecto de la tensión de oxígeno sobre las Células Progenitoras Endoteliales

- Toussant O, et al. *J. of Cell. Phys.* 2011;226(2):315. Artefactual Effects of Oxygen on Cell Culture Models of Cellular senescence and Stem Cell Biology.
- Valen G. *Basic Res Cardiol.* 2004;99(1):1. Signal transduction through nuclear factor kappa B in ischemia-reperfusion and heart failure.
- Wei Y, et al. *Inflammation.* 2013;36(3):567. Antiapoptotic and proapoptotic signaling of cyclophilin A in endothelial cells.
- Williamson K, et al. *Front. Physiol.* 20 February 2012. Endothelial progenitor cells enter the aging arena.
- Wu LH, et al. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi.* 2012 Sep 25;92(36):2574-7. Method of expansion of late endothelial progenitor cells.
- Xia L, et al. *Br J Pharmacol.* 2008;155(3):387. Resveratrol reduces endothelial progenitor cells senescence through augmentation of telomerase activity by Akt-dependent mechanisms.
- Xue Y, et al. *Int J Artif Organs.* 2013 Oct;36(9):650. Co-culture of human bone marrow stromal cells with endothelial cells alters gene expression profiles.
- Yang MH, Wu KJ. *Cell Cycle.* 2008;7(14):2090. TWIST activation by hypoxia inducible factor-1 (HIF-1): implications in metastasis and development.
- Yang DG, et al. *Can J Cardiol.* 2011;27(5):628. Remnant-like lipoproteins may accelerate endothelial progenitor cells senescence through inhibiting telomerase activity via the reactive oxygen species-dependent pathway.
- Yoder MC, et al. *Blood.* 2007;109(5):1801. Redefining endothelial progenitor cells via clonal analysis and hematopoietic stem/progenitor cell principals.
- Yoder MC. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2012;2(7):a006692. Human endothelial progenitor cells.