



VNIVERSITAT
DE VALÈNCIA

Facultad de Medicina y Odontología

Departamento de Fisiología

Tesis doctoral

**AISLAMIENTO Y FUNCIÓN DE CÉLULAS
PROGENITORAS ENDOTELIALES DE SANGRE
PERIFÉRICA DURANTE LA EVOLUCIÓN CLÍNICA DE
PACIENTES CON INFARTO AGUDO DE MIOCARDIO.
EFECTO DE LAS MICROPARTÍCULAS^{Shh+}
EN LA FUNCIÓN CELULAR**

Doctorando:

D. Carlos Bueno Betí

Directores:

Dr. Carlos Hermenegildo Caudevilla

Dra. Susana Novella del Campo

Valencia, 2015



VNIVERSITAT
DE VALÈNCIA

Facultad de Medicina y Odontología
Departamento de Fisiología

Dr. Carlos Hermenegildo Caudevilla, Catedrático del Departamento de Fisiología de la Universitat de València y la Dra. Susana Novella del Campo, Profesora Ayudante Doctor del Departamento de Fisiología de la Universitat de València.

CERTIFICAN:

Que D. Carlos Bueno Betí, Licenciado en Biología, ha realizado bajo su dirección el trabajo titulado **“Aislamiento y función de células progenitoras endoteliales de sangre periférica durante la evolución clínica de pacientes con infarto agudo de miocardio. Efecto de las micropartículas^{Shh+} en la función celular”** para alcanzar el Grado de Doctor por la Universitat de València.

Valencia, Noviembre de 2015

Fdo:

Fdo:

Carlos Hermenegildo Caudevilla

Susana Novella del Campo

Este trabajo ha sido financiado por proyectos subvencionados

por:

Instituto de Salud Carlos III del Ministerio de Economía y Competitividad (Proyectos FIS PI08/0272, PI10/0518 y PI13/00617, Redes de investigación cooperativa HERACLES RD06/0009/0005 y Red de Investigación Cardiovascular (RIC) RD12/0042/0052)

Agradecimientos

Son muchas las personas que durante la realización de la presente tesis han estado a mi lado aconsejándome a nivel profesional y personal y animándome a continuar hacia adelante en los momentos más difíciles. Por todo ello, me gustaría agradecer:

A mis directores:

Al Dr. Carlos Hermenegildo por darme la oportunidad de formar parte de tu equipo de investigación y confiar en mí para llevar a cabo este proyecto.

A la Dra. Susana Novella por depositar plena confianza en mí y por tus largas sesiones de “coaching”.

Con vosotros inicié mi andadura en el mundo de la investigación y siempre habéis estado ahí, en todo momento, para aconsejarme y guiarme. Gracias por vuestro tiempo, dedicación y paciencia infinita a lo largo de este camino. Me gustaría daros la enhorabuena a los dos por haber sido capaces de crear un ambiente de trabajo tan acogedor, cercano y agradable, tan parecido a una familia que, a veces, he llegado a pensar que eran mis padres y hermanos con los que estaba trabajando.

A los doctores:

Elena Monsalve por tus largas charlas y tus sabios consejos.

Pacual Medina y Gloria Segarra por estar siempre dispuestos a ayudar y hacer más fácil y agradable todo el trabajo.

M^a José Forteza por escucharme y animarme en los momentos más duros.

Juan Sanchís y al servicio de Cardiología del Hospital Clínico Universitario de Valencia por su colaboración en el estudio PROCELL.

Ramaroson Andriantsitohaina, director del laboratorio ***Stress oxydant et pathologies métaboliques***, por aceptarme en tu grupo de investigación para realizar mi estancia predoctoral.

M^a Carmen Martínez por acogerme en tu grupo como si fuera uno más, guiarme y ayudarme a lo largo de mi estancia en el laboratorio ***Stress oxydant et pathologies métaboliques***.

A los grupos de investigación:

L.In.C.E, mi grupo. A todos, a los que están y a los que en algún momento formaron parte de él. Al Dr. Andrés Laguna, por enseñarme cómo trabajar en un laboratorio de investigación. A la Dra. Agua Sobrino por tus consejos y experiencia. A Madeline por ser como eres. A Natalia Martínez, Macarena de Lázaro, Daniel Pérez, Xavi Vidal, Ana Monpeón y Christian Alite por hacer que el duro trabajo del laboratorio fuera tan divertido. Ha sido un placer conocerlos y haber podido trabajar codo con codo con todos vosotros.

CIBERER, los raros. Al Dr. J. Luis García por todos tus conocimientos y tu amabilidad. A Santi, Marta, Isa y Ana, por que juntos creamos una

familia, la CIBER-LINCE. Gracias por hacer tan llevaderas esas tardes de duros experimentos.

A la Unidad de Genotipado y Diagnóstico Genético de la Unidad Central de Investigación de Medicina principalmente a Victoria, Cristina, Tani, Griselda, Raquel, Javi, Pilar, Inma y Vanesa por hacer tan agradables y divertidas todas las comidas.

A la Unidad de Análisis Multigénico en especial a Jesica por nuestras largas conversaciones y tan buenos consejos. Gracias por ser tan buena persona.

Al grupo de investigación *Stress oxydant et pathologies métaboliques* (INSERM 1063), especialmente a Manolo, Daniela, Gaceb, Luisa y Giovanna, por acogerme en vuestro grupo como a uno mas y facilitar mis primeros días en Angers.

A mis amigos:

Los que empezaron siendo mis compañeros de piso pero han terminado siendo muy buenos amigos, a Jorge, Alfredo y Javi por soportarme en los momentos más difíciles. A Ana y Lara por vuestras visitas, siempre tan agradables.

Los valencianos Laura, Rebeca, Jose, Igor y Oscar y los calijons Roberto Mateu, J. Carlos por sacarme de vez en cuando de casa y evitar que me volviera loco. Gracias por estar siempre ahí.

A Elena, Pedro y Belén por acogerme incondicionalmente en vuestra casa y hacer esta última etapa de la tesis tan agradable y divertida.

A todos, gracias por quererme como soy.

A mi familia:

A mis padres, Vicente y Paquita, por el enorme esfuerzo realizado para que nunca me faltara de nada y por vuestro apoyo incondicional durante toda mi vida, sobretodo en los momentos más difíciles.

A mi hermano, por apoyar cada una de mis decisiones y estar a mi lado siempre.

A mis abuelos, por enseñarme buenos valores y hacer de mi mejor persona.

A todos, MUCHAS GRACIAS por haber hecho de mi quien soy. Sin vosotros nunca hubiera sido capaz de llegar donde he llegado. Esta tesis es también vuestra.

No hay cosas que temer, sólo hay cosas que comprender
Marie Curie

ÍNDICE

Resumen/Summary	1
1 Introducción	1
1.1 Endotelio y función endotelial.....	3
1.2 Células progenitoras endoteliales.....	8
1.2.1 Origen de las células progenitoras endoteliales.....	8
1.2.2 Movilización y emplazamiento de las células progenitoras endoteliales.....	9
1.2.3 Vasculogénesis	15
1.2.4 Definición y caracterización de las células progenitoras endoteliales.....	16
1.3 Enfermedades cardiovasculares.....	26
1.3.1 Cardiopatía isquémica	26
1.3.2 Células progenitoras endoteliales en enfermedades cardiovasculares.....	28
1.4 Micropartículas, ruta de señalización Hedgehog y micropartículas Sonic Hedgehog.....	32
1.4.1 Micropartículas.....	32
1.4.2 Ruta de señalización Sonic Hedgehog.....	38
1.4.3 Micropartículas Sonic Hedgehog.....	46
2 Hipótesis	51
3 Objetivos	55
4 Material y métodos.....	59
4.1 Población de estudio	61
4.2 Cultivos celulares.....	64
4.2.1 Células endoteliales de vena de cordón umbilical humano.....	64
4.2.2 Células progenitoras endoteliales.....	65
4.3 Caracterización de los cultivos de células progenitoras endoteliales	69
4.3.1 Caracterización de los cultivos de células progenitoras endoteliales por citometría de flujo.....	69
4.3.2 Caracterización de los cultivos de células progenitoras endoteliales por microscopia de fluorescencia.....	70

Índice

4.4	Determinación de la función celular.....	73
4.4.1	Adhesión celular.....	73
4.4.2	Proliferación celular.....	73
4.4.3	Curva de crecimiento.....	75
4.4.4	Capacidad vasculogénica <i>in vitro</i>	75
4.4.5	Capacidad vasculogénica <i>in vivo</i>	76
4.4.6	Producción de óxido nítrico.....	77
4.5	Recuento de las células endoteliales circulantes y las células progenitoras endoteliales circulantes.....	79
4.6	Producción de micropartículas.....	81
4.7	Estudio de la reorganización del citoesqueleto.....	83
4.8	Estudio de la interacción de las micropartículas con las células progenitoras endoteliales.....	84
4.9	Exposición de las células progenitoras endoteliales a los diferentes tratamientos.....	85
4.9.1	Ciclopamina.....	85
4.9.2	LY 294002.....	86
4.9.3	Y 27362.....	87
4.9.4	L-NAME.....	88
4.10	Análisis de la expresión génica.....	90
4.10.1	Extracción del RNA total.....	90
4.10.2	Síntesis de cDNA a partir del RNA total.....	91
4.10.3	Real Time-quantitative Polimerase Chain Reaction ..	91
4.11	Análisis de la expresión proteica.....	93
4.11.1	Preparación de las muestras y extracción de proteínas totales.....	93
4.11.2	Separación de las proteínas por electroforesis.....	93
4.11.3	Western Blot.....	94
4.12	Análisis estadístico.....	96
5	Resultados.....	97
5.1	Puesta a punto del método de aislamiento y cultivo de células progenitoras endoteliales a partir de muestras de sangre periférica.....	99
5.1.1	Efecto del anticoagulante en el aislamiento y cultivo de las células progenitoras endoteliales.....	101
5.1.2	Efecto del volumen de la muestra de sangre en el aislamiento y cultivo de las células progenitoras endoteliales.....	104
5.1.3	Efecto del tiempo transcurrido desde la extracción de las muestras de sangre hasta su procesado en el	

aislamiento y cultivo de las células progenitoras endoteliales.....	105
5.1.4 Efecto de la matriz extracelular en el aislamiento y cultivo de las células progenitoras endoteliales.....	106
5.1.5 Efecto del enriquecimiento del medio de cultivo con suero bovino fetal en el aislamiento y cultivo de las células progenitoras endoteliales	108
5.1.6 Caracterización fenotípica de los cultivos de células progenitoras endoteliales.....	110
5.1.7 Caracterización funcional de los cultivos de células progenitoras endoteliales.....	113
5.2 El infarto agudo de miocardio y las células progenitoras endoteliales: movilización y funcionalismo.....	120
5.2.1 Movilización de células progenitoras endoteliales circulantes y células endoteliales circulantes en el infarto agudo de miocardio	122
5.2.2 Determinación de la capacidad funcional de las células progenitoras endoteliales en cultivo en el infarto agudo de miocardio.....	124
5.3 Modificación de la función de las células progenitoras endoteliales en cultivo por exposición a micropartículas Sonic Hedgehog.....	134
5.3.1 Interacción de las micropartículas Sonic Hedgehog con las células progenitoras endoteliales	135
5.3.2 Efecto de las micropartículas Sonic Hedgehog en la expresión génica de las células progenitoras endoteliales.....	137
5.3.3 Efecto de las micropartículas Sonic Hedgehog sobre la función de las células progenitoras endoteliales	139
5.3.4 Efecto de las micropartículas Sonic Hedgehog en la reorganización del citoesqueleto de actina en células progenitoras endoteliales.....	151
6 Discusión.....	155
6.1 Aislamiento y cultivo de células progenitoras endoteliales.....	158
6.1.1 Condiciones de aislamiento y cultivo para las células progenitoras endoteliales.....	160
6.1.2 Caracterización fenotípica de los cultivos de células progenitoras endoteliales.....	165

Índice

6.1.3	Caracterización funcional de los cultivos de células progenitoras endoteliales	167
6.2	Infarto agudo de miocardio y células progenitoras endoteliales: movilización y funcionalismo	172
6.2.1	Niveles de células progenitoras endoteliales circulantes y células endoteliales circulantes en el infarto agudo de miocardio	172
6.2.2	Determinación de la capacidad funcional de las células progenitoras endoteliales en el infarto agudo de miocardio	177
6.3	Micropartículas Sonic Hedgehog y células progenitoras endoteliales	186
6.3.1	Interacción de las micropartículas Sonic Hedgehog con las células progenitoras endoteliales.....	186
6.3.2	Efecto de las micropartículas Sonic Hedgehog en la expresión génica de las células progenitoras endoteliales.....	188
6.3.3	Efecto de las micropartículas Sonic Hedgehog sobre la función celular de las células progenitoras endoteliales.....	190
6.3.4	Efecto de las micropartículas Sonic Hedgehog en la reorganización del citoesqueleto de actina en células progenitoras endoteliales.....	196
7	Conclusiones/Conclusions	199
8	Bibliografía.....	205
9	Anexo.....	225

Índice abreviaturas

acLDL: LDL acetilada
CE: célula endotelial
CEC: células endoteliales circulantes
CEM: línea celular linfoblastoide humana
CMN: células mononucleares
CPE: célula progenitora endotelial
DAF-FM: 4-amino-5-metilamino- 2',7'-difluorofluoresceína diacetato
DAPI: 4',6'-diamino-2-fenilindol
Dil acLDL: acLDL unida al fluorocromo Dil
DMSO: dimetil sulfóxido
EDTA: ácido etilendiaminotetraacético
eNOS: óxido nítrico sintasa endotelial
FITC: isotiocianato de fluoresceína
G-CSF: factor estimulante de colonias de granulocitos
HIF-1: factor inducible por hipoxia-1
HUVEC: células endoteliales de vena de cordón umbilical humano
IAM: infarto agudo de miocardio
IQR: rango intercuartílico
JAM: moléculas de adhesión de unión
MP: micropartículas
MP^{Shh+}: micropartículas que contienen el morfogen Shh
NO: óxido nítrico
PBS: solución salina fosfatada
PE: ficoeritrina
PECAM-1: molécula de adhesión endotelio-plaqueta 1
PerCP: proteína clorofila peridinina
PI3K: fosfatidilinositol 3 quinasa
PPAR α : receptor activador de proliferación de los peroxisomas alfa
Ptch1: patched 1
ROCK: proteínas quinasas asociadas a Rho
SBF: suero bovino fetal

Índice abreviaturas

Shh: Sonic Hedgehog

Smo: Smoothened

UCIM: Unidad Central de Investigación de Medicina

VCAM-1: molécula de adhesión de células vasculares 1

VE-Cadherina: cadherina endotelial vascular

VEGF: factor vascular de crecimiento endotelial

vWF: factor de von Willebrand

Índice figuras y tablas

Figura 1. Función endotelial	4
Figura 2. Tono vascular	5
Figura 3. Movilización de las CPE en respuesta a diferentes factores de crecimiento	10
Figura 4. Movilización y emplazamiento de las CPE	11
Figura 5. Vasculogénesis postnatal	16
Figura 6. Protocolo de aislamiento de CPE CFU-Hill	22
Figura 7. Micrografía de contraste de fases de cultivos de CPE	23
Figura 8. Esquema de los protocolos más usados para el aislamiento y cultivo de las CPE.....	24
Figura 9. Diferentes manifestaciones de la cardiopatía isquémica	27
Figura 10. Vesículas extracelulares	33
Figura 11. Formación de micropartículas mediante activación celular y apoptosis	35
Figura 12. Uso de las vesículas extracelulares como agentes terapéuticos	38
Figura 13. Procesado post-traduccionál del precursor Sonic Hedgehog	39
Figura 14. Ruta de señalización Hedghog canónica	42

Índice figuras y tablas

Figura 15. Rutas de señalización Hedgehog no canónica	43
Figura 16. Efectos de Sonic Hedgehog en células endoteliales	46
Figura 17. Efectos de las micropartículas que contienen Sonic Hedgehog en células endoteliales	48
Figura 18. Esquema representativo de trabajo desde la obtención de las muestras de sangre hasta su procesado para la obtención de las células mononucleadas	67
Figura 19. Caracterización fenotípica de los cultivos de CPE por citometría de flujo	70
Figura 20. Histograma representativo de los resultados obtenidos por citometría de flujo para el análisis del ciclo celular	74
Figura 21. Ruta de señalización Hedgehog y lugar dónde la ciclopamina ejerce su inhibición	85
Figura 22. Ruta de señalización Hedgehog y lugar dónde LY 294002 ejerce su inhibición	87
Figura 23. Ruta de señalización Hedgehog y lugar dónde el Y 27362 ejerce su inhibición	88
Figura 24. Reacción de conversión de L-Arginina en NO e inhibición por el L-NAME	89
Figura 25. Efecto del anticoagulante en el aislamiento y cultivo de CPE.....	102

Figura 26. Caracterización morfológica y fenotípica de CPE procedentes de muestras recogidas con citrato sódico y heparina.....	103
Figura 27. Efecto del volumen de las muestras de sangre en el aislamiento y cultivo de CPE.....	104
Figura 28. Efecto del tiempo transcurrido desde la extracción de las muestras de sangre hasta el procesado en el aislamiento y cultivo de CPE.....	106
Figura 29. Efecto de la matriz extracelular en el aislamiento y cultivo de CPE.....	107
Figura 30. Efecto del enriquecimiento del medio de cultivo con SBF en el aislamiento y cultivo de CPE.....	109
Figura 31. Seguimiento de un cultivo de CPE.....	110
Figura 32. Caracterización fenotípica de los cultivos de CPE.....	112
Figura 33. Adhesión celular.....	114
Figura 34. Proliferación celular.....	115
Figura 35. Curva de crecimiento celular.....	117
Figura 36. Capacidad vasculogénica.....	118
Figura 37. Recuento de CPE circulantes en sujetos sanos y en pacientes con IAM.....	123
Figura 38. Recuento de CEC en sujetos sanos y en pacientes con IAM.....	124

Índice figuras y tablas

Figura 39. Adhesión celular de las CPE en el IAM.....	127
Figura 40. Niveles de expresión de las integrinas $\alpha 5$ y αV	128
Figura 41. Proliferación celular de las CPE en el IAM.....	129
Figura 42. Curva de crecimiento de las CPE en el IAM.....	131
Figura 43. Capacidad vasculogénica in vitro de las CPE en el IAM.....	132
Figura 44. Internalización de las MP en CPE.	136
Figura 45. Efecto de las MP en la expresión génica de los componentes de la ruta de señalización Hedgehog en CPE.....	138
Figura 46. Efecto de las MP en la expresión génica de genes de interés cardiovascular en CPE.....	139
Figura 47. Efecto de las MP en la capacidad vasculogénica in vitro de CPE.....	141
Figura 48. Efecto de las MP en la capacidad vasculogénica in vivo de CPE.....	143
Figura 49. Efecto de las MP en la producción de NO en CPE.....	145
Figura 50. Efecto de las MP en la expresión proteica y fosforilación de la Akt.....	146
Figura 51. Efecto de las MP en la expresión proteica y fosforilación de la eNOS.....	148

Índice figuras y tablas

Figura 52. Relación entre la capacidad vasculogénica in vitro y producción de NO en CPE tratadas con MP.....150

Figura 53. Reorganización del citoesqueleto de actina en CPE.....152

Índice figuras y tablas

Tabla 1. Diversos inmunofenotipos propuestos para CPE.....	17
Tabla 2. Anticuerpos utilizados para la caracterización de los cultivos de CPE por citometría de flujo	69
Tabla 3. Anticuerpos utilizados para la determinación del número de CPE circulantes y CEC	79
Tabla 4. Sondas taqman utilizados para la determinación de la expresión génica por RT-qPCR	91
Tabla 5. Anticuerpos utilizados para la determinación de la expresión génica por WB	94
Tabla 6. Datos demográficos y clínicos de 50 sujetos sanos de los que se obtuvieron las muestras de sangre para el aislamiento y cultivo de CPE.....	100
Tabla 7. Datos demográficos y clínicos de 50 sujetos sanos y 50 pacientes con IAM de los que se obtuvieron muestras de sangre para la determinación de los niveles de CPE circulantes y CEC.....	121
Tabla 8. Datos demográficos y clínicos de 10 sujetos sanos y 10 pacientes con IAM de los que se obtuvieron las muestras de sangre para el aislamiento y cultivo de CPE.....	125

Resumen/Summary

Las células endoteliales (CE) recubren el interior de los vasos sanguíneos constituyendo el endotelio, actualmente considerado un órgano muy activo e implicado en la regulación del tono vascular, el tráfico de células sanguíneas, el equilibrio hemostático, la permeabilidad, la proliferación, la supervivencia, y la respuesta inmunitaria tanto adaptativa como innata. Los factores de riesgo cardiovascular como la hipercolesterolemia, la diabetes y el tabaquismo pueden causar lesiones endoteliales, uno de los principales desencadenantes de la patogénesis en la aterosclerosis, predisponiendo al desarrollo y progresión de enfermedades cardiovasculares. Hoy en día, las enfermedades cardiovasculares son la principal causa de muerte en todo el mundo, y la manifestación más temida es el síndrome coronario agudo. Éste tiene lugar cuando el flujo sanguíneo coronario es interrumpido, secundario a la ruptura de una placa aterosclerótica.

Resumen/Summary

En 1997, el descubrimiento de las células progenitoras endoteliales (CPE) supuso un cambio en el paradigma de la reparación vascular. Por primera vez, se describió un mecanismo alternativo a la angiogénesis para el mantenimiento y reparación del endotelio, contrarrestar las lesiones endoteliales, reemplazar el endotelio no funcional y potenciar la reparación tisular tras una lesión vascular isquémica. El proceso por el cual las CPE contribuyen a la formación de nuevos vasos sanguíneos es conocida como vasculogénesis postnatal y tiene lugar a través de 4 etapas diferentes: movilización, emplazamiento, invasión y diferenciación.

La mayoría de estudios han centrado su atención en la definición molecular y en la determinación cuantitativa de las CPE por citometría de flujo, atendiendo a la expresión de un marcador progenitor, el CD34, un marcador endotelial, el KDR y la ausencia de expresión del marcador panleucocitario CD45. Sin embargo, el análisis de muestras de sangre por citometría de flujo únicamente aporta información cuantitativa sobre las CPE y la expresión de un número limitado de marcadores en su superficie.

En muestras de sangre periférica de humanos las CPE solamente representan un 0.0001% del total de células mononucleadas (CMN). Para obtener información cualitativa, las CPE necesitan ser aisladas y expandidas en cultivo. Todos los protocolos existentes para el aislamiento de las CPE difieren en el tiempo y en las condiciones de cultivo. Los protocolos con tiempos de cultivo corto, <7 días, dan lugar

a células mieloides con características hematopoyéticas que expresan los marcadores CD14, CD11b y CD45. Los protocolos con tiempos de cultivo largo, >14 días, dan lugar a células con un fenotipo más endotelial, una capacidad proliferativa mayor y capaces de diferenciarse a CE maduras. Las CPE obtenidas bajo diferentes condiciones pueden mostrar pequeñas o grandes diferencias en su fenotipo y función biológica. Por este motivo, es necesaria una comparación sistemática de las condiciones de cultivo más utilizadas con el fin de establecer un protocolo consenso.

La importancia biológica de las CPE ha sido demostrada en numerosos estudios que describen su participación en procesos de vasculogenesis postnatal, tanto en condiciones fisiológicas como en condiciones patológicas como la isquemia miocárdica y periférica y la aterosclerosis. El número de CPE está reducido en muestras de sangre de sujetos que presentan algún factor de riesgo cardiovascular y/o aterosclerosis. La reducción de los niveles de CPE, acompañada de un incremento de los niveles de células endoteliales circulantes (CEC), marcador de la existencia y severidad de una lesión vascular, son actualmente considerados marcadores de daño vascular. Además, la reducción del número de CPE ha demostrado ser un predictor de futuros eventos cardiovasculares. De la misma manera, los factores de riesgo cardiovascular y diferentes patologías como las cardiovasculares pueden afectar las capacidades funcionales de las CPE.

Resumen/Summary

Las micropartículas (MP) son pequeñas vesículas liberadas por la membrana plasmática de células activadas o apoptóticas. Presentan un diámetro comprendido entre 0.1 y 1 μm y son heterogéneas en cuanto a su composición. Las MP representan un nuevo mecanismo de comunicación intercelular y actúan como vectores transportando diferentes mensajes biológicos que participan en la patofisiología de, principalmente, enfermedades cardiovasculares. Sin embargo, debido a la capacidad de las MP de transportar diferentes moléculas como citoquinas, quimioquinas, factores de crecimiento y ácidos nucleicos exógenos, éstas pueden ser herramientas terapéuticas potencialmente útiles para el tratamiento de diferentes condiciones patológicas.

Las MP generadas por linfocitos T bajo condiciones mitógenas contienen el morfogen Sonic Hedgehog (Shh) ($\text{MP}^{\text{Shh}+}$). Se ha demostrado que las $\text{MP}^{\text{Shh}+}$ tienen un efecto beneficioso en el modelo de isquemia animal y en CE de origen humano en cultivo, restableciendo la lesión endotelial y favoreciendo la angiogénesis. Las $\text{MP}^{\text{Shh}+}$ son también capaces de inducir, en CE, la producción de óxido nítrico (NO) y reducir las especies reactivas del oxígeno, reforzando el efecto beneficioso sobre el sistema cardiovascular.

Uno de los objetivos de esta tesis es el de establecer las condiciones óptimas para el aislamiento y cultivo de CPE a partir de muestras de sangre periférica humana y determinar las características morfológicas, fenotípicas y funcionales de las CPE obtenidas utilizando dichas condiciones. Otro objetivo de esta tesis es el de analizar la movilización

de las CEC y CPE y estudiar las capacidades funcionales de las CPE en sujetos sanos y pacientes con IAM durante 6 meses de evolución clínica. El último objetivo es el de determinar el efecto de las MP^{Shh+} sobre la capacidad funcional de las CPE aisladas de sujetos sanos.

Para la determinación de las condiciones óptimas de aislamiento y cultivo de CPE se utilizaron muestras de sangre periférica de 50 sujetos sanos obtenidas en el Servicio de Cardiología del Hospital Clínico Universitario de la Universidad de Valencia. En primer lugar se determinaron las condiciones óptimas para la recogida de las muestras de sangre atendiendo a los criterios de volumen de muestra, anticoagulante y tiempo de procesado. Después, las condiciones de cultivo (matriz extracelular y medio de cultivo). La capacidad funcional de las CPE, aisladas bajo las condiciones óptimas, se evaluó a través de los parámetros de adhesión, crecimiento, proliferación y vasculogénesis celular y se comparó con las células endoteliales de vena de cordón umbilical (HUVEC), la referencia estándar para cultivos de CE.

Nuestros resultados pusieron de manifiesto que para la obtención de cultivos de CPE con un comportamiento funcional óptimo es necesario controlar una serie de parámetros durante la recogida de las muestras de sangre y en las condiciones de cultivo utilizadas. Las condiciones testadas en esta tesis indican que: (i) las muestras de sangre deben ser recogidas en tubos de heparina; (ii) en un volumen mínimo de 30 mL; (iii) y con un tiempo de procesado inferior a 2 horas

Resumen/Summary

tras su obtención; (iv) la fibronectina es la mejor matriz extracelular y (v) el medio de cultivo tiene que estar enriquecido con suero bovino fetal (SBF) al 20%. Además, las CPE aisladas bajo las condiciones óptimas mostraron unas características morfológicas, fenotípicas y funcionales similares a CE de otros orígenes, como lo son las HUVEC.

La movilización de las CEC y las CPE se estudió en muestras de sangre periférica en 50 sujetos sanos y 50 pacientes con infarto agudo de miocardio (IAM) durante 6 meses de evolución clínica, todos ellos reclutados por el Hospital Clínico Universitario de Valencia. El criterio para la inclusión de los pacientes con IAM fue: edad \leq 75 años, primer episodio de IAM y la presencia de uno o más de los factores tradicionales de riesgo cardiovascular. Las CEC y las CPE se definieron por citometría de flujo como células que expresaban los marcadores CD45-CD31+CD146+ y CD45-CD34+KDR+ respectivamente.

Los resultados mostraron que, comparado con sujetos sanos, los niveles de CEC aumentaban el día del infarto, y que estos niveles elevados se mantenían sin cambios durante 6 meses de evolución clínica, revelando la existencia de daño vascular. Por otra parte en pacientes con IAM, comparado con niveles encontrados en sujetos sanos, la CPE aumentaron 3 veces el día del infarto, 6 veces a los 30 días del infarto que se redujeron con 6 meses de evolución clínica. Este hecho indica la activación de un mecanismo de reparación endotelial en etapas tempranas del IAM que es atenuado después de 6 meses de evolución clínica.

La capacidad funcional de las CPE se determinó en 10 sujetos sanos y 10 pacientes con IAM, un subconjunto de la muestra de estudio anteriormente mencionada. Los parámetros funcionales se analizaron en cultivos de CPE, aislados utilizando las condiciones óptimas determinadas en la primera parte de esta tesis, en términos de adhesión, crecimiento, proliferación y vasculogénesis celular.

Los resultados obtenidos revelaron una modificación funcional de las CPE de pacientes con IAM durante 6 meses de evolución clínica. La capacidad de adhesión de las CPE de los pacientes con IAM aumentó el día del infarto, alcanzó valores máximos a los 30 días del infarto y se reestableció a niveles encontrados en sujetos sanos tras 6 meses de evolución clínica. A nivel proteico, los niveles de expresión de las integrinas $\alpha 5$ and αv siguieron un patrón similar al que seguía la capacidad de adhesión de las CPE en la evolución del IAM. Sin embargo, las capacidades de crecimiento, proliferación y vasculogénesis de las CPE de pacientes con infarto estaban reducidas en las fases agudas del IAM y se restablecieron a los valores encontrados en sujetos sanos a los 6 meses de evolución clínica.

El efecto de las MP^{Shh+} en la función celular de las CPE se determinó en 5 cultivos de CPE aislados de muestras de sangre periférica de sujetos sanos. En primer lugar, las CPE se trataron con MP^{Shh+} (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) durante 24h y, a continuación, se estudió la expresión génica, la capacidad vasculogénica *in vitro* e *in vivo*, la producción de NO y la reorganización del esqueleto de actina, tanto en presencia como en

Resumen/Summary

ausencia de inhibidores específicos de la ruta de señalización de Sonic Hedgehog.

Las MP^{Shh+} incrementaron la expresión de los genes *PTCH1*, *SMO*, *GLI1*, *VEGFA*, *KDR*, *NOS3* y *KLF2*. El tratamiento con MP^{Shh+} incrementó la expresión proteica y la activación de la eNOS, aumentando consecuentemente la producción de NO, y la capacidad vasculogénica *in vitro* y *in vivo* de los cultivos de CPE a través de mecanismos dependientes de SMO y PI3K. Por último, las MP^{Shh+} indujeron la reorganización del citoesqueleto de actina de CPE en cultivo a través de un mecanismo dependiente de la Rho quinasa (ROCK) pero independiente de SMO.

Conjuntamente, proponemos un protocolo consenso para el aislamiento y cultivo de CPE, a partir de muestras de sangre periférica humana, con una morfología, fenotipo y comportamiento funcional endotelial. Nuestros resultados sugieren la existencia de una lesión endotelial tras el infarto, acompañada de la activación de los mecanismos de reparación endotelial, principalmente mediado por las CPE, en las fases iniciales después de un evento isquémico. Además, las CPE sufren un cambio en su comportamiento funcional durante la evolución clínica del IAM, con un predominio de la capacidad de adhesión en las fases iniciales que es atenuada en fases más tardías a favor de las capacidades de crecimiento, proliferación y vasculogénicas. Las MP^{Shh+} pueden representar una nueva herramienta terapéutica

Resumen/Summary

para el tratamiento de enfermedades isquémicas ya que mejoran la producción de NO y la capacidad vasculogénica de las CPE.

Endothelial cells (EC) line up the inner surface of blood vessels and conform the endothelium, now considered a very active organ in regulating the vasomotor tone, blood cell trafficking, hemostatic balance, permeability, proliferation, survival, and innate and adaptive immunity. Traditional cardiovascular risk factors such as hypercholesterolemia, hypertension, diabetes, and smoking may cause endothelial injury, one of the major initiating steps in the pathogenesis of atherosclerosis, predisposing to the development and progression of cardiovascular diseases. Nowadays, cardiovascular disease is the leading cause of death worldwide, and its most threatening manifestation is the acute coronary syndrome that occurs when blood flow is prevented to part of the heart secondary to the rupture of an atherosclerotic plaque.

In 1997, with the discovery of endothelial progenitor cells (EPC), an alternative mechanism to angiogenesis for the maintenance and repair

Resumen/Summary

of the endothelium to counteract ongoing endothelial cell injury, replace dysfunctional endothelium, and enhance tissue repair after ischemic vascular injury became apparent. The process by which EPCs contribute to formation of new vessels is known as postnatal vasculogenesis and takes place through four steps, namely mobilization, homing, invasion and differentiation.

Most studies have centered their attention on the molecular definition and quantitative determination of EPC by flow cytometry attending to the expression of a progenitor marker, CD34, an endothelial marker, the Kinase-insert Domain Receptor (KDR) and the lack of expression the panleucocyte marker CD45. However, analysis of blood samples by flow cytometry only provides quantitative information about EPC and the expression of a limited number of markers in their surface.

In adult peripheral blood samples EPC represent only 0.0001% of total mononuclear cells (MNC). To obtain qualitative data, EPC need to be isolated and expanded in culture. All the existing protocols for isolating EPC differ in culture time and conditions. The short-term protocols, <7 days, yield cells with myeloid and hematopoietic characteristics expressing CD14 and CD11b and CD45 markers. Long-term culture of MNC, >14 days, yield cells with a more EC phenotype, higher proliferative capacity and able to differentiate to mature EC. EPC obtained under these different culture conditions exhibit slight or profound differences on their phenotype and biological function. A

systematic comparison of the most used conditions for EPC culture is still required in order to obtain a consensus protocol.

The biological significance of EPC has been demonstrated by increasing evidence of their role in postnatal vasculogenesis in physiological conditions and pathological conditions such myocardial and limb ischemia and atherosclerosis. EPC are reduced in peripheral blood samples of subjects with cardiovascular risk factors and established atherosclerosis, and this reduction, together with increased circulating endothelial cell (CEC) levels, a marker of the presence and severity of vascular injury, are considered a marker of the ongoing vascular damage. Additionally, EPC reduction has been found to be an independent predictor of future cardiovascular events. Similarly, EPC functional capacities are also impaired with the presence of cardiovascular risk factors and in different pathological settings such in cardiovascular diseases.

Microparticles (MP) are small vesicles shed from plasma membrane of activated or apoptotic cells. They are 0.1 to 1 μm in diameter and heterogeneous in composition. They represent a novel way for intercellular communication as vectors by transporting and delivering biological messages that actively participate in the pathophysiology, notably in cardiovascular diseases. However, because MP's capability to deliver secretory molecules such as cytokines, chemokines, growth factors as well as exogenous nucleic acids they can be potential useful therapeutic tools for treating different pathological conditions.

Resumen/Summary

MP generated from T lymphocytes under mitogenic conditions carry the morphogen Sonic Hedgehog (Shh) (MP^{Shh+}). MP^{Shh+} have previously been shown to have beneficial effect on ischemic murine model as well as on cultured EC of human origin by correcting endothelial injury and favor angiogenesis. MP^{Shh+} are able to induce NO production and to reduce reactive oxygen species on EC further supporting the beneficial effect on cardiovascular system.

This thesis aims to set the optimal conditions for EPC isolation and culture from human peripheral blood samples and to determine the morphology, phenotype and functional capacity of EPC obtained under these optimal conditions. Another aim, is to analyze the mobilization of CEC and EPC and to study EPC functional capacities in healthy subjects and AMI patients during 6 months of clinical evolution. Our last aim is to determine the effect of MP^{Shh+} on functional capacities of EPC isolated from healthy subjects.

To determine the optimal conditions for EPC isolation and culture, peripheral blood samples from 50 healthy subjects were obtained at the Cardiology Service in the Hospital Clínico of Valencia. First, we selected the optimal blood sample withdrawal conditions in terms of volumen, anticoagulant and blood sample procesing time. Then, culture conditions (extracellular matrix, culture media composition) were analysed. Functional capacity of EPC isolated under optimal conditions was measured in terms of cell adhesion, growth,

proliferation and vasculogenesis and compared to HUVEC, the standard reference for EC culture.

Our results showed the need to control a number of parameters related to sample collection and to culture conditions to obtain an optimal functional performance of EPC. The conditions tested here indicated that: (i) peripheral blood should be recovered in heparin tubes; (ii) in a minimum volume of 30 ml; (iii) blood samples should be processed within 2 hours after collection; (iv) fibronectin was the best extracellular matrix and (v) culture media should be supplemented with 20% FBS. EPC isolated under optimal conditions showed morphological, phenotypic and functional characteristics comparable to endothelial cells from other sources, such as HUVEC.

The mobilization of CEC and EPC was studied in peripheral blood samples of 50 healthy subjects and 50 acute myocardial infarction patients (AMI) during 6 months of clinical evolution, all recruited at the Cardiology Service in the Hospital Clínico of Valencia. AMI patient inclusion criteria were: age \leq 75 years, first AMI and the presence of more than one traditional vascular risk factor. CEC and EPC were defined by flow cytometry as cells expressing CD45-CD31+CD146+ and CD45-CD34+KDR+ respectively.

We found that, when compared to healthy subjects, CEC levels were increased at the day of infarction, and this elevated CEC levels were maintained without changes during 6 months of clinical evolution

Resumen/Summary

revealing an ongoing vascular damage. On the other hand, EPC levels in patients suffering AMI triplicated control levels at the day of infarction, represented 6 times EPC control levels at 30 days of infarction, and showed a reduction after 6 months of clinical evolution. This indicates the activation of endothelial reparatory mechanism at very early stages of the AMI that is attenuated after 6 month of clinical evolution.

EPC functional capacities were determined in a subset of 10 healthy subjects and 10 AMI patients during 6 months of clinical evolution of the above mention study sample. Functional parameters were analyzed in cultures of EPC, isolated by using the optimal set of conditions determined in the first part of this thesis, in terms of cell adhesion, growth, proliferation and vasculogenesis.

Our results revealed functional modifications on EPC isolated from AMI patients during 6 months of clinical evolution. When compared with healthy subjects, adhesive capacity of EPC from AMI patients was increased at the day of infarction, peaked at 30 days after infarction, and was restored to control values after 6 months of clinical evolution. Protein levels of integrin $\alpha 5$ and αv followed a pattern similar to EPC adhesive capacity in the AMI. However, proliferative, growth and vasculogenic capacities were found to be reduced in the acute stages of AMI and were reestablished to values found in healthy subjects after 6 months of clinical evolution.

The effect of MP^{Shh+} on EPC cell function was determined on EPC isolated from peripheral blood samples of 5 healthy subjects. EPC were treated with MP^{Shh+} (10 µg/mL) for 24 hours and, then, gene expression, *in vitro* and *in vivo* vasculogenesis, nitric oxide production and actin cytoskeleton remodeling were studied, either with the presence or in the absence of specific inhibitors for the Sonic Hedgehog signaling pathway.

We found that MP^{Shh+} increased *PTCH1*, *SMO*, *GLI1*, *VEGFA*, *KDR*, *NOS3* y *KLF2* gene expression. MP^{Shh+} treatment increased eNOS protein expression and activation, increasing consequently NO production, and *in vitro* and *in vivo* vasculogenic capacity of EPC cultures in a SMO and PI3K dependent mechanisms. Finally, MP^{Shh+} induced the remodeling of the actin cytoskeleton in a Rho kinase (ROCK)-dependent but SMO-independent way.

Together, we proposed a consensus procedure for isolating and culturing EPC from human peripheral blood samples with an endothelial-like morphology, phenotype and functional behavior. Our results suggest the existence of an endothelial injury as a consequence of the infarction that is accompanied with the activation of the endothelial reparatory mechanisms, mainly mediated by EPC, at very early stages after the ischemic event. Additionally, EPC suffer a functional behavioral change throughout AMI clinical evolution, with a predominant adhesive capacity at early stages of AMI that is attenuated at late stages of AMI in favor to growth, proliferative and

Resumen/Summary

vasculogenic capacities. MP^{Shh+} can represent a novel therapeutic tool for treating ischemic diseases as they improve EPC NO production and vasculogenic capacity.

1 Introducción

1.1 Endotelio y función endotelial

El interior de los vasos sanguíneos y linfáticos está recubierto por una monocapa de células endoteliales (CE) que conforman el endotelio. El endotelio es considerado un órgano activamente implicado en funciones vitales del sistema cardiovascular (Aird, 2007; Eckers and Haendeler, 2015). Las CE realizan funciones homeostáticas clave como mantener la sangre en estado fluido (hemostasis), regular el flujo sanguíneo (tono vascular), regular el intercambio de sustancias con los tejidos (permeabilidad vascular) y regular la respuesta inmune (tráfico leucocitario e inflamación). El endotelio sano ejerce acciones antiinflamatorias, antitrombóticas, anticoagulantes vasodilatadoras (Figura 1) (Landmesser et al., 2004; Pober et al., 2009).

La integridad endotelial es necesaria para el funcionamiento normal de los vasos sanguíneos y para el mantenimiento de un estado no trombótico. Sin embargo, esta integridad puede verse comprometida debido a una lesión mecánica o a diferentes estados patológicos

Introducción

(Arnout et al., 2006). Cuando esto ocurre, la hemostasia permite al organismo detener la hemorragia, mantener la sangre en un estado fluido y eliminar los coágulos sanguíneos cuando la integridad vascular ha sido restablecida.

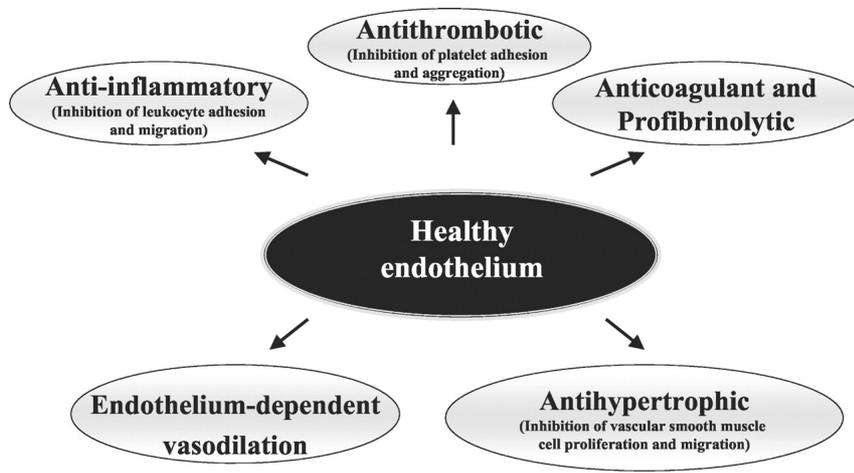


Figura 1. Función endotelial. El endotelio sano ejerce acciones antiinflamatorias, antitrombóticas, anticoagulantes y profibrinolíticas, antihipertensivas y vasodilatadoras. Imagen tomada de Landmesser et al., 2004.

Para realizar sus funciones, las CE sintetizan diferentes sustancias reguladoras. Entre las sustancias anticoagulantes encontramos el inhibidor de la ruta del factor tisular, el heparán, la trombomodulina, el receptor endotelial para la proteína C, la prostaciclina y el óxido nítrico (NO). Como sustancias procoagulantes las CE sintetizan y liberan el factor de von Willebrand (vWF), el factor tisular y el inhibidor del activador del plasminógeno (Aird, 2007).

El endotelio es también capaz de regular el tono vascular mediante la liberación de diferentes sustancias vasoactivas. Entre las sustancias vasodilatadoras encontramos el NO, la prostaciclina y el factor hiperpolarizante derivado del endotelio. Como sustancias vasoconstrictoras el endotelio puede liberar el tromboxano A₂, la endotelina-1, la prostaglandina H₂, la angiotensina II y radicales libres como el anión superóxido O₂⁻ (Figura 2) (Grosser et al., 2006).

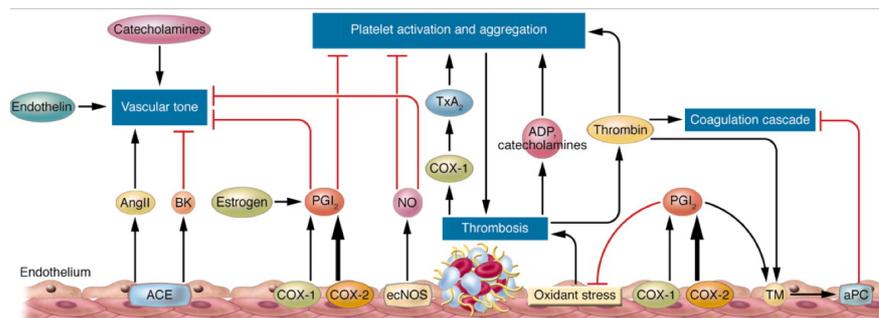


Figura 2. Tono vascular. Sustancias vasoactivas producidas y liberadas por las CE para la regulación del tono vascular. Imagen tomada de Grosser et al., 2006.

El NO es sintetizado por las CE fundamentalmente por la acción enzimática de la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) que convierte el aminoácido L-Arginina en citrulina y NO. El NO producido por las CE es capaz de relajar a las células del músculo liso presentes en las paredes vasculares mediante la activación de la guanilato ciclasa soluble que genera GMP cíclico y activa a la proteína quinasa G. Además el NO tiene un efecto anticoagulante e inhibe la proliferación de las células del músculo liso (Deanfield et al., 2005; Grosser et al., 2006).

Introducción

Las CE también producen sustancias vasoconstrictoras como la endotelina-1, los prostanoides vasoconstrictores y la angiotensina II. El equilibrio entre sustancias vasodilatadoras y vasoconstrictoras esta finamente regulado por las CE, que deben integrar y coordinar numerosas señales para modular el flujo sanguíneo.

Todas las funciones que las CE realizan para mantener la homeostasis requieren de un endotelio sano e intacto. Por este motivo la integridad del endotelio es indispensable para una correcta función del mismo. La lesión endotelial es un componente crítico para el desarrollo de la enfermedad aterosclerótica que puede culminar finalmente en algún tipo de evento cardiovascular (Khakoo and Finkel, 2005). Además, muchos factores de riesgo cardiovascular como la hipercolesterolemia, la hiperglucemia, la hipertensión y el tabaquismo pueden inducir daño en las CE y comprometer la integridad del endotelio.

El mantenimiento de la integridad endotelial se creía que se producía únicamente a través de la división y migración lateral de CE residentes, adyacentes a la zona donde se había producido la lesión endotelial. Sin embargo, recientemente se ha demostrado la existencia de un tipo celular derivado de la médula ósea con capacidad de regeneración vascular que estaría implicado en el mantenimiento de la integridad endotelial (Khakoo and Finkel, 2005). A estas células se las conoce como células progenitoras endoteliales (CPE) y se cree que juegan un papel fundamental en el mantenimiento de la integridad

endotelial tanto fisiológica como patológicamente (Deanfield et al., 2007; Op den Buijs et al., 2004).

1.2 Células progenitoras endoteliales

El descubrimiento en 1997 de la existencia de CPE circulantes derivadas de la médula ósea en el adulto cambió la visión de la regeneración vascular (Asahara et al., 1997). Desde entonces se han publicado numerosos artículos que describen la implicación de las CPE en el mantenimiento de la integridad endotelial en el estado fisiológico, en la regeneración endotelial en enfermedades cardiovasculares (Grisar et al., 2011; Shantsila et al., 2007; Williams and Silva, 2015) y en la vascularización tumoral en diferentes tipos de cáncer (Khakoo and Finkel, 2005).

1.2.1 Origen de las células progenitoras endoteliales

Debido a su similitud antigénica con las células madre hematopoyéticas, se ha considerado a la médula ósea como origen de las CPE. Este hecho ha sido corroborado por numerosos estudios en modelos animales de trasplante de médula ósea, donde se ha demostrado la incorporación de las CPE derivadas de la médula ósea en diferentes sitios de neovascularización fisiológica (formación del endometrio) y patológica (crecimiento tumoral y procesos isquémicos) (Kawamoto and Asahara, 2007). Estos hallazgos sugieren que una de las fuentes principales de CPE es la médula ósea, aunque no la única. Otros autores han aislado células madre a partir de muestras de corazón con capacidad de diferenciarse hacia un linaje endotelial (Beltrami et al., 2003; Psaltis and Simari, 2015).

1.2.2 Movilización y emplazamiento de las células progenitoras endoteliales

Para que las CPE derivadas de la médula ósea puedan participar en la reparación endotelial tienen que responder a diferentes señales que permitan su movilización desde la médula ósea hacia el torrente sanguíneo.

De entre los muchos factores que afectan a la movilización de las CPE, quizá el más importante sea el factor vascular de crecimiento endotelial (VEGF) (Asahara and Kawamoto, 2004). Son muchos los trabajos publicados que describen un aumento de la movilización de las CPE en respuesta al VEGF (Figuras 3 y 4A) (Kawamoto and Asahara, 2007; Khakoo and Finkel, 2005). Cuando existe una falta de aporte de oxígeno en algún tejido, se crea un ambiente hipóxico que estimula la expresión del VEGF, principalmente debido al efecto del factor inducible por hipoxia-1 (HIF-1) sobre la transcripción del VEGF. En estudios con animales se observó una rápida movilización de las CPE hacia el torrente sanguíneo tras la administración de VEGF exógeno (Asahara et al., 1999). En otro estudio realizado en pacientes que habían sufrido trauma vascular en forma de quemaduras severas se observó un aumento en el número de CPE de hasta 50 veces a las 12 horas tras haberse producido la lesión que se normalizó a las 72 horas. En estos pacientes, la cinética mostrada por las CPE mimetizaba los niveles de VEGF encontrados en el plasma sanguíneo (Gill et al., 2001).

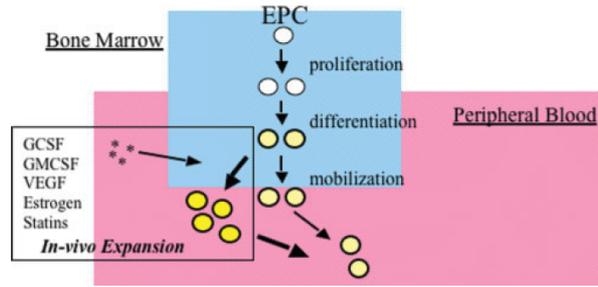


Figura 3. Movilización de las CPE en respuesta a diferentes factores de crecimiento. Imagen tomada de Asahara and Kawamoto, 2004.

Otra citoquina implicada en la movilización de CPE es el factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), comúnmente utilizado en clínica para la recolección de células madre hematopoyéticas CD34+ a partir de muestras de sangre de pacientes que va a recibir un trasplante de médula ósea. El G-CSF estimula la movilización de las CPE desde la médula ósea, la incorporación en sitios de neovascularización *in vivo*, y la proliferación y diferenciación de las CPE *in vitro* (Takahashi et al., 1999). Recientemente, la estrategia terapéutica de movilización de las CPE ha implicado no sólo a estimulantes hematopoyéticos naturales sino también a medicamentos ampliamente utilizados en clínica. Un ejemplo lo constituyen las estatinas, inhibidores de la actividad 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A reductasa, que reducen el colesterol total. Se ha observado que las estatinas contribuyen a vascularización postnatal a través de un aumento en la movilización de las CPE desde la médula ósea de manera Akt dependiente (Aicher et al., 2005; Vasa et al., 2001) (Figura 4A).

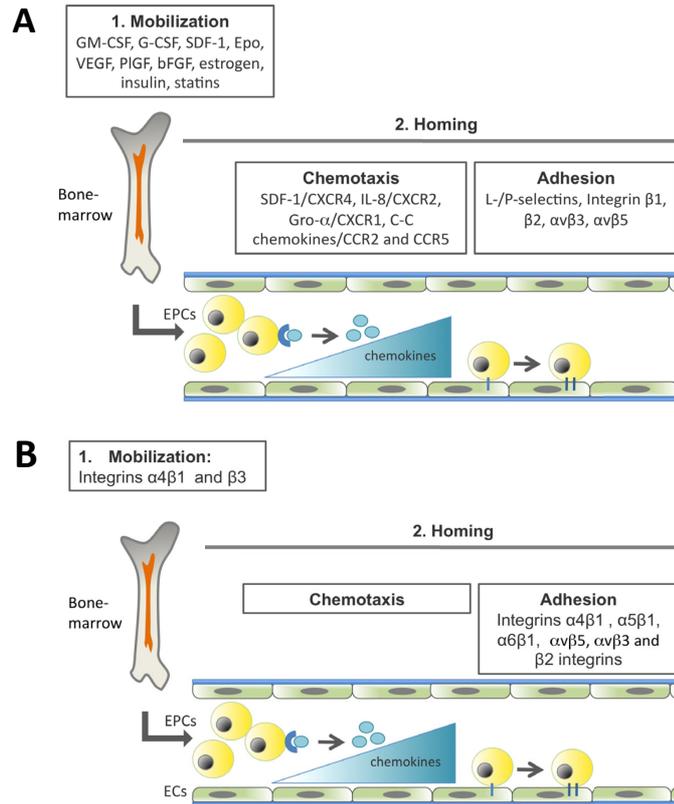


Figura 4. Movilización y emplazamiento de las CPE. (A) Factores de crecimiento, quimioquinas y otras molécula implicadas en la movilización y emplazamiento de las CPE. **(B)** Integrinas implicadas en la movilización y emplazamiento de las CPE. Imagen tomada de Caiado and Dias, 2012.

Sin embargo, la movilización de las CPE desde la médula ósea requiere de la actividad de diversas proteinasas como la elastasa, la catepsina y las metaloproteinasas que bloqueen las uniones que mantienen a las CPE retenidas en la médula ósea. La movilización de CPE en respuesta a VEGF estaría regulada a través de un mecanismo dependiente de la metaloproteinasas 9 (Heissig et al., 2002). También son importantes en la movilización de las CPE las

Introducción

integrinas, especialmente, las integrina $\alpha 4$ y $\beta 3$. En animales, la administración de anti-integrina $\alpha 4$ incrementa la movilización de CPE, sugiriendo un papel fundamental de esta integrina en la retención de las CPE en la médula ósea (Qin et al., 2006) (Figura 4B).

Las integrinas son una familia de proteínas de adhesión transmembrana heterodiméricas que median interacciones célula-célula y célula-matriz extracelular. Las integrinas son responsables de la arquitectura celular y tisular y también funcionan como transductores de señal regulando procesos como la supervivencia, proliferación, diferenciación y migración. Cada integrina esta compuesta por dos subunidades: una subunidad α , de aproximadamente 800 aminoácidos, y una subunidad β , de 1000 aminoácidos. En vertebrados superiores existen 18 subunidades α y 8 subunidades β que se combinan para formar hasta 24 heterodímeros diferentes. La combinación de estas subunidades en la formación de los heterodímeros es lo que confiere la especificidad de ligando (Caiado and Dias, 2012; Hynes, 2002).

Una vez en el torrente sanguíneo, las CPE tiene que ser capaces de reconocer al endotelio dañado, ser activadas por quimioquinas y citoquinas liberadas localmente y adherirse a CE activadas o a componentes de la matriz extracelular para, finalmente, incorporarse y diferenciarse a CE maduras o actuar de forma paracrina sobre las CE existentes (Caiado and Dias, 2012). Este

proceso se conoce como “homing” o emplazamiento y, a pesar de la intensa investigación en este campo, este mecanismo no se conoce completamente. El reclutamiento de las CPE requiere una secuencia de múltiples pasos de adhesión y eventos de señalización que incluyen la quimioatracción, adhesión, trans migración y finalmente la diferenciación a CE maduras (Figura 4). Los primeros pasos del emplazamiento de las CPE en el tejido isquémico requiere de la adhesión de las CPE al endotelio activado por las citoquinas liberadas durante el proceso isquémico, mediado por las selectinas P, selectinas E y diferentes integrinas (Vajkoczy et al., 2003; Williams and Silva, 2015). Las principales integrinas implicadas en el proceso de emplazamiento y adhesión son las integrinas $\alpha 5$, αV , $\beta 1$ y $\beta 2$ (Caiado and Dias, 2012).

Cuando las integrinas $\alpha 5\beta 1$ se expresan en CPE, éstas son capaces de reconocer y adherirse directamente a componentes de la matriz extracelular, concretamente a la fibronectina (Pytela et al., 1985). Además, la integrina $\alpha 5\beta 1$ está también implicada en numerosos procesos celulares como la proliferación, migración y regulación de la expresión génica. Se ha observado que el tratamiento con estatinas aumenta la expresión de la $\alpha 5\beta 1$ en CPE aumentando, por lo tanto, la capacidad de las mismas para adherirse en lugares donde se ha producido una lesión vascular (Walter et al., 2002). El papel de la integrina $\alpha 5\beta 1$ en el emplazamiento de las CPE se ha demostrado también en un

Introducción

modelo murino de lesión vascular pulmonar (Wary et al., 2009) (Figura 4B).

La integrina αV , principalmente los heterodímeros $\alpha V\beta 3$ y $\alpha V\beta 5$, es capaz de unirse a diferentes ligandos entre los que encontramos la vitronectina, la fibronectina, osteopontina, el fibrinógeno y el vWF (Hynes, 2002). Estas integrinas también juegan un papel muy importante en el emplazamiento de las CPE en sitios de reparación vascular. Por ejemplo, en conejos, cuando las integrinas $\alpha V\beta 3$ y $\alpha V\beta 5$ son bloqueadas por péptidos específicos se observa una disminución en la capacidad de las CPE para reendotelizar arterias denudadas (Kokubo et al., 2007). Otro estudio demuestra el papel fundamental de la integrina $\alpha V\beta 5$ en la adhesión de las CPE sobre CE maduras (Caiado and Dias, 2012) (Figura 4B).

Una vez movilizadas y emplazadas en la zona donde se ha producido la lesión endotelial, las CPE invadirán y migrarán hacia el lugar donde es necesaria la creación de una nueva red vascular. Allí, se diferenciarán a CE completamente maduras o ejercerán una función paracrina liberando diferentes citoquinas y factores de crecimiento que estimulen el proceso de vascularización por parte de las células locales.

1.2.3 Vasculogénesis

La vasculogénesis define la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de CPE en el embrión o en el adulto (vasculogénesis postnatal) (Fischer et al., 2006).

En el embrión, los primeros vasos sanguíneos se originan cuando las células del mesoderma extraembrionario de la pared del saco vitelino son reclutadas para formar los islotes sanguíneos. La proximidad en la que se dan los procesos de diferenciación hematopoyética y endotelial sugiere la existencia de una célula precursora mesodérmica bipotencial común, el hemangioblasto (Choi, 2002). El proceso vasculogénico se define, por lo tanto, como la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de células progenitoras (angioblastos) en el embrión en desarrollo.

En contraposición al concepto de vasculogénesis encontramos la angiogénesis, definida como la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de otros ya existentes (Potente et al., 2011). Este proceso ocurre durante el desarrollo del embrión, durante el crecimiento y en el adulto, principalmente en la cicatrización de heridas.

Durante mucho tiempo se ha creído que la neovascularización en el adulto únicamente se daba a través del proceso angiogénico. Sin embargo, en 1997, el descubrimiento de la existencia de CPE presentes en la fracción de células mononucleadas (CMN) de

Introducción

sangre periférica de adultos humanos (Asahara et al., 1997) modificó el paradigma de la regeneración vascular y se acuñó el término vasculogénesis postnatal para definir la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de CPE procedentes de la médula ósea en adultos (Figura 5).

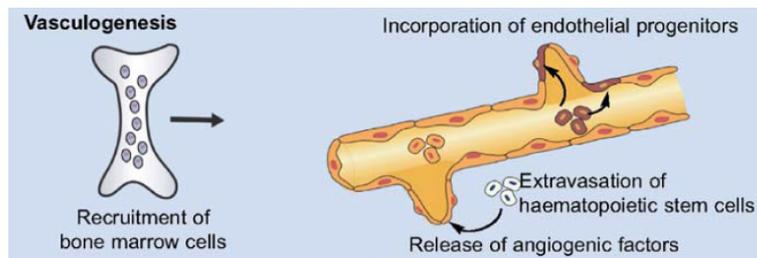


Figura 5. Vasculogénesis postnatal. Movilización de las CPE desde la médula ósea y reclutamiento de las mismas en sitios de nueva generación vascular. Imagen tomada de Fischer et al., 2006.

En estudios con modelos animales donde las CPE derivadas de la médula ósea de donante pueden ser distinguidas, se ha observado que la contribución de las CPE en la formación de nuevos vasos sanguíneos, en respuesta a la formación del tejido de granulación, puede oscilar entre un 5 y un 25% de las células implicadas (Kawamoto and Asahara, 2007).

1.2.4 Definición y caracterización de las células progenitoras endoteliales

Aunque existen algunos estudios dirigidos hacia su estandarización, la definición y caracterización de las CPE sigue siendo una cuestión controvertida (Ingram et al., 2004; Schmidt-

Lucke et al., 2010). Principalmente, la caracterización de las CPE se ha llevado a cabo mediante dos técnicas diferentes: la citometría de flujo y el cultivo de las CMN procedentes de muestras de sangre periférica.

1.2.4.1 Caracterización de las células progenitoras endoteliales por citometría de flujo

Muchos investigadores han identificado a las CPE circulantes mediante citometría de flujo y el uso de anticuerpos dirigidos contra antígenos intracelulares o de superficie específicos y atendiendo a la expresión de uno o una combinación de varios de estos marcadores (Timmermans et al., 2009). La tabla 1 pone de manifiesto la falta de consenso en la definición de un fenotipo específico para las CPE. Este hecho supone una complicación añadida a la hora de interpretar y comparar los resultados con los obtenidos por otros investigadores que han utilizado una combinación diferente de marcadores para definir las CPE.

Immunophenotype in humans	
CD34 ⁺ CD31 ⁺	CD34 ⁺ VE-Cadherin ⁺ CD3 ⁻
CD34 ⁺ CD62L ⁺	CD34 ⁺ CD133 ⁺ VEGFR-2 ⁺ CD45 ⁺
CD34 ⁺ CD133 ⁺	CD34 ⁺ CD45 ⁺ CD146 ⁺
CD34 ⁺ CD11b ⁺	CD34 ⁺ CD45 ⁻
CD34 ⁺ CD45 ⁺	CD133 ⁺
CD34 ⁺ CD133 ⁺ CD45 ⁺	CD133 ⁺ CD45 ⁻
CD34 ⁺ FGFR1 ⁺	CD133 ⁺ VEGFR-2 ⁺
CD34 ⁺ VEGFR-2 ⁺	CD14 ⁺ VEGFR-2 ⁺
CD34 ⁺ CD133 ⁺ VEGFR-2 ⁺	CD14 ⁺ CD34 ⁺
CD34 ⁻ CD133 ⁺ VEGFR-2 ⁺	ALDH ^{bright}
	CD31 ⁺

Tabla 1. Diversos inmunofenotipos propuestos para las CPE. Tomada de Fadani et al., 2008.

Introducción

De acuerdo con el término de “células progenitoras endoteliales”, éstas deberían presentar un marcador progenitor y un marcador endotelial que definieran su fenotipo antigénico.

Uno de los marcadores para el fenotipo progenitor más utilizado en humanos es el CD34, una sialomucina expresada por las células madre hematopoyéticas que podría funcionar como molécula de adhesión entre CE y precursores hematopoyéticos (Fadini et al., 2008a).

En cuanto a antígenos endoteliales encontramos el receptor 2 del VEGF, también conocido como KDR/Flk1, el CD31 o PECAM-1 y el vWF. El principal receptor del VEGF, el KDR, se expresa en CE pero también en células madre.

La combinación de marcadores CD34 y KDR muestra una expresión solapada de células madre y de CE. Células CD34+KDR+ podrían ser células progenitoras comprometidas al linaje endotelial representando así el fenotipo antigénico más ajustado a la definición de CPE (Fadini et al., 2008a). Otros investigadores han estudiado en paralelo la expresión del antígeno panleucocitario CD45, sugiriendo que las CPE no expresarían el marcador leucocitario CD45 (Case et al., 2007). Por lo tanto, el fenotipo antigénico más aceptado y que mejor define a las CPE es CD34+KDR+CD45- (Fadini et al., 2008a).

La determinación del número de CPE como biomarcadores cardiovasculares en ensayos clínicos requiere de una técnica sencilla, rápida y reproducible y la citometría de flujo posee todas estas características. Sin embargo, los niveles de CPE (células CD34+KDR+CD45-) tan sólo representan alrededor de 50-100 células por millón de CMN (0,0001%) (Ingram et al., 2005a) o, lo que es lo mismo, de 350-700 células/mL de sangre (Fadini et al., 2012). Por este motivo, la determinación de CPE en muestras de sangre periférica por citometría de flujo requiere de la adquisición de entre 1.000.000 y 2.000.000 de eventos con el fin de incrementar el número de células positivas (CD34+DKR+CD45-) y mejorar su reproducibilidad.

La presencia en el torrente sanguíneo de otro tipo celular, las células endoteliales circulantes (CEC), complica aún más la determinación de las CPE en muestras de sangre periférica. Las CEC son CE maduras desprendidas de la pared vascular, bien por recambio celular o como consecuencia a un proceso traumático o isquémico (Blann et al., 2005; Schmidt et al., 2015). Por este motivo, las CEC han sido utilizadas extensamente como marcadores de lesión endotelial en diferentes estados patológicos (Boos et al., 2006; Mutin et al., 1999).

El CD146 o molécula de adhesión de células de melanoma, es considerado como el principal marcador de células

endoteliales circulantes (CEC) aunque también se ha observado su expresión en células mesenquimáticas y linfocitos activados. Sin embargo, la expresión simultánea de los marcadores CD146 y CD31, junto con la no expresión del CD45, (CD31+CD146+CD45-), se considera la identificación fenotípica más aceptada para las células endoteliales circulantes (Erdbruegger et al., 2006; Madonna and De Caterina, 2015; Mancuso et al., 2009).

Utilizando las combinaciones antigénicas presentadas anteriormente para las CPE y CEC se logra eliminar cualquier interferencia en el recuento de estos tipos celulares en muestras de sangre periférica (Fadini et al., 2012).

1.2.4.2 Caracterización de las células progenitoras endoteliales por cultivo celular

Otros investigadores han utilizado el cultivo de CMN obtenidas a partir de muestras de sangre periférica para aislar y caracterizar a las CPE. La falta de un método consenso para el aislamiento de los progenitores endoteliales supone, de nuevo, una dificultad a la hora de interpretar los resultados y compararlos con los obtenidos en otros laboratorios. La variedad de los protocolos de cultivo utilizados para aislar las CPE hace que este método sea mucho más complejo que la citometría de flujo (Fadini et al., 2008b).

El primer protocolo presentado para el aislamiento de CPE a partir de muestras de sangre en el adulto consistió en la siembra de CMN CD34+ sobre una matriz de fibronectina y su cultivo durante 7 días en medio de cultivo endotelial específico (Asahara et al., 1997). *In vitro* estas células mostraron diferentes propiedades endoteliales como la captación de LDL acetilada (acLDL) y la unión de Ulex lectina, además de expresar marcadores endoteliales como CD31 y KDR. En el modelo animal de isquemia, estas células se incorporaron en sitios de formación de nuevos vasos sanguíneos.

Actualmente existen numerosos protocolos para el cultivo de CPE. Tras una extensa revisión bibliográfica pudimos observar que en estos protocolos, las principales fuentes de CPE son muestras de sangre periférica y sangre de cordón umbilical, y que los volúmenes de sangre procesado varían entre 50-100 mL y 20 mL respectivamente (Ingram et al., 2004; Schmidt-Lucke et al., 2010). Además, existían diferencias en el anticoagulante utilizado en la extracción de las muestras de sangre, en el tiempo transcurrido entre la obtención de la muestra de sangre y su procesado, en el medio de cultivo, en los tiempos de cultivo y en la matriz extracelular (Fadini et al., 2008a). En función de las condiciones utilizadas para su cultivo, las CPE obtenidas muestran unas características funcionales u otras. A continuación se detallan los protocolos de cultivo más utilizados en la bibliografía.

Introducción

En la mayoría de estudios las CPE se aíslan a partir de la fracción de CMN de muestras de sangre. De esta manera, Hill et al. propusieron un protocolo en el que, inicialmente, las CMN se sembraron sobre una matriz de fibronectina. Tras 48 horas de cultivo, se recuperaron las células no adherentes y éstas fueron resemebradas en medio de cultivo específico endotelial durante otros 7 días adicionales (Hill et al., 2003). Transcurrido este tiempo en el cultivo aparecieron colonias compuestas por células esféricas en el centro y células fusiformes en la periferia (Figura 6A). A estas colonias se las llamó unidades formadoras de colonias de células endoteliales o CFU-Hill y su número estaba correlacionado con la función endotelial e índices acumulativos de riesgo cardiovascular (Figura 6B).

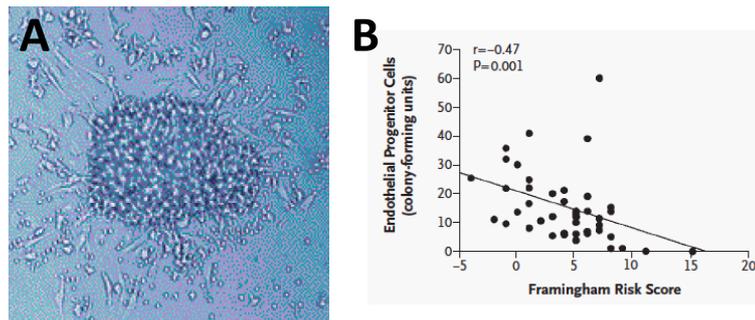


Figura 6. Protocolo de aislamiento de CPE CFU-Hill. (A) Micrografía de contraste de fases de colonias de CPE obtenidas con el protocolo de Hill et al. **(B)** Asociación entre el número de colonias de CPE y factores de riesgo cardiovascular. Tomado de Hur et al., 2004.

Otros investigadores utilizaron condiciones de cultivo diferentes, evitaron el presembrado y cultivaron las CMN

durante periodos de tiempo más largos, comprendidos entre 2 y 4 semanas (Hur et al., 2004; Vasa et al., 2001). Para ello, las CMN se sembraron sobre matrices extracelulares de fibronectina o gelatina y se incubaron durante 24 horas. Tras la incubación, las CMN no adheridas se eliminaron y se continuó con el cultivo en medio endotelial específico de aquellas células que permanecieron adheridas a la matriz extracelular en medio endotelial específico. Bajo estas condiciones de cultivo aparecieron claramente dos tipos de CPE que podían ser distinguidas fenotípicamente, las CPE tempranas y las CPE tardías (Figura 7) (Rosell et al., 2009).

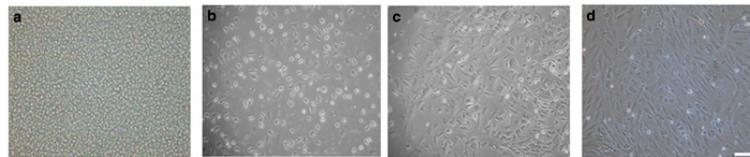


Figura 7. Micrografía de contraste de fases de cultivos de CPE. (A) CMN en el día de la siembra. **(B)** CPE tempranas aparecidas tras 5 días de cultivo. **(C)** Primeras colonias de CPE tardías tras 15 días de cultivo. **(D)** cultivos confluentes de CPE. Imagen tomada de Yoder et al., 2007.

En otros protocolos se utilizó colágeno como matriz extracelular sobre la que sembró las CMN. Tras 14 días de cultivo obtuvieron células con una elevada capacidad proliferativa que presentaban un fenotipo y una morfología similar al de las CE maduras. A estas células las llamaron células formadoras de colonias endoteliales (Ingram et al., 2004; Yoder et al., 2007).

Introducción

La figura 8 recoge de forma gráfica los tres protocolos más utilizados para el cultivo de CPE y las características de los tipos celulares obtenidos.

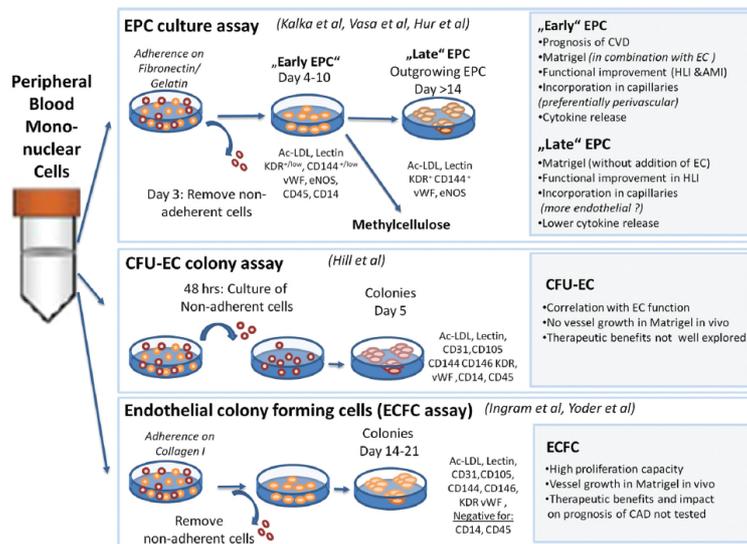


Figura 8. Esquema de los protocolos más usados para el aislamiento y cultivo de las CPE. Imagen tomada de (Fadini et al., 2012).

En resumen, los protocolos de cultivo deberían reservarse únicamente para el estudio de la función de las CPE ya que el cultivo de CPE no es un buen método para el recuento de las CPE circulantes totales, ya que dependiendo de las condiciones utilizadas se obtienen diferentes tipos celulares y, por tanto, diferentes recuentos. Además, el cultivo es la única forma de conseguir suficientes CPE para profundizar en el conocimiento de la biología de las mismas. Algunos autores han publicado una serie de recomendaciones generales para el cultivo de CPE. Para ellos, el

protocolo de cultivo debería ser optimizado, intentando evitar el protocolo CFU-Hill y el presembrado en general, y aportando una minuciosa caracterización de las CPE obtenidas (Fadini et al., 2008a).

1.3 Enfermedades cardiovasculares

Las enfermedades cardiovasculares engloban el conjunto de enfermedades que afectan al corazón y a los vasos sanguíneos e incluyen entidades tan importantes y diferentes como la cardiopatía isquémica, el ictus o accidente vascular cerebral, la hipertensión arterial y la cardiopatía reumática (Miguel, 2007).

1.3.1 Cardiopatía isquémica

La cardiopatía isquémica aguda o síndrome coronario agudo es una enfermedad del corazón secundaria a una reducción en el aporte de oxígeno y nutrientes al miocardio debido a un estrechamiento súbito de la luz de las arterias coronarias que lo irrigan. La cardiopatía coronaria tiene dos manifestaciones clínicas principales: la angina de pecho y el infarto agudo de miocardio (IAM). Este último conduce a la muerte en aproximadamente la tercera parte de las personas que lo padecen y presenta mayor incidencia en hombres que en mujeres (Banegas et al., 2006).

El IAM es ocasionado a partir de la rotura de placas inestables y/o la formación de trombos en la luz arterial, provocando la obstrucción completa del vaso y su desarrollo puede ser muy rápido (Figura 9). Si se produce una obstrucción total durante un tiempo suficientemente prolongado, el tejido miocárdico perfundido por esta arteria sufre necrosis irreversible. Sin embargo, la sintomatología clínica no permite una diferenciación precisa de los diferentes síndromes, por lo que resulta imprescindible la

realización precoz de un electrocardiograma. Los resultados del electrocardiograma permiten agrupar a los pacientes en dos grandes grupos: Infarto agudo de miocardio con elevación del segmento ST e infarto agudo de miocardio sin elevación del segmento ST. Además, para el diagnóstico de las cardiopatías coronarias también se utilizan la presencia de marcadores plasmáticos de necrosis cardíaca, como las troponinas T e I específicas y la isoenzima MB de creatina quinasa.

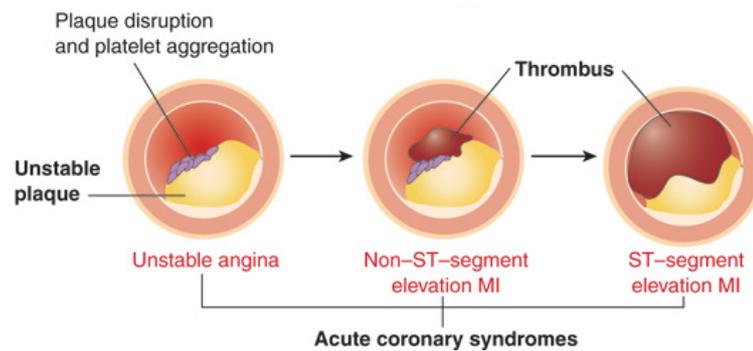


Figura 9. Diferentes manifestaciones de la cardiopatía isquémica. En el IAM con elevación del segmento ST se produce una oclusión completa de la luz arterial que conlleva la aparición necrosis en el tejido miocárdico. Tomada de <https://www.pinterest.com/pin/497155246337410409/>.

Además existen factores de riesgo cardiovascular que aumentan la probabilidad de desarrollar la enfermedad en un futuro. La lista de factores de riesgo para la cardiopatía isquémica es muy extensa, pero los más importantes se pueden clasificar en factores de riesgo cardiovascular modificables y no modificables (O'Donnell and Elosua, 2008). Entre los factores de riesgo cardiovascular modificables encontramos alteraciones en los lípidos sanguíneos,

hipertensión, consumo de tabaco, diabetes y otros factores menos importantes como la obesidad y el sobrepeso y una actividad física insuficiente. Los factores de riesgo cardiovascular no modificables más importantes son la edad, el sexo y antecedentes familiares y factores genéticos.

1.3.2 Células progenitoras endoteliales en enfermedades cardiovasculares

Como adelantábamos, el mantenimiento de un endotelio intacto es indispensable para el correcto mantenimiento de la función endotelial y homeostática de un organismo. Sin embargo, la presencia de factores de riesgo cardiovascular como la hipertensión, la hiperlipidemia y el tabaquismo pueden comprometer la integridad endotelial e inducir una alteración en la función endotelial (Eckers and Haendeler, 2015; Hadi et al., 2005). La pérdida de la integridad endotelial contribuye a las etapas iniciales del desarrollo de la formación de las lesiones ateroscleróticas como el depósito de LDL en la matriz subendotelial o la apoptosis endotelial (Lusis, 2000; Mitchell et al., 2015). Además, la disfunción endotelial está asociada de forma independiente a la aparición de eventos cardiovasculares (Lerman and Zeiher, 2005).

Numerosos trabajos sugieren que la integridad y función endotelial y, por lo tanto, la aparición de eventos cardiovasculares, está determinada por la disponibilidad de las CPE. El papel de las

CPE sería el de mantener el endotelio en el estado fisiológico y repararlo en diferentes estados patológicos que pudieran comprometer su integridad (Vita, 2011).

La movilización de las CPE ha sido un parámetro biológico muy estudiado en las enfermedades cardiovasculares (Shantsila et al., 2007). De esta manera, se observó un incremento en la movilización de células CD34+ en pacientes con IAM que alcanzó un máximo a los 7 días del infarto (Shintani et al., 2001). En este estudio se observó además que los valores plasmáticos de VEGF seguían una cinética similar a la observada para los niveles de CPE. Más tarde, Massa et al. confirmaron un rápida movilización de las CPE, definidas como células CD34+VEGFR2+CD133+ o CD34+VEGFR2+CD133-, a las 3 horas del evento isquémico en pacientes con IAM. En este caso los niveles de CPE circulantes se restablecieron a valores encontrados en sujetos sanos a los 60 días del infarto de miocardio (Massa et al., 2005). El uso de diferentes técnicas y fenotipos para la determinación de los niveles de CPE en los estudios citados anteriormente hace muy difícil una comparación directa de los resultados obtenidos. Sin embargo, estos resultados parecen indicar un incremento en la movilización de los niveles de células CD34+ y/o CPE en el IAM (Massa et al., 2005; Shintani et al., 2001). En otros estudios, los niveles de CPE circulantes, definidas por el fenotipo CD34+VEGFR2+, se han utilizado como un biomarcador capaz de predecir eventos cardiovasculares y muerte por causas cardiovasculares, lo que

Introducción

podría ayudar a identificar pacientes con elevado riesgo cardiovascular (Shantsila et al., 2007; Werner et al., 2005; Wojakowski et al., 2008). En otros estados patológicos como la disfunción eréctil, la reestenosis y la vasculopatía en pacientes con trasplante cardíaco, los niveles de CPE circulantes se encuentran reducidos respecto a los encontrados en sujetos sanos (Shantsila et al., 2007).

Se ha estudiado también el efecto de diferentes factores de riesgo en la movilización de las CPE, así como el efecto sobre la función celular en cultivos de CPE aisladas a partir de muestras de sangre. La presencia de factores de riesgo como la hipertensión, la hiperglucemia, hipercolesterolemia y el tabaquismo reducen el número de CPE circulantes y CPE en cultivo, tanto en pacientes con alguna afección cardiovascular como en sujetos sanos. De la misma manera, los factores de riesgo cardiovascular tienen un efecto nocivo en la función celular de las CPE evaluada en términos de migración, proliferación, adhesión y capacidad vasculogénica *in vitro* (Shantsila et al., 2007).

Otros estudios han centrado su atención en el efecto de diferentes medicamentos, especialmente la estatinas, los inhibidores de la enzima convertidor de angiotensina y los antagonistas de receptor de angiotensina II, sobre la movilización y función de las CPE. Las estatinas son capaces de aumentar la capacidad proliferativa de las CPE en sujetos sanos y el número de

CPE circulantes en pacientes con arteriopatía coronaria. En cuanto a la función, las estatinas son capaces de aumentar la capacidad migratoria y reducir la senescencia de las CPE en cultivo. Por otro lado, los inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina son capaces de aumentar el número de CPE en cultivo y aumentar las capacidades proliferativas, migratorias, de adhesión y vasculogénicas de las CPE en cultivo. Finalmente, los antagonistas de receptor de angiotensina II son capaces de aumentar el número de CPE en cultivo en pacientes con diabetes mellitus y reducir la senescencia de las CPE en cultivo de sujetos sanos (Shantsila et al., 2007).

1.4 Micropartículas, ruta de señalización Hedgehog y micropartículas Sonic Hedgehog

1.4.1 Micropartículas

El espacio extracelular de los organismos multicelulares contiene soluciones con numerosos metabolitos, iones, proteínas y polisacáridos. Esta solución también contiene un gran número de vesículas limitadas por membranas denominadas vesículas extracelulares. Este término incluye a exosomas, micropartículas (MP) y cuerpos apoptóticos (György et al., 2011) (Figura 10). Los exosomas son vesículas extracelulares con un diámetro que oscila entre lo 50 y 100 nm y tienen origen en los cuerpos multivesiculares. Las vesículas extracelulares de diámetro comprendido entre 100 nm y 1 μm se originan a partir de evaginaciones de la membrana plasmática y constituyen las denominadas MP (Martínez et al., 2011). Por último, los cuerpos apoptóticos son vesículas extracelulares de tamaño comprendido entre 1 μm y 5 μm y se generan a partir de células apoptóticas (György et al., 2011).

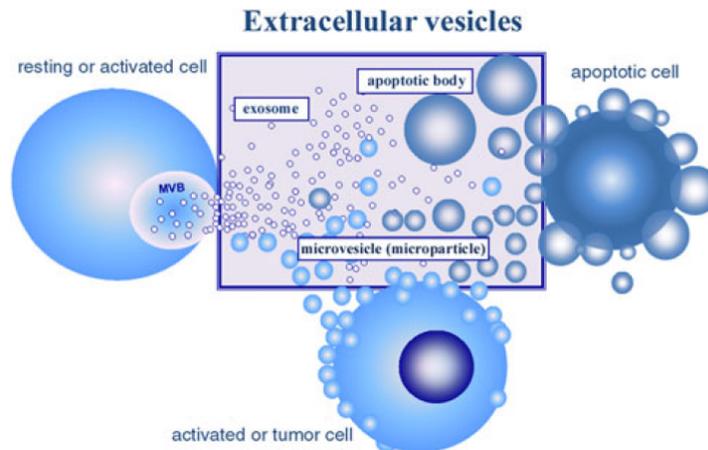


Figura 10. Vesículas extracelulares. Representación esquemática de los diferentes tipos de vesículas extracelulares. Imagen tomada de György et al., 2011.

Las MP se describieron por primera vez en 1946 como “factor precipitable” presente en el plasma libre de plaquetas con potencial para crear trombina (Chargaff and West, 1946). En 1967, las MP fueron consideradas como desechos celulares derivados de plaquetas (Wolf, 1967).

Funcionalmente, las MP son capaces de distribuir diferentes tipos de moléculas de una célula a otra. Por ello, actualmente, las MP se consideran vectores de transporte y distribución de citoquinas, quimioquinas, factores de crecimiento y ácidos nucleicos (mRNA o miRNA), lo que las confiere un gran potencial terapéutico en el tratamiento de diferentes patologías (Fleury et al., 2014; Martínez et al., 2011).

Introducción

Teóricamente, las MP pueden ser producidas por cualquier tipo celular. En el sistema cardiovascular las MP pueden ser producidas por CE, leucocitos, eritrocitos, células del músculo liso y plaquetas. Las MP producidas por las plaquetas pueden llegar a representar del 70 al 90% del total de las MP circulantes (Martínez et al., 2011).

Aunque los mecanismos de producción de MP no están completamente elucidados, numerosos estudios indican que éstas se producen tras una activación celular o por apoptosis. El fenotipo y composición, así como la cantidad de MP producidas puede variar en función del mecanismo de producción. El estímulo que induce la formación de MP incluye una activación celular mediada por una entrada de calcio desde el medio extracelular hacia el citoplasma. Esta entrada de calcio esta asociada con una proteólisis de proteínas del citoesqueleto mediada por la activación de la calpaina (Miyoshi et al., 1996; Piccin et al., 2007). También causa la regulación de determinadas fosfatasas que contribuyen a la desestabilización del citoesqueleto celular, proceso indispensable para la producción de protuberancias irregulares en la membrana plasmática. También se ha descrito una pérdida en la asimetría de la membrana plasmática y la exposición de residuos de fosfatidilserina en membrana externa de la bicapa lipídica durante la formación de las MP (Martínez et al., 2011) (Figura 11).

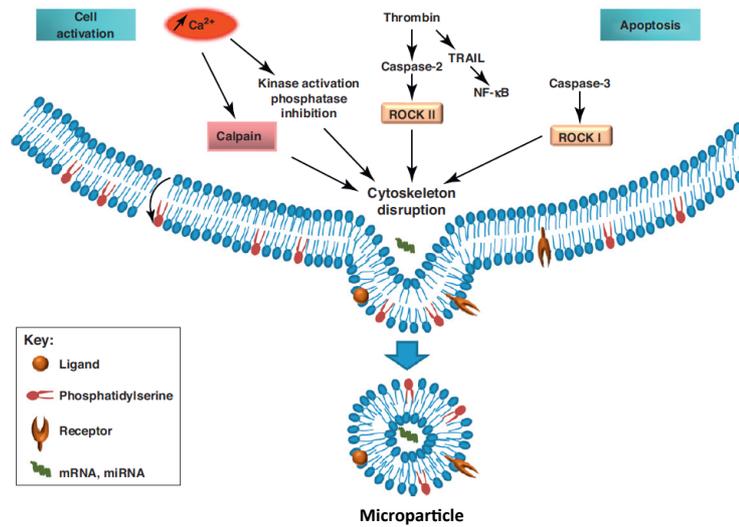


Figura 11. Formación de micropartículas mediante activación celular y apoptosis. Imagen tomada de Martínez et al., 2011.

Los elementos biológicos que contienen las MP en forma de componentes de la membrana plasmática, citosólicos y/o nucleares permiten la determinación de su origen celular y el estado en el que se encontraba la célula en el instante en que las MP fueron producidas (Bernimoulin et al., 2009; Martínez et al., 2011).

Tras interactuar con la célula diana, las MP pueden fusionarse con la membrana plasmática celular o ser endocitadas. Sólo en el caso de que las MP se fusionaran con las células diana, se produciría una transferencia de los receptores de membrana por lo que la célula receptora adquiriría nuevas propiedades antigénicas y funcionales al adquirir los componentes de la membrana citoplásmica de las MP. Cuando las MP son endocitadas, éstas

Introducción

pueden fusionarse con la membrana endocítica, y liberar su contenido al citoplasma, o ser dirigidas a los lisosomas para su degradación (Raposo and Stoorvogel, 2013).

Un incremento en los niveles de MP circulantes ha sido correlacionado con la severidad de algunas patologías cardiovasculares como el IAM, diabetes, aterotrombosis, hipertensión y síndrome metabólico (Boulangier et al., 2001; 2006; Chironi et al., 2009). También se ha propuesto que estas MP circulantes inducen disfunción endotelial a través de una disminución de la actividad eNOS y/o reduciendo la biodisponibilidad del NO (Boulangier et al., 2001), incrementando la nitrosilación proteica de las CE y aumentando los marcadores plasmáticos de estrés oxidativo (Agouni et al., 2008). Todo ello demuestra el efecto deletéreo que las MP circulantes pueden tener en el sistema cardiovascular, especialmente sobre las CE.

Debido a la relación de las MP con diferentes enfermedades cardiovasculares existe gran interés en evaluar los cambios en los niveles de MP circulantes en respuesta a un tratamiento farmacológico. Por ejemplo, una reducción en los niveles totales de una población específica de MP podría indicar la eficacia de un tratamiento o la regresión de una patología por lo que la formación de las MP y su interacción con otros tipos celulares sobre los que inducen los efectos deletéreos se han propuesto como posibles dianas terapéuticas.

Sin embargo, un incremento en el número de MP circulantes no siempre induce efectos deletéreos. En pacientes con sepsis se ha observado una correlación positiva entre elevados niveles de MP circulantes y la supervivencia, atribuyéndoles un efecto protector (Soriano et al., 2005). Además, las MP aisladas de estos pacientes son capaces de revertir la hipotensión en vasos aislados tratados con lipopolisacáridos mediante un aumento de la producción de tromboxano A₂, un potente vasoconstrictor (Martínez et al., 2011).

Por otra parte, se ha observado en humanos cómo MP derivadas de células madre progenitoras CD34⁺ y de CPE son capaces de aumentar la capacidad angiogénica de CE. *In vitro*, las MP indujeron también la proliferación, migración y resistencia a la apoptosis. Al analizar la composición de las MP se observó que éstas contenían los miRNA proangiogénicos miR126 y miR296. También se observó la presencia de mRNAs de factores implicados en la proliferación, diferenciación y angiogénesis. Además, estas MP eran capaces de inducir las rutas de señalización de la PI3K/Akt y la actividad eNOS (Cantaluppi et al., 2012).

También se ha demostrado como MP que contenían el receptor activador de proliferación de los peroxisomas alfa (PPAR α), receptor nuclear que actúa como factor de transcripción, era capaz de inducir la diferenciación de CPE y la capacidad angiogénica de CE a través de la activación de la ruta de señalización PPAR α /Akt/NF- κ B (Benameur et al., 2010b). Asimismo, MP

específicamente diseñadas para que contengan el morfogen Sonic Hedgehog (Shh) (MP^{Shh+}) son capaces de inducir efectos beneficiosos sobre el sistema cardiovascular (Agouni et al., 2007; Benameur et al., 2010a; Soleti and Martínez, 2009; Soleti et al., 2009) (Figura 12).

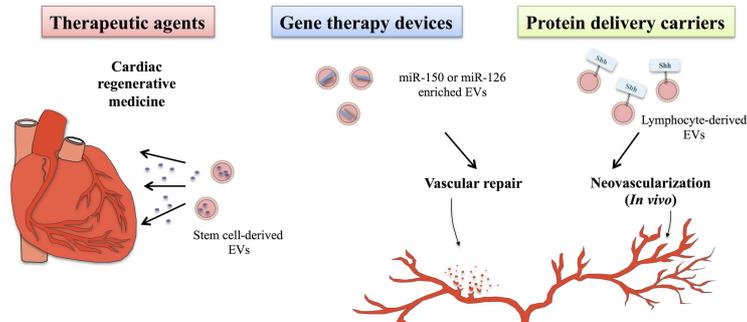


Figura 12. Uso de las vesículas extracelulares como agentes terapéuticos. Las vesículas extracelulares (EV) pueden transportar diferentes elementos biológicos y ser utilizadas como agentes terapéuticos. Imagen tomada de Fleury et al., 2014.

1.4.2 Ruta de señalización Sonic Hedgehog

Descubierta por primera vez en *Drosophila*, la ruta de señalización Hedgehog controla un amplio rango de procesos durante el desarrollo embrionario entre los que encontramos el crecimiento y morfogénesis de vertebrados e insectos (Ingham and McMahon, 2001). En el adulto, la ruta de señalización Hedgehog tiene un papel importante en el mantenimiento de diferentes estructuras, posiblemente, mediante la regulación funcional de las diferentes células madre o progenitoras (Robbins et al., 2012). En algunos contextos, las proteínas Hedgehog actúan como morfógenos mientras que en otras ocasiones actúan como

mitógenos o regulando procesos de proliferación, diferenciación y supervivencia celular (Fleury et al., 2014).

En mamíferos, la familia de proteínas Hedgehog comprende a Shh, Indian Hedgehog y Dessert Hedgehog, siendo Shh la más expresada y la más estudiada (Riobo and Manning, 2007). Shh es transcrito como una proteína de 45 KDa que es procesada en el retículo endoplásmico hasta su forma biológicamente activa (Figura 13). En primer lugar se produce una escisión de su extremo N-terminal; a continuación un palmitoilación en el extremo N-terminal y seguidamente una colesterilación por autoescisión para dar lugar a un éster de colesterilo (Heal et al., 2011). Estas modificaciones lipídicas están implicadas en la multimerización de N-Shh, el establecimiento de gradientes morfogénicos y la potencia con la que actúa en la célula diana (Riobo and Manning, 2007).

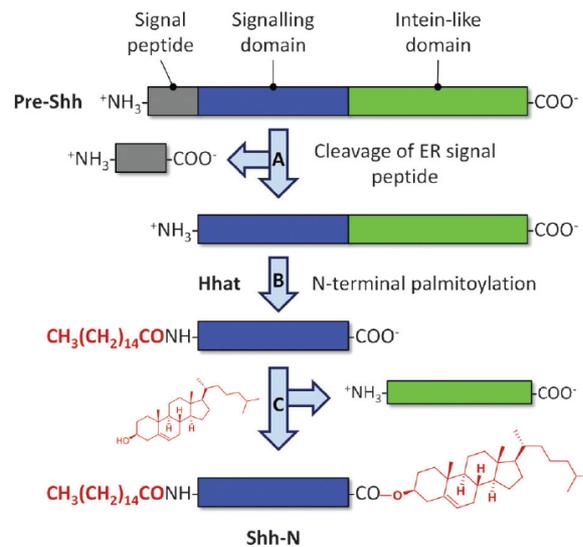


Figura 13. Procesado post-traduccional del precursor Sonic Hedgehog. Imagen tomada de Heal et al., 2011.

Introducción

Patched 1 (PTCH1 o PTC) actúa como principal receptor de Shh con una afinidad en el rango de nanomolar. Además de unir Shh para iniciar la cascada de señalización Hedgehog, PTCH1 también es responsable de modular los gradientes extracelulares de Shh durante el desarrollo. Aunque en mamíferos existen dos genes que codifican para las proteínas PATCH1 y PATCH2, que están regulados por los factores de transcripción GLI (Robbins et al., 2012), la mayor parte de las acciones se ejercen a través de PTCH1. En ausencia de ligando, PTCH1 inhibe a la proteína receptora de 7 dominios transmembrana Smoothed (SMO). La inhibición de SMO por parte de PTCH1 parece ser de naturaleza catalítica pues una sola molécula de PTCH1 puede inactivar aproximadamente 250 moléculas de SMO aunque existen otros tres modelos diferentes para explicar la naturaleza de la interacción entre PTCH1 y SMO (Riobo and Manning, 2007; Soleti and Martínez, 2012; Taipale et al., 2002). Este efecto podría estar mediado por la modulación en la localización y/o concentración de pequeñas moléculas. Se han propuesto algunos metabolitos endógenos, derivados oxisteroles y derivados de la vitamina D3 como mediadores de los efectos de PTCH1 sobre SMO.

La activación de Smo conlleva la activación y la translocación nuclear de las proteínas GLI. En vertebrados existen 3 proteínas GLI, GLI1, GLI2 y GLI3. Éstas actúan como factores de transcripción regulando la expresión de genes diana de Shh. GLI1 y GLI2 son responsables de la mayor parte de las funciones de activación de la

ruta Hedgehog, con propiedades similares a nivel de proteína. La expresión de GLI1 es inducida por Shh y su función parece ser la de reforzar y prolongar las respuestas celulares a Shh. En cambio, GLI3 funciona principalmente como represor de la señalización de Hedgehog. En ausencia de Shh, las proteínas GLI son retenidas en el citoplasma por las proteínas KIF/27 y SUFU para limitar su actividad transcripcional. Además la proteína GLI3 es fosforilada y procesada proteolíticamente a una forma represora (Figura 14; izquierda). La adición de Shh lleva a la inhibición del procesado de GLI3 y la acumulación del resto de formas de GLI, llevando a la activación de genes dianas de Shh (Figura 14; derecha) (Katoh and Katoh, 2005; Soleti and Martínez, 2009). De esta manera, a la ruta que supone la unión de Shh a su receptor PTCH1 y la correspondiente abolición de la inhibición que éste ejerce sobre SMO para dar lugar a la activación de la expresión de genes regulados por la acción de los factores de transcripción GLI se la conoce como ruta canónica (Figura 14).

Introducción

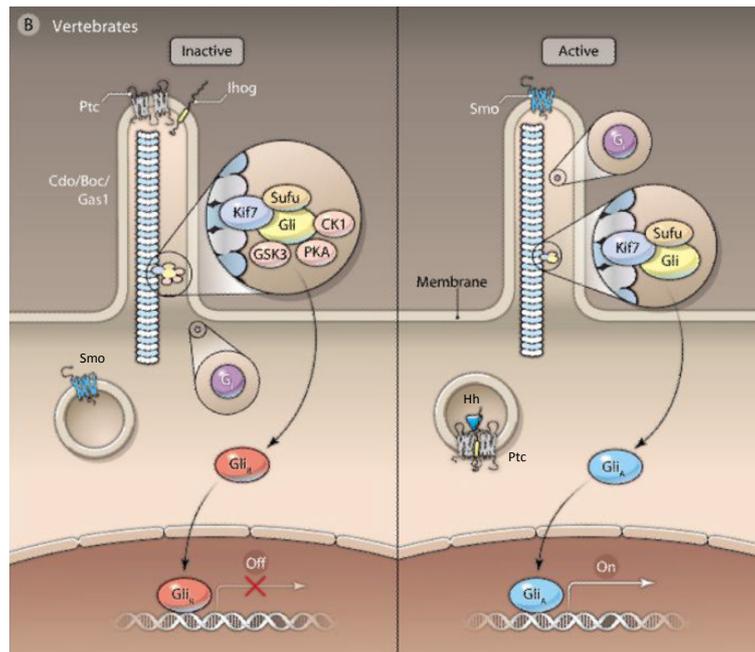


Figura 14. Ruta de señalización Hedgehog canónica. (Izquierda) en ausencia del ligando Shh y (derecha) en presencia del ligando Shh. Patched 1 (PTC). Tomado de Robbins et al., 2012.

Sin embargo, existen numerosos trabajos que apoyan la existencia de rutas de señalización Shh no canónicas. Se han propuesto dos rutas no canónicas, la de tipo I (Figura 15A), dependiente de PTCH1 e independiente de SMO y de los factores de transcripción GLI y la de tipo II (Figura 15B), dependiente de PTCH1 y SMO, pero independiente de GLI (Brennan et al., 2012; Jenkins, 2009).

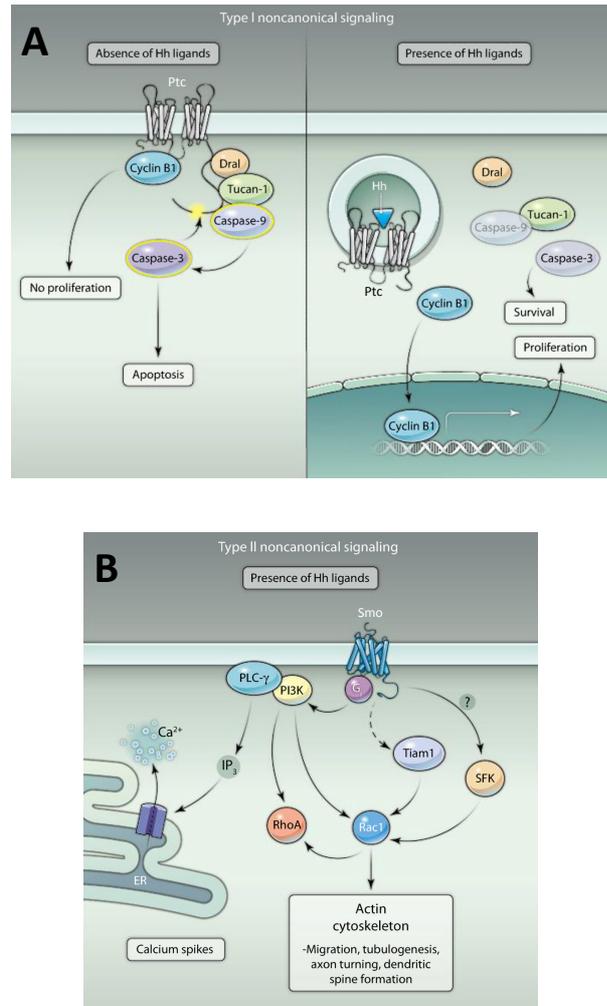


Figura 15. Rutas de señalización Hedgehog no canónicas. (A) de tipo I, medida exclusivamente por el receptor PCTH1 y **(B)** de tipo II, mediada por SMO pero independiente de GLI. Imágenes tomadas de Robbins et al., 2012.

La ruta de señalización Hedgehog es crucial para la correcta formación de numerosas estructuras en el embrión en desarrollo (Ingham and McMahon, 2001), está implicado en el desarrollo de tejidos vasculares embrionarios y en el mantenimiento de la

Introducción

vasculatura coronaria en el adulto a través de las células perivasculares. Además, la ruta de señalización de Hedgehog está presente en el tejido vascular adulto. La activación de esta ruta en el modelo murino mediante Shh recombinante o transferencia génica desencadena respuestas celulares en diferentes tipos de células vasculares como las CE, CPE, células del músculo liso y fibroblastos que promueve la angiogénesis y protege de las lesiones producidas por procesos isquémicos. El efecto de Shh sobre la regeneración vascular se debería a la producción de una combinación de potentes factores angiogénicos (VEFG, angiopoyetina-1 y angiopoyetina-2) por parte de las células del estroma (Pola et al., 2001).

Inicialmente, y a pesar de que las CE expresan el receptor PTCH1, no se observó una acción directa de Shh en la capacidad migratoria, proliferativa y de supervivencia en CE. Sin embargo, recientemente se ha observado que Shh desencadena respuestas proangiogénicas en HUVEC a través de la activación de rutas no canónicas (Chinchilla et al., 2010). Específicamente, Shh activa a RHOA y estimula la formación de estructuras tubulares en un mecanismo dependiente de SMO y proteínas Gi pero de forma independiente de GLI (Figura 15B). Además, Shh reduce la activación de las caspasas y promueve la supervivencia de CE humanas a través de la inhibición de la actividad proapoptótica de PTCH1 en una modulación independiente de SMO (Chinchilla et al., 2010) (Figura 15A). De la misma manera Shh induce la migración de

CE y la morfogénesis de capilares mediante la activación de la ruta RHOA/ROCK (Soleti and Martínez, 2012). En CE humanas, Shh también induce la actividad PI3K que finalmente se traduce en un incremento de la capacidad morfogénica capilar. Sin embargo, la cascada de señalización iniciada por PI3K no parece estar implicada en la translocación al núcleo del factor de transcripción GLI1 (Kanda et al., 2003) (Figura 15 y 16).

En CPE de ratones, Shh induce la capacidad proliferativa, adhesiva, migratoria y vasculogénica. Además es capaz de incrementar la expresión del factor derivado de células del estroma 1, lo que explica un aumento en el reclutamiento de células madres y/o progenitoras (Asai et al., 2006). El Shh promueve un fenotipo vasculogénico aumentando la capacidad proliferativa y migratoria y la producción de VEGF, a través de mecanismos dependientes de la activación de la ruta PI3K/AKT y de forma no completamente dependiente de VEGF (Fu et al., 2006).

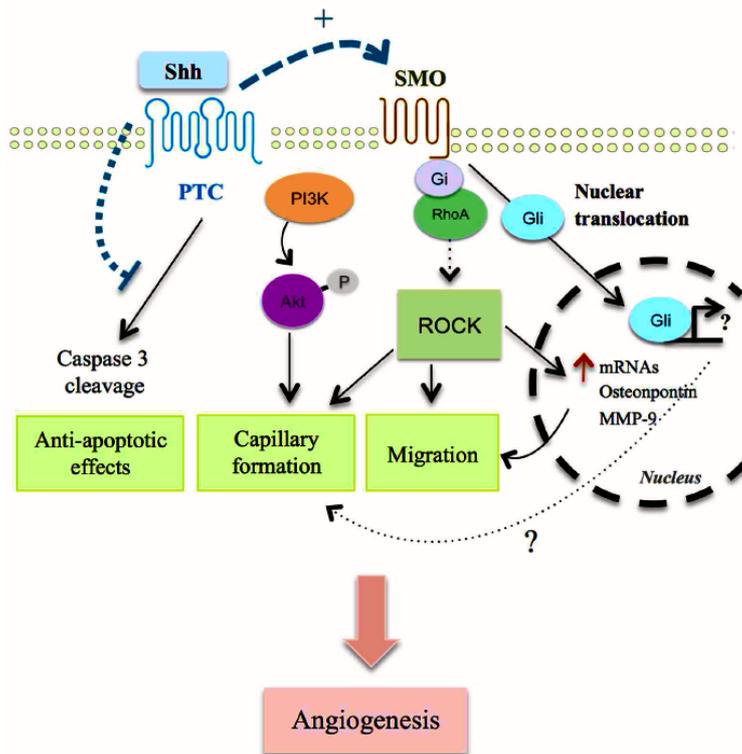


Figura 16. Efectos de Sonic Hedgehog en células endoteliales. El Shh, en CE, induce un incremento en la supervivencia y en la capacidad migratoria y vasculogénica a través de la ruta de señalización no canónica. Imagen tomada de Fleury et al., 2014.

1.4.3 Micropartículas Sonic Hedgehog

Las MP^{Shh+} se producen a partir de una línea de linfocitos T incubados en condiciones mitógenas y presentan un elevado contenido en el morfogen Shh (MP^{Shh+}) (Martínez et al., 2006). Como control se utilizan MP que no albergan al morfogen Shh (MP^{Shh-}).

Estas MP han sido previamente caracterizadas. En la caracterización proteica de estos dos tipos de MP se detectaron un total de 390 proteínas, un 34% de las cuales eran proteínas de membrana. La composición de las proteínas de membrana entre los dos tipos de MP resultó ser similar. También se detectó una pequeña cantidad de proteínas nucleares, menos de un 10% del total, entre las se encontraban las histonas, únicamente presentes en las MP^{Shh-}. De las 390 proteínas, la mitad eran proteínas citoplasmáticas pertenecientes a proteínas del citoesqueleto, proteínas de choque térmico, enzimas metabólicos y proteínas implicadas en procesos de transcripción. En este estudio también se identificaron numerosas proteínas de adhesión, transporte y de transducción de señal (Miguet et al., 2006). Únicamente en la superficie de las MP producidas en condiciones mitógenas se detectó la exposición del morfogen Shh (Martínez et al., 2006).

Se han testado los efectos de las MP^{Shh+} en diferentes modelos de estudio experimental, tanto *in vivo* como *in vitro*. De esta forma se observó que la inyección de MP^{Shh+} a ratones, por un período de tan solo 24 horas, era capaz de inducir la producción de NO en CE y en diferentes tejidos de forma dependiente de la ruta de señalización Shh, a través de la activación de las quinasas PI3K y ERK (Fleury et al., 2014). De la misma manera, las MP^{Shh+} eran capaces de aumentar la relajación dependiente del endotelio en anillos aórticos de ratones normales y de reducir la disfunción

endotelial en arterias coronarias sujetas a isquemia/reperfusión (Agouni et al., 2007; Soleti and Martínez, 2012) (Figura 17).

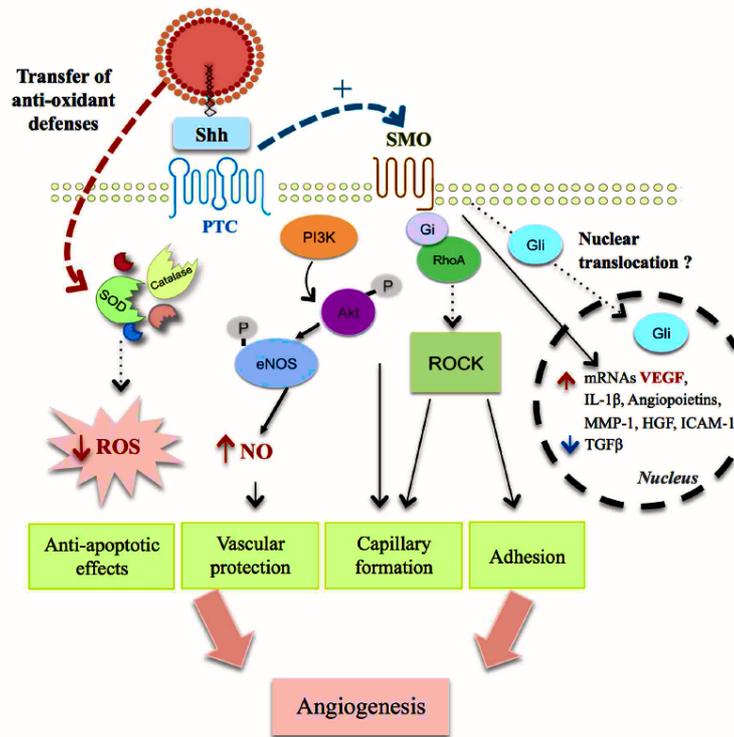


Figura 17. Efectos de las micropartículas que contienen Sonic Hedgehog en células endoteliales. Las MP^{Shh+} son capaces de generar efectos antiapoptóticos, proteger la vasculatura, formar capilares e incrementar la capacidad adhesiva de CE. Imagen tomada de Fleury et al., 2014.

En estudios in vitro, las MP^{Shh+} fueron capaces de inducir angiogénesis en células endoteliales de vena de cordón umbilical humano (HUVEC) a través de un mecanismo dependiente de SMO. Las MP^{Shh+} incrementaron los niveles de mRNA de varios factores proangiogénicos como el VEGF, angiopoietinas, el factor de

crecimiento hepático, la interleuquina 1 β , la metaloproteinasa 1 y redujeron la expresión de factores antiangiogénicos como el factor de crecimiento transformante β . Estos resultados sugieren que el efecto de las MP^{Shh+} se produce sobre numerosas dianas génicas que regulan el proceso angiogénico en diferentes fases. Asimismo, las MP^{Shh+} aumentan la capacidad de adhesión e inducen la formación de fibras de estrés en CE de manera dependiente de SMO y de RHO quinasa (Soleti and Martínez, 2012; Soleti et al., 2009) (Figura 17), probablemente mediados a través de la activación de las rutas de señalización Shh no canónicas (Chinchilla et al., 2010).

En el modelo de isquemia murino, la administración de MP^{Shh+} durante 21 días era capaz de aumentar la densidad vascular en las extremidades isquémicas y la producción endógena de Shh en el músculo esquelético a través de un mecanismo dependiente de SMO. Junto a estos efectos se observó un aumento de la activación de la eNOS tanto en aortas como en el músculo esquelético, así como un aumento de la expresión de algunos factores de crecimiento pro-angiogénicos (Benameur et al., 2010a; Fleury et al., 2014).

Finalmente, se ha observado como las MP^{Shh+} son capaces de proteger a las CE del proceso apoptótico inducido por la actinomicina D mediante una disminución del contenido de DNA hipodiploide, una disminución en la activación de las caspasa-3 y

Introducción

un incremento de la expresión del ratio BCL2/BAX. Además se observó como las MP^{Shh+} transportan enzimas antioxidantes que son capaces de regular la expresión del enzima antioxidante manganeso superóxido dismutasa (Soleti et al., 2012) . En este mismo estudio se observó como las MP^{Shh+} son internalizadas por HUVEC una hora después de haber iniciado el tratamiento. En otro estudio más reciente, además del efecto de Shh sobre la capacidad vasculogénica y la función endotelial en CE, se ha demostrado un efecto cardioprotector ejercido directamente sobre los cardiomiocitos (Paulis et al., 2015).

2 Hipótesis

Nuestra hipótesis se basa en que en pacientes con IAM, los niveles de CEC y CPE circulantes varían a lo largo de seis meses de evolución clínica, coincidiendo con las fases de daño vascular y regeneración endotelial, respectivamente. Además, las CPE aisladas de sangre periférica y mantenidas en cultivo reproducirían las características fenotípicas y funcionales de células endoteliales maduras y, durante la evolución clínica del paciente, modificarían su capacidad funcional para favorecer el establecimiento de un endotelio regenerado. Finalmente, el tratamiento de CPE aisladas de sangre periférica y mantenidas en cultivo con MP^{Shh+} mejorarían la función regenerativa de las CPE.

3 Objetivos

1. El recuento de CEC y CPE circulantes en sangre periférica en individuos sanos y en pacientes con IAM a distintos tiempos durante 6 meses de evolución clínica.
2. El establecimiento de un protocolo óptimo de aislamiento de CPE de sangre periférica que permita la obtención y expansión de cultivos de CPE con características fenotípicas y funcionales similares a las de células endoteliales maduras (HUVEC).
3. El estudio comparativo de las características funcionales de las CPE en cultivo aisladas de individuos sanos y de pacientes con IAM a distintos tiempos, en términos de adhesión, proliferación, crecimiento y vasculogénesis.

Objetivos

4. El estudio del efecto de las MP^{Shh+} en la capacidad vasculogénica de las CPE aisladas de sangre periférica humana in vitro (en células en cultivo) e in vivo (en un modelo de ratón inmunodeficiente) y la implicación de la ruta de señalización Hedgehog.

5. El análisis de la interacción de la ruta de señalización Hedgehog con la producción de NO y la reorganización del citoesqueleto de actina en CPE en cultivo aisladas de sangre periférica tratadas con MP^{Shh+}.

4 Material y métodos

Este estudio fue aprobado por el comité ético de la Fundación para la Investigación del Hospital Clínico Universitario de Valencia (FIHCUV) y cumple con los principios éticos contemplados en la Declaración de Helsinki. Todos los sujetos firmaron el consentimiento informado antes de ser incluidos en este estudio. Parte de los resultados presentados en esta tesis forman parte del proyecto titulado “Células endoteliales circulantes y células progenitoras endoteliales en la enfermedad cardiovascular aguda. Correlación con la función endotelial y la evolución clínica”.

4.1 Población de estudio

Durante el período comprendido entre febrero de 2009 hasta julio del 2012 se incluyeron en el estudio pacientes con IAM y sujetos sanos por el Servicio de Cardiología del Hospital Clínico Universitario de Valencia.

Material y métodos

Se reclutaron 50 pacientes de edad igual o inferior a 75 años con un primer episodio de cardiopatía isquémica, que ingresaron por síndrome coronario agudo y troponinas positivas. Para ser incluidos en este estudio, los pacientes debían presentar 1 o más factores de riesgo cardiovascular. Además, podían ser incluidos pacientes con historia previa de accidente vascular cerebral que no tomaran estatinas. Tras el cateterismo, sólo se incluyeron aquellos pacientes con enfermedad significativa (estenosis >50%) de al menos una arteria coronaria.

Como criterios de exclusión se establecieron: pacientes con síndrome coronario agudo previo, los pacientes pretratados con estatinas y los que tuvieran un ingreso previo por insuficiencia cardíaca. También se excluyeron de este estudio pacientes que no pudieran ser sometidos a resonancia magnética cardíaca (claustrofobia, portadores de marcapasos o desfibriladores).

En pacientes con IAM, se tomaron muestras de sangre a tres tiempos diferentes a lo largo de su evolución clínica. La primera muestra de sangre se obtuvo durante las primeras 24 horas tras ser diagnosticados con IAM. La segunda muestra se obtuvo 30 días después del infarto. La tercera muestra se obtuvo 6 meses después del infarto.

También se reclutaron un total de 50 sujetos sanos (controles) sin cardiopatía isquémica ni antecedentes cardiovasculares, emparejados

en sexo y edad (± 3 años) con los pacientes con IAM. En este grupo de individuos se realizó una única toma de sangre.

Las muestras de sangre extraídas en este trabajo se destinaron para diferentes fines. En primer lugar, los primeros 6 mL se descartaron para evitar una contaminación de las muestras de sangre con CE desprendidas durante el proceso de venopunción y se destinaron para la determinación de diferentes parámetros bioquímicos. El resto de sangre extraída se destinó, por una parte, a la determinación del número de CPE circulantes y CEC; por otra, a la obtención de cultivos de CPE.

4.2 Cultivos celulares

El presente trabajo se realizó empleando dos tipos de cultivos de CE de origen humano.

4.2.1 Células endoteliales de vena de cordón umbilical humano

Los cordones umbilicales de recién nacidos se obtuvieron del Servicio de Obstetricia y Ginecología del Hospital Clínico Universitario de Valencia con el consentimiento informado de las donantes.

El aislamiento y posterior cultivo de las HUVEC, se realizó tal y como se describe en (Monsalve et al., 2007) con algunas modificaciones. Tras el parto, los cordones umbilicales se mantuvieron en una solución de tampón fosfato (PBS) (Sigma-Aldrich, Tres Cantos, España) a 4°C hasta su posterior procesado. Inicialmente, los cordones se lavaron externamente con PBS para eliminar posibles restos de sangre. A continuación la vena se canuló y se lavó internamente con una solución de PBS para eliminar completamente restos de sangre de su interior. Tras el lavado, se introdujo una solución de colagenasa (0,1 mg/mL) (Life Technologies, Alcobendas, España) y se incubó durante 15 min a 37°C. Las CE desprendidas tras el tratamiento enzimático se recuperaron con un lavado adicional con medio M199 (Life Technologies) enriquecido con suero bovino fetal (SBF) (Life Technologies) al 20% en un tubo cónico. La solución que contenía las CE se centrifugó 700 g durante 5 min y el pellet se resuspendió

en medio endotelial específico EBM-2 (Lonza, Verviers, Bélgica) enriquecido con factores de crecimiento EGM-2 (Lonza). Las células se sembraron en frascos de cultivo de 25 cm². La morfología adoquinada se determinó mediante microscopía óptica y el fenotipo endotelial mediante la expresión del factor von Willebrand (Abcam, Cambridge, Reino Unido). Para la realización de los experimentos de funcionalismo celular se utilizaron cultivos de HUVEC del 4º al 6º pase.

4.2.2 Células progenitoras endoteliales

Durante el proceso de aislamiento y cultivo de las CPE se identificaron diferentes puntos críticos que se describen a continuación así como las diferentes condiciones testadas para cada uno de ellos. La puesta a punto del protocolo específico utilizado para el aislamiento y cultivo de las CPE se presenta en la sección de Resultados.

4.2.2.1 Obtención de las muestras de sangre

Las muestras de sangre periférica de sujetos sanos y de pacientes con IAM se obtuvieron por venopunción, en tubos tratados con distintos anticoagulantes. Para la determinación de las condiciones óptimas para el cultivo de CPE se testaron diferentes volúmenes de sangre y diferentes tiempos para el procesamiento de las muestras de sangre.

4.2.2.1.1 Anticoagulantes

En la determinación del mejor anticoagulante para la extracción de las muestras de sangre se estudiaron tres anticoagulantes diferentes, la heparina, el citrato de sodio y el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), todos ellos de Becton Dickinson.

4.2.2.1.2 Volumen de las muestras de sangre

La concentración de CPE en muestras de sangre periférica es muy baja y el volumen de sangre procesada para su aislamiento es, por tanto, un factor limitante. Por este motivo se utilizaron volúmenes de sangre de 10, 20 y 30 mL para determinar el mínimo volumen de sangre que permitiera obtener cultivos de CPE con un alto rendimiento.

Tras la extracción, las muestras de sangre se centrifugaron en gradiente de densidad (Lymphoprep, Axis-shield, Oslo, Noruega) a razón de volúmenes 2:1 (sangre: Lymphoprep), a 800 g durante 30 min a temperatura ambiente. Las CMN fueron recuperadas y lavadas dos veces con 6% SBF en PBS (Figura 18).

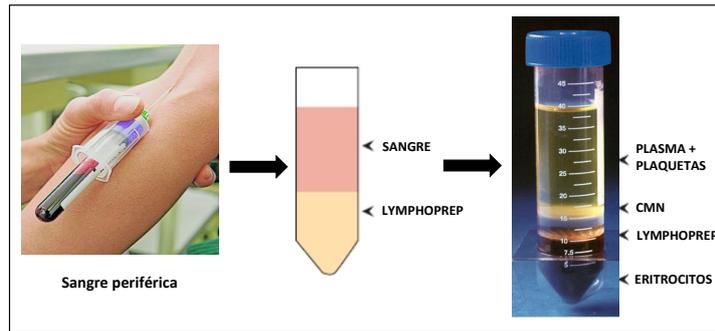


Figura 18. Esquema representativo de trabajo desde la obtención de las muestras de sangre hasta su procesado para la obtención de las células mononucleadas.

4.2.2.1.3 Tiempo transcurrido desde la obtención de las muestras de sangre hasta su procesado

Para determinar si con el transcurso del tiempo desde la obtención de las muestras la viabilidad celular podía disminuir se testaron dos tiempos de procesado, a las 2 horas y a las 24 horas después de la extracción.

4.2.2.2 Condiciones de cultivo testadas

Parte de los puntos críticos identificados en el proceso de aislamiento y cultivo de CPE se hallaron en las condiciones específicas utilizadas durante en el cultivo celular. De esta manera, testamos las siguientes condiciones de cultivo:

4.2.2.2.1 Matriz extracelular

Todos los protocolos utilizados en el cultivo de CPE hacen uso de diferentes matrices celulares. De ellas depende la capacidad de seleccionar específicamente a las CPE que finalmente van a diferenciarse a CE con un fenotipo maduro. Tras una extensa revisión bibliográfica decidimos testar dos de las matrices más utilizadas: fibronectina y gelatina.

4.2.2.2.2 Medio de cultivo

El medio de cultivo utilizado para el cultivo de CPE era el medio basal endotelial (EBM-2) enriquecido con los factores de crecimiento presentes en los single quots EGM-2. Sin embargo, no había un consenso claro en cuanto al enriquecimiento de este medio con SBF. En el presente trabajo se testaron dos concentraciones diferentes de SBF. Así se prepararon dos medios de cultivo EGM-2 diferentes, uno enriquecido con SBF al 2% y otro al 20%.

4.3 Caracterización de los cultivos de células progenitoras endoteliales

Los cultivos de CPE obtenidos se sometieron a diferentes estudios que a continuación se detallan con la finalidad de determinar su fenotipo. Para ello se hizo uso de diferentes técnicas como la citometría de flujo y la microscopía de fluorescencia.

4.3.1 Caracterización de los cultivos de células progenitoras endoteliales por citometría de flujo

Las CPE en cultivo se recogieron tras un tratamiento de tripsina (Life Technologies) al 0,05% durante 5 min, se lavaron y se resuspendieron en PBS a razón de 10^6 células/mL. A continuación, 10^5 células se incubaron durante 15 min con los siguientes anticuerpos individualmente (Tabla 2) o con su correspondiente control isotópico siguiendo las instrucciones del fabricante.

Anticuerpo	Fluorocromo	Fabricante
KDR	PE	R&D Systems
CD31	FITC	Becton Dickinson
CD34	FITC	Becton Dickinson
CD45	PerCP	Becton Dickinson

Tabla 2. Anticuerpos utilizados para la caracterización de los cultivos de CPE por citometría de flujo. PE (Ficoeritrina); FITC (isotiocianato de fluoresceína); PerCP (proteína clorofila peridinina).

Material y métodos

Tras el periodo de incubación se analizó la expresión de los marcadores en un total de 20000 células. Las muestras fueron analizadas por el Servicio de Citometría de la Unidad Central de Investigación de Medicina (UCIM) de la Universidad de Valencia con el citómetro FACSVerse (Becton Dickinson, Madrid, España) y el software BD FACSuite (Becton Dickinson). Los resultados se mostraron como histogramas con número de células en el eje de las ordenadas e intensidad de fluorescencia en las abscisas (Figura 19).

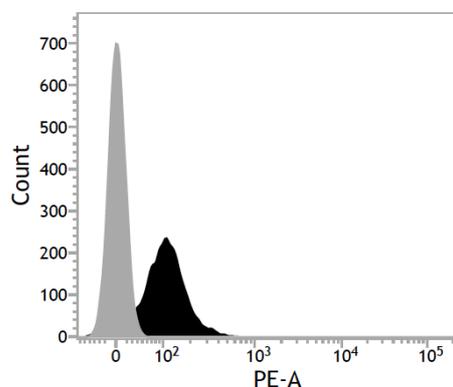


Figura 19. Caracterización fenotípica de los cultivos de CPE por citometría de flujo. Histograma representativo de los resultados obtenidos por citometría de flujo. En gris, células marcadas con los controles isotípicos; en negro, las células incubadas con anticuerpo.

4.3.2 Caracterización de los cultivos de células progenitoras endoteliales por microscopía de fluorescencia

Para determinar el fenotipo endotelial de las CPE aisladas, por microscopía de fluorescencia se analizó la capacidad de éstas para captar LDL acetilada (acLDL) y la capacidad de la aglutinina de *Ulex europaeus* de unirse a glicocompuestos, que contienen α -L-fucosa, presentes en las CE (Holthofer et al., 1982; Voyta et al., 1984).

Para ello, las CPE en cultivo se incubaron con 2µg/mL de acLDL unida al fluorocromo Dil (Dil acLDL) (Life Technologies) durante una hora a 37°C. Gracias al fluorocromo el proceso de fagocitosis de la Dil acLDL por parte de las CE puede ser apreciado fácilmente, observándose pequeñas vesículas en el interior celular que emiten una fluorescencia dentro de la región del rojo del espectro visible. Tras esta incubación, las células fueron lavadas dos veces con PBS y fijadas a temperatura ambiente durante 15 min con una solución de paraformaldehído al 4% en PBS.

Una vez fijadas, se incubaron con 10 µg/mL de aglutinina de *Ulex europaeus* marcada con FITC (Sigma-Aldrich) durante una hora a temperatura ambiente. El FITC emite fluorescencia en la región del verde del espectro visible. Los núcleos celulares se marcaron con 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI) (Sigma-Aldrich). Este compuesto emite fluorescencia en la región del azul del espectro visible.

Las muestras teñidas se observaron al microscopio confocal Leica SP2 (Leica, Barcelona, España) del Servicio de Microscopía de la UCIM de la Universidad de Valencia. Las imágenes se obtuvieron con un objetivo de 40X y una magnificación total 1200X.

Mediante microscopía de fluorescencia se determinó la expresión del vWF en cultivos de CPE obtenidos. Para ello, las CPE se fijaron con una solución de paraformaldehído al 4% en PBS durante 15 min a temperatura ambiente. Después del proceso de

Material y métodos

fijación las células fueron permeabilizadas con Triton X-100 al 0,25% en PBS durante 30 min. A continuación, y siguiendo las instrucciones del fabricante, las células fueron incubadas con el anticuerpo primario policlonal anti-vWF (Abcam, Cambridge, Reino Unido); después con el anticuerpo secundario conjugado con el fluorocromo Dylight 488 (Abcam), que emite fluorescencia en la región del verde del espectro visible. Los núcleos celulares se marcaron con DAPI. Las imágenes se obtuvieron en el microscopio de fluorescencia invertido Nikon Eclipse Ti (Nikon, Valencia, España) con el objetivo 10X (magnificación total 100X) y con la cámara digital Nikon Ds-QiMic (Nikon).

4.4 Determinación de la función celular

En el presente trabajo, la función de las CE se analizó mediante la determinación de las capacidades de crecimiento, de proliferación, de adhesión, de vasculogénesis (*in vivo* e *in vitro*) y de producción de NO. A continuación se detallan los protocolos utilizados para la determinación de cada una de estas capacidades celulares.

4.4.1 Adhesión celular

Los experimentos de adhesión se realizaron en placas con cuadrícula de 4 mm² (Nunc, Madrid, España) pretratadas con fibronectina (2,5 µg/cm²). Inicialmente se sembraron 5·10⁴ células por placa y se incubaron a 37°C y 5% de CO₂ durante 30 min. Tras el período de incubación se eliminaron aquellas células no adheridas mediante dos lavados con PBS y se contaron 6 cuadrículas elegidas al azar por dos investigadores independientes. Los resultados se muestran como porcentaje de células adheridas en relación al número total de células sembradas.

4.4.2 Proliferación celular

La proliferación celular se midió por citometría de flujo mediante el uso de yoduro de propidio (IP). El IP se intercala entre el DNA y permite determinar el contenido de DNA celular y la distribución de una población celular en las diferentes fases del ciclo celular. Asimismo y en función de la intensidad de fluorescencia del IP, se pueden distinguir células en fase **G₀/G₁** que contienen una sola

Material y métodos

copia de todo el DNA celular, células en interfase o fase de síntesis (**S**) de DNA y células en mitosis (**M**) con dos copias del DNA celular (Figura 20).

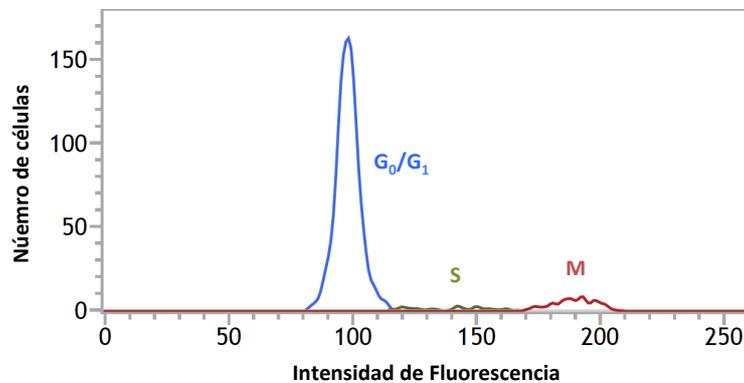


Figura 20. Histograma representativo de los resultados obtenidos por citometría de flujo para el análisis del ciclo celular. En azul, células en fase G_0/G_1 ; en verde, células en interfase (S) y en rojo, células en mitosis (M).

En primer lugar los cultivos se sincronizaron manteniéndolos en medio de ayuno, medio 199 sin SBF, durante 48 horas. A continuación los cultivos se estimularon durante 18 horas con medio de cultivo endotelial EGM-2. Finalizado este tiempo las células se recuperaron con una solución de tripsina al 0,05%, se fijaron con etanol al 70% y se tiñeron con el kit comercial PI-RNase (Immunostep) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Una vez teñidas, el ciclo celular se examinó por citometría de flujo con el citómetro FC500 (Beckman Coulter, Madrid, España) y los resultados fueron analizados con el software Infinicyt (Cytognos S.A., Salamanca, España). Los resultados se presentaron como

porcentaje de células en proliferación (células en interfase y mitosis) respecto del total de células analizadas.

4.4.3 Curva de crecimiento

Inicialmente se sembraron 6 pocillos con $1,5 \cdot 10^4$ células/pocillo para cada uno de los cultivos en medio endotelial específico EGM-2. 24 horas después se realizó el recuento de células en uno de los pocillos y se cambió el medio de cultivo en los restantes. El proceso se repitió durante 6 días seguidos.

Para el recuento celular, las células se recogieron mediante el tratamiento con tripsina al 0,05% y se resuspendieron en 100 μ L de Azul Tripán. Las células se contaron en la cámara de Neubauer modificada y los resultados se expresaron como número de células totales por pocillo.

A partir de los resultados obtenidos se calcularon la fase de latencia, en la que no existe crecimiento celular y las células se adaptan a las nuevas condiciones de cultivo, la fase de crecimiento exponencial y la fase estacionaria, en la que no existe un crecimiento neto de la población celular por que las células han alcanzado confluencia.

4.4.4 Capacidad vasculogénica *in vitro*

La capacidad vasculogénica celular se determinó mediante el ensayo in vitro de Matrigel® (Becton Dickinson) tal y como se

Material y métodos

describió en 2005 (Mezentsev et al., 2005). En primer lugar se prepararon las placas de cultivo para recubrirlas con una matriz de Matrigel. Para ello, el Matrigel se diluyó a razón 1:1 con medio de cultivo EGM-2 completo libre de SBF. Se añadieron 200 μL de esta preparación por cada pocillo en placas de 24 pocillos y se dejó solidificar a 37°C durante 30 min. A continuación se sembraron $1.5 \cdot 10^5$ células por pocillo y se incubaron durante 24 horas. En el caso de que este experimento se realizara con la adición de algún tratamiento, éste se añadió una hora después de la siembra y se incubó durante 24 horas. Se adquirieron un total de 5 campos aleatorios por pocillo con el microscopio de fluorescencia invertido Nikon Eclipse Ti con el objetivo 4X (magnificación total 40X) y con la cámara digital Nikon Ds-QiMic (Nikon). Las estructuras tubulares formadas sobre el Matrigel se analizaron con el programa Image Pro-Plus V.6 (Media Cybernetics, Rockville, USA). Los resultados se muestran como longitud total (μm) de las estructuras tubulares por imagen.

4.4.5 Capacidad vasculogénica *in vivo*

Para determinar la capacidad vasculogénica de las CPE *in vivo* realizamos el ensayo de implantes de Matrigel o *Matrigel plug assay*. Por una parte, las CPE se sembraron en frascos de 25 cm^2 hasta que se obtuvieron cultivos confluentes y se recogieron con una solución de tripsina al 0.05%. Por otra parte, al Matrigel se le añadieron los factores de crecimiento del EGM-2 single quots (Lonza). La preparación de los implantes de Matrigel se logró

mezclando 300 μ L de Matrigel enriquecido con los factores de crecimiento y $7.5 \cdot 10^5$ células, manteniéndolo en todo momento a 4°C. Una vez preparados, los implantes de Matrigel con las CPE se inyectaron subcutáneamente en la zona dorsal de ratones nude RjOrl:NMRI-Foxn1nu/Foxn1nu (Janvier, Le Genest-Saint-Isle, Francia). Tras 7 días los ratones se sacrificaron y se extrajeron los implantes que se homogenizaron en solución de lisis (17 mM Tris HCl 0,75% NH₄ pH 7.6) durante 18 horas a 4°C. Finalmente se determinó el contenido de hemoglobina de los sobrenadantes, referido al peso del implante, mediante el reactivo de Drabkin (Sigma-Aldrich) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los resultados se muestran como contenido de hemoglobina total expresado en unidades arbitrarias, relativas a los valores control.

4.4.6 Producción de óxido nítrico

La producción de NO en células en cultivo se determinó mediante el uso de la sonda fluorescente 4-amino-5-metilamino-2',7'-difluorofluoresceína diacetato (DAF-FM diacetato) (Life Technologies). Esta sonda contiene un grupo diacetato que le permite la entrada al citoplasma celular. Una vez en su interior, diferentes esterasas eliminan este grupo haciendo imposible su difusión al exterior de la célula a través de la membrana plasmática. Cuando la sonda interacciona con el NO producido en el interior celular emite una fluorescencia en la región verde del espectro visible.

Material y métodos

Después de aplicar los diferentes tratamientos sobre los cultivos de CPE, las células fueron incubadas con 3,8 μ M de DAF-FM a 37°C y 5% CO₂ durante 30 min. Para eliminar el exceso de la sonda se realizaron dos lavados con PBS y las células se incubaron durante 15 min adicionales para asegurar una completa desesterificación de los diacetatos intracelulares. La producción de NO se determinó midiendo la fluorescencia de la sonda DAF-FM en cinco campos aleatorios con el microscopio de fluorescencia invertido Nikon Eclipse Ti con el objetivo 10X (magnificación total 100X) y con la cámara digital Nikon Ds-QiMic. Los resultados se analizaron con el programa Image Pro-Plus V.6 y se expresaron como intensidad media de fluorescencia por campo.

4.5 Recuento de las células endoteliales circulantes y las células progenitoras endoteliales circulantes

El número de CEC y CPE circulantes en muestras de sangre periférica se determinó por citometría de flujo atendiendo a la expresión de diferentes marcadores de la superficie celular (Tabla 3).

Anticuerpo	Fluorocromo	Fabricante
KDR	PE	R&D Systems
CD31	FITC	Becton Dickinson
CD34	FITC	Becton Dickinson
CD146	PE	BioCytex
CD45	PerCP	Becton Dickinson

Tabla 3. Anticuerpos utilizados para la determinación del número de CPE circulantes y CEC.

Se incubaron 150 μ L de sangre periférica con diferentes combinaciones de anticuerpos según la población celular estudiada o con sus correspondientes controles isotópicos siguiendo las instrucciones del fabricante.

En la determinación de las CEC la combinación de anticuerpos utilizada fue anti-CD31 conjugado con FITC, anti-CD146 conjugado con PE y anti-CD45 conjugado con PerCP. Se consideraron CEC aquellas con el fenotipo CD31+CD146+CD45-.

Para la determinación de las CPE circulantes, la combinación de anticuerpos elegida fue anti-CD34 conjugado a FITC, anti-KDR

Material y métodos

conjugado a PE y anti-CD45 conjugado a PerCP. Se consideraron CPE circulantes aquellas con el fenotipo CD34+KDR+CD45-.

Pasado el periodo de incubación con los anticuerpos los eritrocitos se lisaron mediante una incubación de 15 minutos con la solución de lisis BD FACS Lysing Solution (Becton Dickinson). Después las muestras se lavaron dos veces, se resuspendieron en PBS con heparina (50U/mL) y se analizaron un total de $2 \cdot 10^6$ eventos por muestra con el citómetro de flujo FC500 (Beckman Coulter). Todas las determinaciones se realizaron por duplicado y los resultados se expresaron como número de CPE circulantes o CEC por mL de sangre.

4.6 Producción de micropartículas

En la última parte de este trabajo se utilizaron MP específicamente producidas para que contuvieran el morfogen Shh, MP^{Shh+} . A continuación se detalla la producción de MP^{Shh+} así como sus equivalentes negativas, MP que no contuvieran al morfogen Shh, MP^{Shh-} , utilizadas como control negativo.

La producción de MP se realizó tal y como se describe en (Martínez et al., 2006). La línea celular linfoblastoide humana (CEM) fue obtenida de la colección de cultivos tipo americana (ATCC, Virginia, Estados Unidos). Las CEM se cultivaron en medio X-Vivo 15 (Lonza) sin suero hasta obtener una concentración de células en cultivo de $1 \cdot 10^6$ células/mL.

Para la obtención de las MP^{Shh+} las CEM se trataron con fitohemaglutinina (Sigma-Aldrich) ($10 \mu\text{g/mL}$) durante 72 horas. Transcurrido este tiempo, las CEM se trataron con forbol 12-miristato 14-acetato (Sigma-Aldrich) (40 ng/mL) y actinomicina D (Sigma-Aldrich) ($1 \mu\text{g/mL}$) durante otras 24 horas. En conjunto las CEM fueron tratadas de forma secuencial durante un periodo de 96 horas. Para la obtención de MP^{Shh-} las CEM se trataron únicamente con actinomicina D ($1 \mu\text{g/mL}$) durante 24 horas.

Tras los tratamientos, las CEM fueron sometidas a una serie de centrifugaciones para aislar tanto las MP^{Shh+} como las MP^{Shh-} . La primera centrifugación se realizó a 750 g durante 15 min para eliminar

Material y métodos

el contenido celular. Después, el sobrenadante obtenido de esta centrifugación se sometió a otra centrifugación de 1.500 g para eliminar posibles restos celulares y el sobrenadante se recuperó de nuevo. Este sobrenadante, que contenía las MP, se centrifugó a 14.000 g durante 45 min para precipitar las MP. En este punto el sobrenadante fue descartado y las MP se sometieron a dos lavados con solución salina (NaCl 0.9 %) (Sigma-Aldrich) con dos centrifugaciones adicionales a 14.000 g durante 45 min. Finalmente las MP se recuperaron con 400 μ L de solución salina estéril. El contenido de MP se ajustó a 10 μ g/ μ L de proteína determinado a través de estándares de albúmina de suero bovino por el método de Lowry.

4.7 Estudio de la reorganización del citoesqueleto

Para estudiar los cambios morfológicos observados en los cultivos celulares inducidos por los diferentes tratamientos durante 24 horas, las CPE se fijaron con una solución de paraformaldehído al 4% en PBS durante 20 min a temperatura ambiente y fueron permeabilizadas con Triton X-100 al 0,5% en PBS durante 5 min. Los filamentos de actina se tiñeron con el *kit* comercial *Rhodamine Phalloidin* (Cytoskeleton, Colorado, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los núcleos celulares se marcaron con 100 nM de DAPI en PBS durante 30 segundos. Las imágenes fueron captadas con el microscopio de fluorescencia invertido Nikon Eclipse Ti, objetivo 40X (magnificación total 400X) y la cámara digital Nikon Ds-QiMic.

4.8 Estudio de la interacción de las micropartículas con las células progenitoras endoteliales

Para estudiar la interacción de las MP con las CPE, las MP se tiñeron con PKH67 (Sigma-Aldrich), marcador fluorescente verde con largas colas alifáticas que se incorporan en las regiones lipídicas de la membrana. En primer lugar las MP se incubaron durante 2 min con una solución de PKH67 2 mM en solución salina (NaCl 0,9%). El proceso de tinción se detuvo con la adición de SBF al 100%. Para eliminar el exceso de marcador las MP se lavaron dos veces con solución salina estéril.

Por otro lado, y para poder visualizar las células y las estructuras celulares, los núcleos y el citoesqueleto de actina de las CPE se marcaron con DAPI y Rhodamina-Phalloidina tal y como se indica en el apartado anterior.

Después del proceso de tinción se obtuvieron imágenes con el microscopio confocal LMS 700 (Carl Zeiss Microscopy, Barcelona, España) con los objetivos de 10X y 63X (magnificación total de 100X y 630X, respectivamente). La captación de las imágenes y su análisis fue llevado a cabo con el programa ZEN (Carl Zeiss Microscopy).

4.9 Exposición de las células progenitoras endoteliales a los diferentes tratamientos

Con la finalidad de profundizar en los mecanismos moleculares implicados en los procesos celulares estudiados, las CPE fueron sometidas a diferentes tratamientos.

4.9.1 Ciclopamina

Es un alcloide esteroideo obtenido de la planta *Veratum californicum* y potente inhibidor de la ruta de señalización Hedgehog por influencia en el balance entre las formas activa e inactiva de la proteína SMO. En la figura 21 se muestra el lugar en la ruta de señalización Hedgehog donde ejerce su inhibición (Dorsam and Gutkind, 2007).

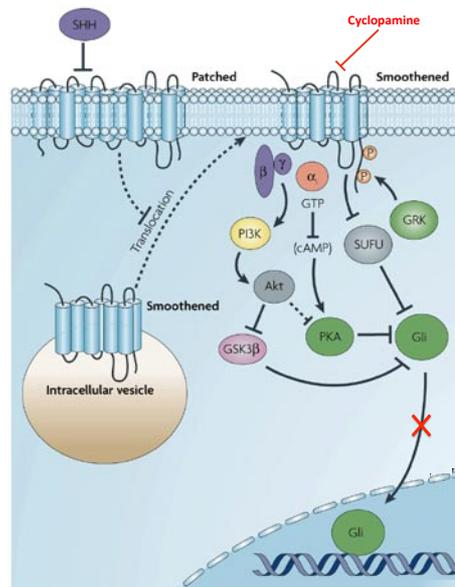


Figura 21. Ruta de señalización Hedgehog y lugar donde la ciclopamina ejerce su inhibición. Imagen tomada y adaptada de (Dorsam and Gutkind, 2007).

Material y métodos

La ciclopamina (Sigma-Aldrich) se adquirió en forma hidrato de ciclopamina y se disolvió en dimetil sulfóxido (DMSO) a una concentración stock de 3 mM. Cuando las CPE alcanzaron un 80% de confluencia se trataron con ciclopamina 15 μ M en DMSO al 1% una hora antes de la adición de las MP y, después, durante un período de 24 horas. Las CPE utilizadas como control se trataron únicamente con el vehículo, DMSO al 1 %, para descartar los posibles efectos que el DMSO pudiera tener por sí mismo en la ruta estudiada.

4.9.2 LY 294002

El LY 294002 es un compuesto químico que posee un grupo morfolino y es un potente inhibidor selectivo de la fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K) cuando interacciona con el sitio de unión al ATP. La PI3K se encuentra en la ruta activada por el efector de Shh, SMO. La figura 22 muestra su el lugar de la ruta de señalización Shh donde el LY 294002 ejerce su inhibición.

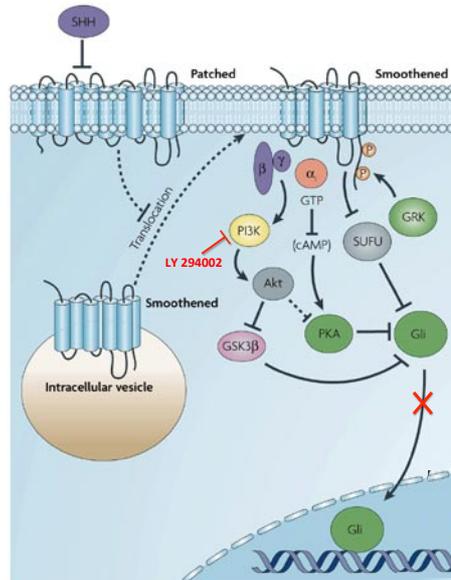


Figura 22. Ruta de señalización Hedgehog y lugar dónde LY 294002 ejerce su inhibición. Imagen tomada y adaptada de (Dorsam and Gutkind, 2007).

El LY 294002 (Merck Millipore, Madrid, España) se disolvió en DMSO siguiendo las instrucciones del fabricante a una concentración stock de 10 mM. Cuando las células alcanzaron el 80% de confluencia se trataron con LY 294002 10 μ M en DMSO al 1% una hora antes de la adición de las MP y, después, durante un período de 24 horas. Para estudiar posibles efectos ocasionados por el vehículo, las CPE se incubaron con DMSO 1%.

4.9.3 Y 27362

El Y 27632 es un potente inhibidor selectivo de las proteínas quinasas asociadas a RHO (ROCK). Esta inhibición es competitiva con respecto al sitio de unión del ATP y reversible. La ROCK se encuentra en la ruta de señalización del efector de Hedgehog,

Material y métodos

SMO. La figura 23 muestra el lugar de la ruta de señalización Hedgehog donde ejerce su inhibición.

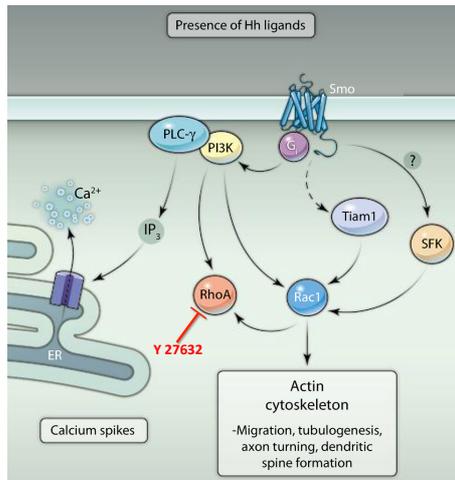


Figura 23. Ruta de señalización Hedgehog y lugar donde el Y 27632 ejerce su inhibición. Imagen tomada y adaptada de (Dorsam and Gutkind, 2007).

El Y 27632 (Merck Millipore) se disolvió siguiendo las instrucciones del proveedor a una concentración stock de 10 mM en agua ultrapura. Cuando las células alcanzaron el 80% de confluencia se trataron con Y 27632 100 μ M una hora antes de la adición de las MP y, después, durante un período de 24 horas.

4.9.4 L-NAME

El N^w-Nitro-L-arginina metil éster hidrocloreuro (L-NAME), análogo de la L-Arginina, es un inhibidor de la actividad óxido nítrico sintasa (NOS) y bloquea la producción de NO de las isoformas endotelial (eNOS), neuronal (nNOS) e inducible (iNOS). La figura 24 muestra la reacción que inhibida por el L-NAME.

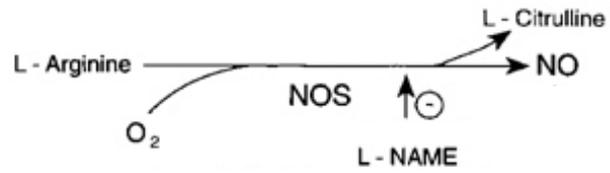


Figura 24. Reacción de conversión de L-Arginina en NO e inhibición por el L-NAME.

El L-NAME (Sigma-Aldrich) se disolvió en agua ultrapura a una concentración stock de 10 mM. Cuando las células alcanzaron el 80% de confluencia se trataron con L-NAME 100 μ M una hora antes de la adición de las MP y, después, durante un período de 24 horas.

4.10 Análisis de la expresión génica

El análisis de la expresión génica se llevó a cabo mediante la técnica *Real-Time quantitative Polymerase Chain Reaction* (RT-qPCR) midiendo la cantidad relativa de transcritos de un conjunto determinado de genes respecto a un gen endógeno expresado constitutivamente.

4.10.1 Extracción del RNA total

Tras la exposición de las CPE a los diferentes tratamientos éstas se recogieron con Trizol (Life Technologies) para proceder a la extracción del RNA total. Para asegurar una perfecta homogenización se utilizaron jeringuillas de 1 mL y agujas hipodérmicas 25G x 5/8". La extracción del RNA total se realizó en columnas de sílica con el kit comercial PureLink RNA Mini Kit (Life Technologies) según las instrucciones del fabricante. El DNA genómico se eliminó por digestión con DNasa, PureLink DNase Set (Life Technologies), en columna. Finalmente, el RNA fue eluido de las columnas, se cuantificó y se congeló a -80°C hasta su posterior uso.

La integridad del RNA se determinó mediante el bioanalizador 2100 Bioanalyzer (Agilent, California, USA). Además también se determinó la pureza de muestras de RNA aislado mediante el cálculo del ratio de absorbancia $\lambda_{260}/\lambda_{280}$. Únicamente se utilizaron aquellas muestras en las que el RNA presentaba buena integridad y un ratio $\lambda_{260}/\lambda_{280} > 1.8$.

4.10.2 Síntesis de cDNA a partir del RNA total

Para poder llevar a cabo la RT-qPCR es necesario retrotranscribir el RNA total a cDNA. Este proceso se llevó a cabo con el kit High-Capacity RNA-to-cDNA (Life Technologies) siguiendo las instrucciones del fabricante. El termociclador utilizado para la retrotranscripción fue el Mastercycler Eppendorf Thermocycler (Eppendorf, Hamburgo, Alemania). El cDNA obtenido en esta reacción se conservó a -80°C hasta su uso.

4.10.3 Real Time-quantitative Polimerase Chain Reaction

La cuantificación de los genes (Tabla 4) se llevó a cabo por RT-qPCR en el termociclador ABI Prism 7900 Sequence Detection System (Applied Biosystems, California, USA) y con el uso de la tecnología TaqMan (Applied Biosystems). Esta tecnología permite la detección y cuantificación relativa a un gen endógeno de la expresión génica. En nuestro caso el gen endógeno de elección fue el 18S.

Symbol	Name	TaqMan assay	Reference sequence
<i>SMO</i>	Smoothed	Hs01090242_m1	NM_005631.4
<i>GLI1</i>	GLI family zinc finger 1	Hs01110766_m1	NM_005269.2
<i>PTCH1</i>	Patched 1	Hs00181117_m1	NM_000264.3
<i>NOS3</i>	Nitric oxide synthase 3	Hs01574659_m1	NM_000603.4
<i>VEGFA</i>	Vascular endothelial growth factor A	Hs00900055_m1	NM_001025366.2
<i>KDR</i>	Kinase insert domain receptor	Hs00911700_m1	NM_002253.2
<i>KLF2</i>	Kruppel-like factor 2	Hs00360439_g1	NM_016270.2
<i>18S</i>	18S ribosomal RNA	Hs99999901_s1	X_03205.1

Tabla 4. Sondas taqman utilizados para la determinación de la expresión génica por RT-qPCR.

Material y métodos

Las reacciones de PCR se prepararon con el Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems) y las sondas Taqman siguiendo las instrucciones del fabricante. Los resultados se analizaron con el programa SDS 2.3 (Applied Biosystems) y se expresaron como expresión relativa al gen endógeno 18S. La variación en la expresión de un gen se calculó como $2^{-\Delta\Delta Ct}$, donde $\Delta\Delta Ct$ se obtiene de la siguiente manera:

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{tratamiento}} - \Delta Ct_{\text{control}}$$

donde

$$\Delta Ct_{\text{tratamiento}} = Ct(\text{gen problema}_{\text{tratamiento}}) - Ct(\text{gen endógeno}_{\text{tratamiento}})$$

y

$$\Delta Ct_{\text{control}} = Ct(\text{gen problema}_{\text{control}}) - Ct(\text{gen endógeno}_{\text{control}})$$

4.11 Análisis de la expresión proteica

El análisis de la expresión proteica se llevó a cabo por la técnica de Western Blot. Esta técnica comporta en primer lugar el extracción de la proteína total de los cultivos celulares. A continuación, su separación por peso molecular mediante electroforesis en geles de poliacrilamida. Finalmente, las proteínas se transfieren a una membrana de nitrocelulosa y se detectan por medio de anticuerpos específicos.

4.11.1 Preparación de las muestras y extracción de proteínas totales

Tras realizar los tratamientos, los cultivos de CPE se lavaron dos veces con PBS se resuspendieron en tampón de lisis RIPA (Sigma-Aldrich) con inhibidores de proteasas (Complete protease inhibitor cocktail, Roche, Madrid, España) e inhibidores de fosfatasas (PhosphoSTOP, Roche). Las células lisadas fueron también sonicadas para asegurarnos una completa disrupción de las membranas celulares y solubilización de los complejos proteicos. Finalmente, el contenido proteico total se determinó por la técnica del ácido bicinonínico (BCA) (BCA Protein Assay, Pierce, Fisher Scientific, Madrid, España) utilizando una curva estándar de proteína seroalbumina bovina (BSA) (Sigma-Aldrich).

4.11.2 Separación de las proteínas por electroforesis

La separación de proteínas se llevó a cabo por electroforesis en geles de poliacrilamida en gradiente 4–20% (Mini-PROTEAN® TGX

Stain-Free™ Gel) (Bio Rad, Madrid, España). Estos geles permiten la separación de las proteínas atendiendo a un único criterio, el peso molecular. La electroforesis se realizó en el sistema Mini-PROTEAN® Tetra Cell (Bio Rad) a un voltaje constante de 140 V durante 30 – 40 minutos.

4.11.3 Western Blot

Una vez separadas, las proteínas, fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa utilizando el mismo sistema con un voltaje de 100 V durante 2 horas a 4°C para proceder a la detección de las proteínas de interés por medio de anticuerpos específicos dirigidos contra éstas (Tabla 5).

Name	KDa	Provider	Dilution
Integrin α2	150	Becton Dickinson	1:250
Integrin α3	135	Becton Dickinson	1:250
Integrin α5	150	Becton Dickinson	1:5000
Integrin αL	180	Becton Dickinson	1:500
Integrin αV	125	Becton Dickinson	1:250
Integrin β1	130	Becton Dickinson	1:2500
Integrin β3	104	Becton Dickinson	1:2500
Integrin β4	200	Becton Dickinson	1:250
Fibronectin	240	Becton Dickinson	1:5000
Akt	60	Cell Signaling	1:500
p-Akt Ser 473	60	Cell Signaling	1:500
eNOS	140	Santa Cruz Biotechnology	1:500
p-eNOS Ser 1177	140	Cell Signaling	1:500
p-eNOS Thr 495	140	Cell Signaling	1:500
β-actin	42	Sigma-Aldrich	1:5000
anti-goat IgG	-	Santa Cruz Biotechnology	1:5000
anti-rabbit IgG	-	Santa Cruz Biotechnology	1:5000
anti-mouse IgG	-	Santa Cruz Biotechnology	1:5000

Tabla 5. Anticuerpos utilizados para la determinación de la expresión génica por WB.

Para aumentar la especificidad antígeno-anticuerpo las membranas se bloquearon con una solución de BSA al 3% y 0,1% Tween 20 (Sigma-Aldrich) en PBS durante una hora.

A continuación, las membranas se incubaron durante toda la noche a 4°C con el anticuerpo de interés diluido en una solución de BSA al 1% y 0,1% Tween 20. Las diluciones utilizadas para cada anticuerpo se indican en la tabla 5. Seguidamente, las membranas se lavaron 3 veces con PBS y se incubaron con los anticuerpos secundarios correspondientes, conjugados con el enzima peroxidasa de rábano. Tras realizar otros tres lavados las membranas se incubaron con SuperSignal West Pico Chemiluminiscent Substrate (Thermo Fisher Scientific, Madrid, Spain) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Las imágenes fueron obtenidas con el detector ImageQuant LAS-4000 (GE Healthcare Life Science, Barcelona, Spain) y analizadas con el programa ImageQuant TL 7, (GE Healthcare Life Science).

4.12 Análisis estadístico

Todos los resultados obtenidos en el presente trabajo se analizaron mediante el programa GraphPad Prism 6. En primer lugar se realizó el test de Kolmogórov-Smirnov con el fin de determinar la distribución normal o no de los resultados. Cuando los datos se distribuyeron normalmente, se aplicó el test t-Student para comparaciones simples. Para comparaciones múltiples se aplicó el test ANOVA de una o dos vías con el post-test post-test de Newman-Keuls o Bonferroni respectivamente. Cuando la distribución de los datos no era normal, se aplicó el test no paramétrico Kruskal-Wallis y el post-test Dunns en comparaciones múltiples. Los porcentajes se compararon mediante el estadístico Chi-cuadrado. Se consideró estadísticamente significativo un valor de p inferior a 0,05.

5 Resultados

5.1 Puesta a punto del método de aislamiento y cultivo de células progenitoras endoteliales a partir de muestras de sangre periférica

Para poner a punto el método adecuado para el aislamiento y cultivo de CPE se utilizaron muestras de sangre procedentes de sujetos sanos (n=50) (Tabla 6). La población de estudio estaba compuesta en un 80 % de hombres con una media de edad de $55,8 \pm 10,4$ años y un índice de masa corporal de $25,7 \pm 2,5$. En cuanto a los datos clínicos, los sujetos no presentaban ningún factor de riesgo cardiovascular y los valores de la presión arterial sistólica y diastólica fueron $123,4 \pm 12,9$ y $74,6 \pm 9,6$ mmHg respectivamente. En lo que respecta al perfil lípido, los sujetos mostraron niveles de colesterol total de $201,1 \pm 25$ mg/dL, niveles de LDL de $126,7 \pm 22,2$ mg/dL, niveles de HDL de $56,2 \pm 9,9$ mg/dL y niveles de triglicéridos de $86,6 \pm 31,1$ mg/dL.

CONTROL	
Demographic data	
Men	40 (80)%
Age (years)	55,8 ± 10,4
Body mass index	25,7 ± 2,5
Clinical data	
Systolic blood pressure (mmHg)	123,4 ± 12,9
Diastolic blood pressure (mmHg)	74,6 ± 7,6
Heart rate (bpm)	69,5 ± 9,6
Total cholesterol (mg/dL)	201,1 ± 25
LDL (mg/dL)	126,7 ± 22,2
HLD (mg/dL)	56,2 ± 9,9
Triglycerides	86,6 ± 31,3
Data expressed as n (%) or mean ± SD	

Tabla 6. Datos demográficos y clínicos de 50 sujetos sanos de los que se obtuvieron las muestras de sangre para el aislamiento y cultivo de CPE.

Desde el momento de la extracción de sangre periférica por venopunción hasta la siembra de la muestra para la obtención CPE, consideramos una serie de puntos críticos a tener en cuenta en el éxito de la técnica. En primer lugar, para evitar la contaminación de las muestra con células endoteliales desprendidas en el proceso de la venopunción se descartaron los primeros 6 ml de sangre, muestra que se destinó a la determinación de los parámetros bioquímicos. A continuación, se testaron cuáles de las siguientes condiciones para la obtención de cultivos de CPE eran las más apropiadas: 1) el anticoagulante utilizado en la extracción de las muestras de sangre; 2) el volumen de las muestras de sangre; 3) el tiempo transcurrido desde la extracción hasta el procesado de las muestras de sangre; 4) la matriz extracelular utilizada en el cultivo de las CMN y 5) la adición de SBF al medio de cultivo endotelial EGM-2.

5.1.1 Efecto del anticoagulante en el aislamiento y cultivo de las células progenitoras endoteliales

Para estudiar el efecto del anticoagulante en el proceso de aislamiento de las CPE se testaron tres anticoagulantes habitualmente utilizados en la recogida de sangre y se extrajeron volúmenes idénticos de sangre periférica en tubos que contenían EDTA (n=10), heparina sódica (n=10) o citrato sódico (n=10). Las CMN aisladas a partir de estas muestras se cultivaron hasta que aparecieron las primeras colonias de CPE o hasta un máximo de 40 días. Además, se registró el porcentaje de cultivos de CPE obtenidos y el tiempo medio de aparición de las primeras colonias de CPE.

Cuando las muestras de sangre se recogieron en EDTA se obtuvieron cultivos en el 20% de las muestras procesadas, a diferencia de las recogidas en heparina sódica o citrato sódico en las que el porcentaje de cultivos obtenido fue del 80% ($p < 0,01$; Figura 25A). Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en el tiempo medio de aparición de las primeras colonias de CPE para los diferentes anticoagulantes utilizados (Figura 25B).

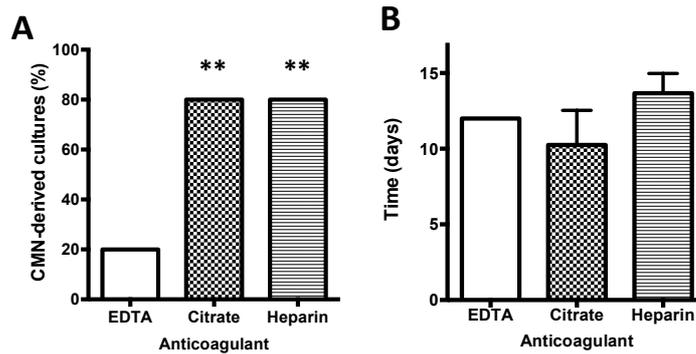


Figura 25. Efecto del anticoagulante en el aislamiento y cultivo de CPE. Las muestras de sangre se recogieron con los anticoagulantes EDTA, heparina sódica o citrato sódico. Los cultivos de CMN fueron monitorizados durante un máximo de 40 días o hasta que aparecieron las primeras colonias celulares. **(A)** Porcentaje de cultivos obtenidos (** $p < 0,01$ vs. EDTA mediante el test Chi-cuadrado; $n=10$). **(B)** Tiempo medio de aparición de las primeras colonias celulares expresado como media \pm SEM.

En cuanto a la morfología celular de los cultivos obtenidos observamos diferencias según el anticoagulante utilizado. Las células de los cultivos obtenidos a partir de muestras de sangre recogidas en citrato sódico mostraban una morfología diferente (Figura 26A) a la morfología adoquinada típica de CE (Figura 26B), que sí mostraban las células de los cultivos obtenidos a partir de muestras de sangre recogidas en heparina. Esta diferencia morfológica se correspondió con una diferencia fenotípica. Únicamente las células que presentaron una morfología adoquinada eran capaces de captar LDL acetilada y de unir Ulex lectina (Figura 26C y D).

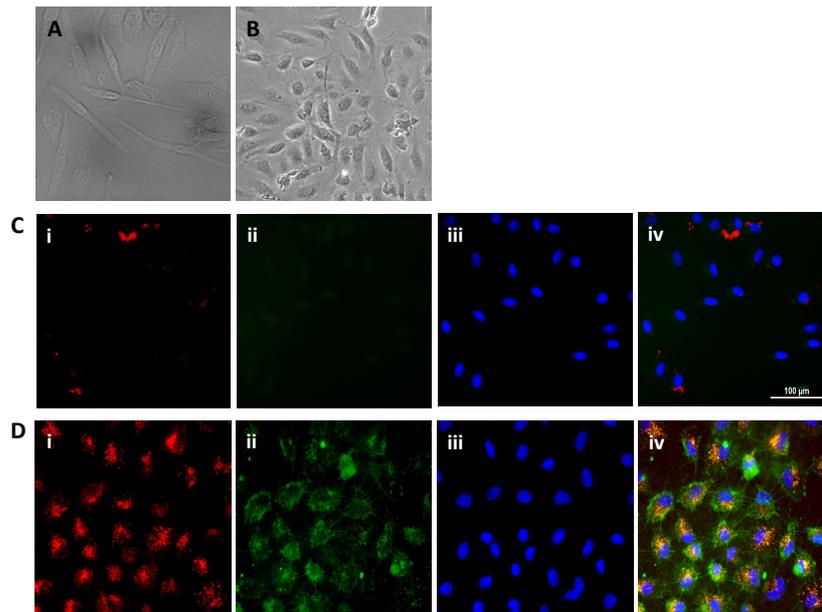


Figura 26. Caracterización morfológica y fenotípica de CPE procedentes de muestras recogidas con citrato sódico y heparina (A) Morfología de las células obtenidas procedentes de muestras recogidas con citrato sódico. **(B)** Morfología de las células obtenidas procedentes de muestras recogidas con heparina. **(C y D)** Captación de Dil ac-LDL (i), unión a FITC-Ulex Lectina. (ii), marcación de los núcleos con DAPI (iii) y superposición de las imágenes i, ii e iii (iv) para células obtenidas procedentes de muestras recogidas con citrato sódico y heparina respectivamente. La barra de escala representa 100 µm. Magnificación total 200X.

Estos resultados indican que la heparina es el anticoagulante más adecuado para la obtención de cultivos con morfología adoquinada y homogéneos en el mayor porcentaje (80%). Por consiguiente, las siguientes condiciones testadas se realizaron con muestras de sangre recogidas en heparina sódica.

5.1.2 Efecto del volumen de la muestra de sangre en el aislamiento y cultivo de las células progenitoras endoteliales

Para determinar el efecto del volumen de las muestras de sangre en el proceso de aislamiento de las CPE se utilizaron diferentes volúmenes de sangre (10, 20 y 30 mL). El mayor volumen de sangre testado (30 mL) permitió el aislamiento de cultivos de CPE en el 80% de las muestras procesadas ($p < 0,05$ vs. 10 mL; Figura 27A) y además, el tiempo de aparición de las primeras colonias se redujo a 12 días desde el inicio del cultivo, a diferencia de las muestras de 10 mL ($p < 0,05$ vs. 10 mL; Figura 27B). Un volumen más reducido de 10 y 20 mL supuso una reducción del porcentaje de cultivos obtenidos del 80% al 60% y 30% respectivamente. Aunque no existieron diferencias significativas en el tiempo de aparición de las primeras colonias de CPE a partir de muestras de 20 y 30 mL, una reducción en el éxito del cultivo del 20% es considerable y debe tenerse en cuenta.

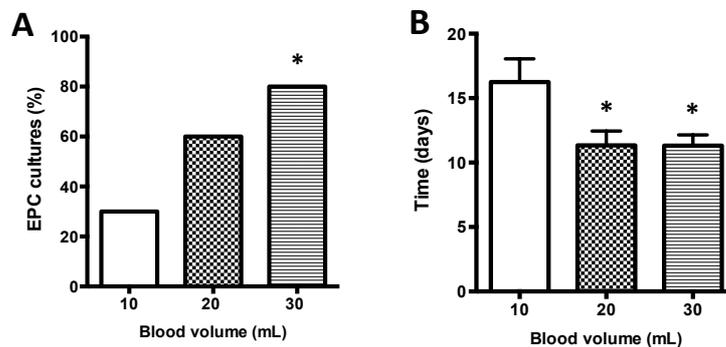


Figura 27. Efecto del volumen de las muestras de sangre en el aislamiento y cultivo de CPE. Se recogieron diferentes volúmenes de muestra de sangre, 10, 20 y 30 mL. **(A)** Porcentaje de cultivos obtenidos (*p < 0,05 vs. 10 mL mediante el test Chi-cuadrado; n=10). **(B)** Tiempo medio de aparición de las primeras colonias de CPE expresado como media ± SEM (*p < 0,05 vs. 10 mL mediante ANOVA de una vía y post-test de Newman-Keuls; n=10).

Los resultados obtenidos sugieren que para la obtención de mayor porcentaje de cultivos de CPE en un tiempo mínimo es preferible partir de mayores volúmenes de sangre. A partir de este punto, el resto de experimentos se realizó con volúmenes de muestras de sangre de 30 mL.

5.1.3 Efecto del tiempo transcurrido desde la extracción de las muestras de sangre hasta su procesado en el aislamiento y cultivo de las células progenitoras endoteliales

Para evaluar cómo afectaba el tiempo transcurrido desde la obtención de la muestra de sangre hasta el inicio del protocolo experimental, partimos de dos alícuotas de 30 mL de la misma muestra de sangre recogida en heparina. Una de ellas fue procesada en un tiempo inferior a dos horas y otra se mantuvo durante 24 horas en un mezclador de sangre.

El número de cultivos de CPE obtenidos de muestras procesadas en un tiempo inferior a 2 horas fue superior al obtenido en muestras procesadas a las 24 horas tras su extracción (80% vs. 30%; $p < 0,05$; Figura 31).

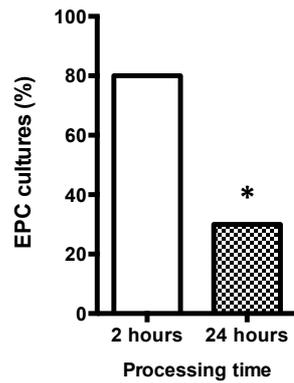


Figura 28. Efecto del tiempo transcurrido desde la extracción de las muestras de sangre hasta el procesado en el aislamiento y cultivo de CPE. Volúmenes idénticos de sangre se procesaron a las 2 o 24 horas tras su extracción. Porcentaje de cultivos obtenidos (* $p < 0,05$ mediante el test Chi-cuadrado; $n=10$).

Este resultado muestra una inestabilidad de las CPE a aislar con el tiempo y revela la necesidad de un procesado rápido de las muestras de sangre. Por tanto, el resto de condiciones testadas se realizó con muestras de sangre procesadas en un tiempo inferior a 2 horas.

5.1.4 Efecto de la matriz extracelular en el aislamiento y cultivo de las células progenitoras endoteliales

El cultivo de CPE a partir de CMN de sangre periférica requiere de una matriz extracelular en las placas cultivo que sea capaz de seleccionar únicamente a aquellos precursores que finalmente den lugar a un cultivo homogéneo de CPE. Por ello, la fracción de CMN aisladas a partir de muestras de sangre periférica se sembraron sobre dos de las matrices extracelulares más utilizadas en el cultivo de CPE: gelatina y fibronectina (Fadini et al., 2008a; Hirschi et al., 2008; Hur et al., 2004).

El uso de fibronectina como matriz extracelular permitía la obtención de cultivos de CPE en el 70% de las muestras procesadas frente al 20% obtenido con el uso de gelatina (Figura 29A; $p < 0,05$). Además, la fibronectina reducía también el tiempo medio de aparición de las primeras colonias de CPE de 23 días a 12 días (Figura 29B; $p < 0,01$).

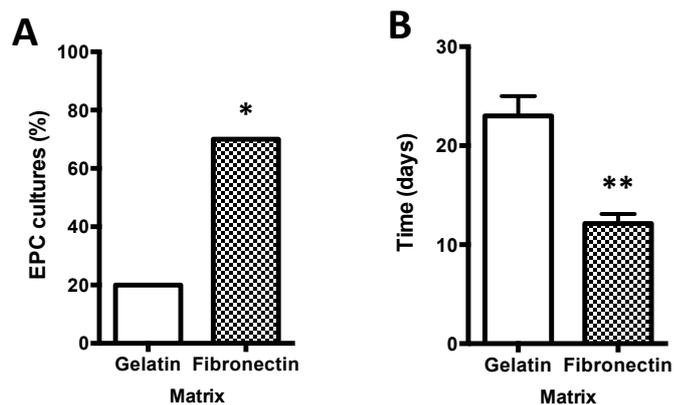


Figura 29. Efecto de la matriz extracelular en el aislamiento y cultivo de CPE. Las CMN se cultivaron en dos matrices extracelulares diferentes, gelatina o fibronectina. (A) Porcentaje de cultivos obtenidos (* $p < 0,05$ mediante el test Chi-cuadrado; $n=10$). (B) Tiempo medio de aparición de las primeras colonias de CPE expresado como media \pm SEM (** $p < 0,01$ mediante el test t-Student; $n=10$).

Por tanto, el uso de una matriz extracelular de fibronectina para el cultivo de CPE proporciona un alto rendimiento en la obtención de cultivos de CPE al mismo tiempo que reduce el tiempo medio de aparición de las primeras colonias de CPE por lo que el resto de condiciones testadas se realizó utilizando la fibronectina.

5.1.5 Efecto del enriquecimiento del medio de cultivo con suero bovino fetal en el aislamiento y cultivo de las células progenitoras endoteliales

El uso de SBF como suplemento en los medios de cultivo es necesario cuando no se conocen exactamente las necesidades de nutrientes y factores de crecimiento para que una línea celular progenitora prolifere y de lugar a un fenotipo celular maduro.

Se testaron dos concentraciones de SBF diferentes, 2% y 20%, como suplemento al medio de cultivo endotelial EGM-2. Si bien no se encontraron diferencias en la obtención de cultivos de CPE entre las dos condiciones testadas (Figura 30A; $p=0,074$), el tiempo medio de aparición de las primeras colonias de CPE se redujo de 16 a 11 días cuando los medios de cultivo se enriquecieron con un 2% y un 20% de SBF respectivamente (Figura 30B; $p<0,05$).

Debido a la fuerte tendencia observada en el éxito de los cultivos, así como a la reducción del tiempo de aparición de las primeras colonias de CPE, el porcentaje de SBF utilizado para enriquecer el medio de cultivo endotelial EGM-2 fue del 20%.

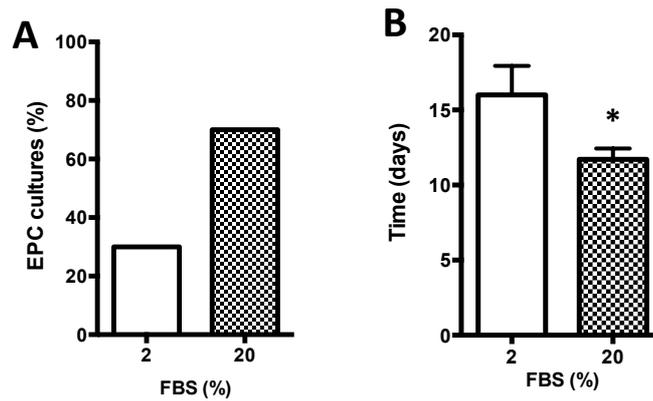


Figura 30. Efecto del enriquecimiento del medio de cultivo con SBF en el aislamiento y cultivo de CPE. Las CMN se cultivaron en medio de cultivo endotelial EGM-2 enriquecido con un 2% o un 20% de SBF. (A) Porcentaje de cultivos de CPE obtenidos (n=10). (B) Tiempo medio de aparición de las primeras colonias de CPE expresado como media \pm SEM (* $p < 0,05$ mediante el test t-Student; n=10).

En resumen, según los resultados obtenidos, las condiciones óptimas para el aislamiento y cultivo de CPE a partir de muestras de sangre periférica serían: 1) el uso de la heparina como anticoagulante para la recogida de las muestras de sangre; 2) el uso de volúmenes de sangre de 30 mL o superiores; 3) un procesamiento de las muestras de sangre inferior a dos horas tras su extracción; 4) el uso de fibronectina como matriz extracelular para el cultivo de las CMN aisladas a partir de las muestras de sangre; y 5) el enriquecimiento del medio de cultivo endotelial EGM-2 con un 20% de SBF.

Con estas condiciones experimentales se obtiene un alto porcentaje de éxito en la obtención de un cultivo homogéneo y confluyente de CPE

Resultados

a partir de muestras de sangre periférica, así como una reducción en el tiempo medio de aparición de las primeras colonias (Figura 31).

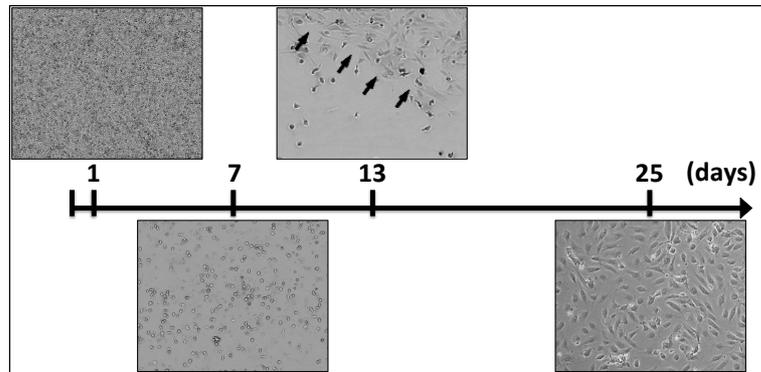


Figura 31. Seguimiento de un cultivo de CPE. Las CMN obtenidas a partir de muestras de sangre periférica se sembraron sobre una matriz de fibronectina (día1). A las 24 horas, las células no adheridas se eliminaron y se continuó el cultivo de las células adheridas (día 7). Tras la aparición de las primeras colonias con morfología adoquinada (día 13) el cultivo se continuó hasta que alcanzó confluencia (día 25).

5.1.6 Caracterización fenotípica de los cultivos de células progenitoras endoteliales

Los cultivos de CPE fueron sometidos a una caracterización fenotípica para comprobar sus características progenitoras y endoteliales. El fenotipo endotelial y progenitor se determinó mediante el uso de dos técnicas diferentes, la citometría de flujo y la inmunofluorescencia.

Mediante citometría de flujo se analizó la expresión de los marcadores celulares de superficie KDR, CD31, CD34 y CD45. Los marcadores endoteliales KDR y CD31 eran expresados por todas las

células del cultivo, mientras que el marcador progenitor CD34 lo expresaban un 45% de las células. Todas las células resultaron negativas para el marcador panleucocitario, CD45 (Figura 32A). Estos resultados corroboran los resultados de morfología celular obtenidos por microscopía y confirman el fenotipo progenitor y endotelial de los cultivos de CPE. Además, el patrón de expresión que muestran los cultivos obtenidos con el protocolo propuesto coincide con el más aceptado actualmente para definir a las CPE circulantes (Fadini et al., 2008a).

La captación de LDL acetilada y la unión a la Ulex lectina ha sido ampliamente utilizada para caracterizar cultivos de CE y actualmente es considerada una característica que define el fenotipo endotelial. Mediante inmunofluorescencia se determinó la capacidad del cultivo celular para captar LDL acetilada y unirse a la Ulex lectina. El 100% de las células en cultivo obtenidas a partir de muestras de sangre periférica fueron capaces de captar LDL acetilada y unirse a la Ulex lectina (Figura 32B).

Por otro lado, el vWF es una glicoproteína producida exclusivamente por las CE y los megacariocitos y es un marcador utilizado de forma rutinaria para identificar vasos sanguíneos en secciones de tejido (Zanetta et al., 2000). Al igual que para los marcadores específicos determinados con anterioridad, el 100% de las células en cultivo procedentes de sangre periférica expresaban el vWF de forma constitutiva (Figura 32C).

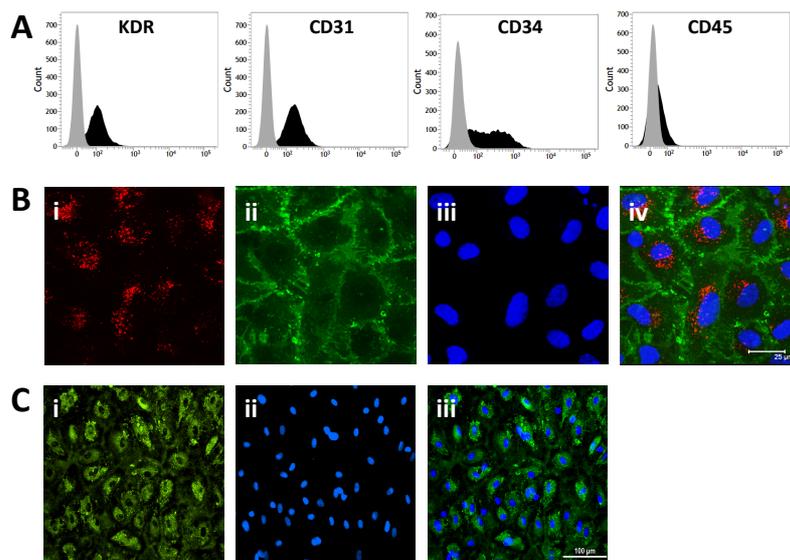


Figura 32. Caracterización fenotípica de los cultivos de CPE. (A) Histogramas representativos de la expresión de los marcadores KDR, CD31, CD34 y CD45 en los cultivos de CPE. Los histogramas grises representan las células marcadas con el control isotípico para cada anticuerpo. Los histogramas negros representan las células marcadas positivamente para KDR, CD31, CD34 o CD45. **(B)** Cultivos confluentes marcados con Dila c-LDL (i); y FITC-Ulex Lectina (ii); núcleos teñidos con DAPI (iii). (iv) Superposición de las imágenes i, ii y iii. La barra de escala representa 25 μm. Magnificación total 1200X. **(C)** Los cultivos aislados a partir de muestras de sangre periférica se marcaron con FITC-vWF (i) y DAPI (ii). (iii) Superposición de las imágenes i y ii. La barra de escala representa 100 μm. Magnificación total 200X. Los resultados son representativos de 10 experimentos independientes.

La expresión de los marcadores endoteliales CD31, KDR, vWF y del marcador progenitor CD34, la capacidad de captar LDL acetilada y unir Ulex lectina así como la ausencia de expresión de marcador panleucocitario CD45 son criterios suficientes para afirmar que el protocolo aquí propuesto permite el aislamiento y cultivo de CPE con fenotipo endotelial y progenitor.

5.1.7 Caracterización funcional de los cultivos de células progenitoras endoteliales

Para comprobar el comportamiento funcional de los cultivos de CPE estudiamos la capacidad de las células en términos de crecimiento, proliferación, adhesión y vasculogénesis y la comparamos con la obtenida en HUVEC, modelo celular establecido para estudios en CE *in vitro*.

5.1.7.1 Adhesión celular

Después de movilizarse desde la médula ósea, las CPE tienen que ser capaces de poder establecerse y adherirse a los sitios del sistema cardiovascular donde la integridad del endotelio ha sido comprometida. En estos lugares, las CE dañadas se desprenden de las paredes de los vasos sanguíneos y la matriz extracelular queda expuesta al torrente sanguíneo. Uno de los principales componentes de la matriz extracelular es la fibronectina, y la capacidad de las CPE de unirse a ésta va a ser la que determine finalmente la reendotelización del vaso dañado.

Por ello determinamos la capacidad de las CPE en cultivo de adherirse a una matriz extracelular de fibronectina durante 30 minutos y la comparamos con la obtenida en HUVEC. Los resultados muestran que la adhesión de las CPE en cultivo es similar a la observada para HUVEC (32% vs. 35% respectivamente; Figura 33).

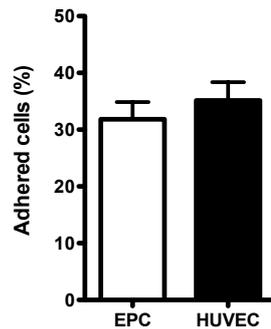


Figura 33. Adhesión celular. Se sembraron $5 \cdot 10^4$ células en placas previamente tratadas con fibronectina ($2,5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$). Los resultados representan el porcentaje de células adheridas (media \pm SEM; $n=10$) tras 30 min de incubación respecto al total de células sembradas.

5.1.7.2 Proliferación celular

De la misma manera, después de adherirse, las CPE tienen que ser capaces de responder de manera adecuada a las condiciones presentes en la zona donde el endotelio ha sido dañado. Allí las CE adyacentes y los tejidos privados del aporte de oxígeno normal liberan una serie de sustancias que promueven la proliferación de las CPE para restablecer el endotelio y, por consiguiente, el flujo sanguíneo.

La capacidad proliferativa de los cultivos de CPE y HUVEC se estudió tanto en condiciones de ayuno como en condiciones de estímulo con medio de cultivo EGM-2 tras 48 horas de ayuno. En condiciones de ayuno las células en cultivo son privadas de factores de crecimiento necesarios para su proliferación. En estas condiciones las células adquieren un estado quiescente en el que la tasa proliferativa es mínima. En el caso de los cultivos

de EPC y HUVEC, las condiciones de ayuno redujo su estado proliferativo al 10% en ambos casos (Figura 34).

Tras el periodo de ayuno las células fueron estimuladas con medio endotelial EGM-2 completo, rico en factores de crecimiento, durante 18 horas y se determinó el porcentaje de células en proliferación bajo estas nuevas condiciones. Bajo las condiciones de estímulo se observó un aumento en la proliferación de hasta 6 veces en CPE y HUVEC con respecto a las condiciones de ayuno ($p < 0,05$; Figura 34). Sin embargo, no se encontraron diferencias entre las capacidades proliferativas en respuesta a los factores de crecimiento aportados por el medio completo EGM-2 entre cultivos de CPE y HUVEC.

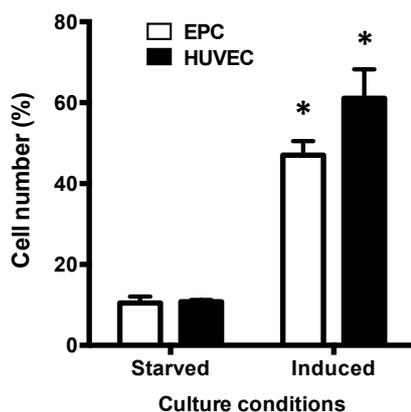


Figura 34. Proliferación celular.

Ambos cultivos se incubaron con medio de ayuno durante 48 horas; después fueron estimuladas con medio EGM-2 durante 18 horas adicionales. Las células se recogieron y se tiñeron con una solución de yoduro de propidio y el ciclo celular fue determinado por citometría de flujo. Los resultados representan el número de células en proliferación (mitosis más interfase, expresadas como porcentaje del total de células como media \pm SEM (* $p < 0,05$ vs. ayuno para el mismo tipo celular mediante el test t-Student; $n=10$);).

5.1.7.3 Curva de crecimiento celular

Una vez adheridas en la zona del endotelio lesionada, las CPE tienen que ser capaces de dividirse y aumentar en número para poder reparar la lesión endotelial. El estado de diferenciación de las CPE así como la senescencia celular pueden afectar a la capacidad de crecimiento celular y comprometer la reendotelización tras una lesión vascular.

El crecimiento de las CPE en cultivo mostró diferencias significativas con respecto a las HUVEC. Los datos obtenidos de la cinética de crecimiento (Figura 35) mostraron una fase de latencia más prolongada en CPE que las HUVEC (2,4 días vs. 1,3 días; $p < 0,05$). Además los cultivos de CPE presentaron una fase de crecimiento exponencial más corta y alcanzaron la fase de crecimiento estacionario 4 días tras su siembra a una densidad de saturación de $5,2 \cdot 10^5$ células/cm². Sin embargo, los cultivos de HUVEC alcanzaron la fase de crecimiento estacionario a los 5 días de haber iniciado su cultivo a una densidad de saturación de $17,7 \cdot 10^5$ células/cm² ($p < 0,001$).

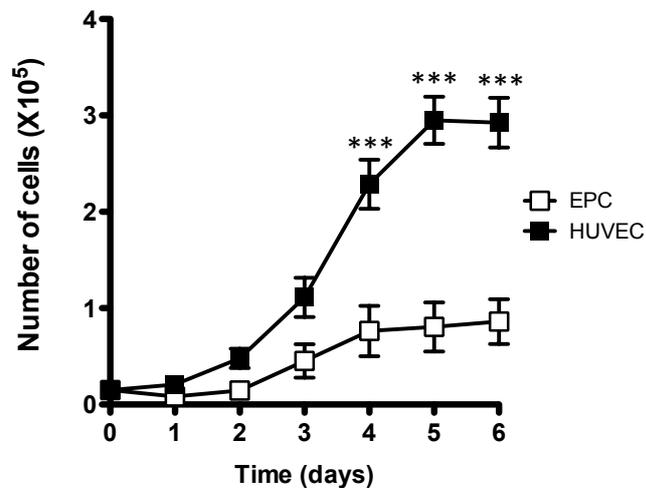


Figura 35. Curva de crecimiento celular. Inicialmente se sembraron $1,5 \cdot 10^4$ células (día 0) en placas de cultivo de 24 pocillos y se determinó el número total de células/pocillo diariamente durante 6 días. Los resultados muestran el recuento total de células para cada cultivo de los días 1 a 6 y se expresan como media \pm SEM (***) $p < 0,001$ vs. EPC mediante el test ANOVA de dos vías y el post-test de Bonferroni; $n=10$).

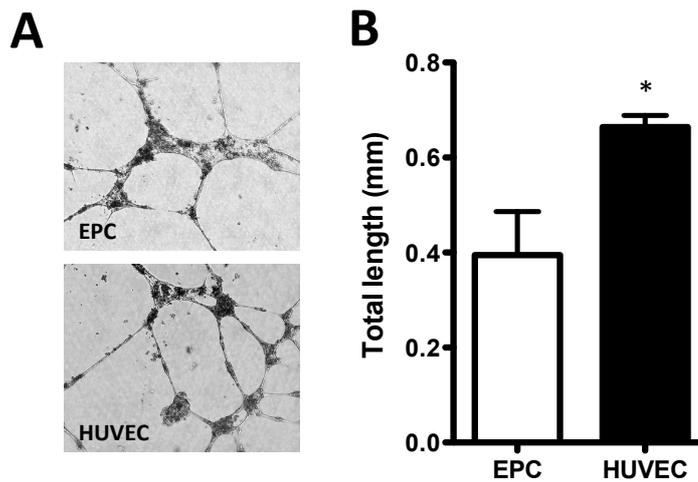
5.1.7.4 Capacidad vasculogénica

Además de adherirse, proliferar y crecer, las CPE tienen que ser capaces de organizarse en estructuras tridimensionales y formar los nuevos vasos sanguíneos necesarios para restablecer la integridad del endotelio y el flujo sanguíneo.

La capacidad vasculogénica *in vitro* de los cultivos de CPE se determinó mediante la siembra de estas células sobre una matriz de Matrigel. Todos los cultivos de CPE y HUVEC fueron capaces

Resultados

de organizarse en estructuras tubulares de forma similar (Figura 36A). Tras 24 horas de incubación se midió la longitud total de las estructuras tubulares formadas sobre la matriz de Matrigel. Los cultivos de HUVEC formaron estructuras tubulares de mayor longitud que los cultivos de CPE ($664 \pm 25 \mu\text{m}$ vs. $394 \pm 92 \mu\text{m}$; $p < 0,05$; Figura 36B).



Los cultivos de CPE aislados a partir de muestras de sangre periférica son capaces de formar estructuras tubulares sobre una matriz de Matrigel por sí mismos y, además, muestran una capacidad de adhesión y proliferación similar a la que presentan los cultivos de HUVEC. Con estos resultados podemos garantizar que el

protocolo aquí propuesto permite el aislamiento y cultivo de CPE con un comportamiento funcional *in vitro* similar al que presentan las HUVEC en cultivo.

5.2 El infarto agudo de miocardio y las células progenitoras endoteliales: movilización y funcionalismo

En estados fisiológicos, la capacidad replicativa de las CE locales es suficiente para mantener la integridad del endotelio. Sin embargo, esta integridad endotelial puede verse comprometida cuando existe algún factor de riesgo cardiovascular o en presencia de alguna patología cardiovascular como es el IAM (Deanfield et al., 2007; Op den Buijs et al., 2004). Por ello en el presente trabajo estudiamos la movilización de las CPE en el IAM y su evolución durante la evolución clínica del paciente. Además, estudiamos la función de las CPE en cultivo aisladas a partir de muestras de sangre extraídas de pacientes con IAM a diferentes tiempos.

Para la realización de esta parte del trabajo se incluyeron sujetos sanos (controles) (n=50) y pacientes de IAM (n=50), atendiendo a los criterios de inclusión presentados en el apartado de *Material y métodos*. Para los sujetos sanos se realizó una única extracción de sangre. Para los pacientes con IAM se realizaron tres extracciones a lo largo de su evolución clínica: la primera extracción se realizó en las primeras 24 horas tras ser diagnosticados con IAM; la segunda, 30 días después y la tercera a los 6 meses de seguimiento clínico.

Los datos demográficos y clínicos basales de las poblaciones de estudio se presentan en la tabla 7. Los pacientes con IAM presentaron valores de presión arterial, sistólica y diastólica, superiores a los sujetos sanos. Además, los pacientes con IAM mostraron también una mayor

frecuencia cardíaca. En cuanto al perfil lipídico no se encontraron diferencias entre el colesterol total y los niveles de LDL entre los dos grupos. Los niveles de triglicéridos eran superiores en pacientes con IAM mientras que los niveles de HDL eran inferiores.

	CONTROL	AMI	P
Demographic data			
Men	40 (80)%	41 (82)%	-
Age (years)	55,8 ± 10,4	52,8 ± 10,8	-
Body mass index	25,7 ± 2,5	27,4 ± 3,2	0,004
Clinical data			
Systolic blood pressure (mmHg)	123,4 ± 12,9	140 ± 31,8	< 0,001
Diastolic blood pressure (mmHg)	74,6 ± 7,6	84,3 ± 20	0,002
Heart rate (bpm)	69,5 ± 9,6	77,54 ± 20,5	0,013
Total cholesterol (mg/dL)	201,1 ± 25	196,6 ± 41,6	0,510
LDL (mg/dL)	126,7 ± 22,2	128,9 ± 31	0,692
HLD (mg/dL)	56,2 ± 9,9	43,32 ± 8,7	< 0,001
Triglycerides	86,6 ± 31,3	171,6 ± 111,9	< 0,001
Diabetes	-	5 (10%)	-
Hypercholesterolemia	-	11 (22%)	-
Arterial hypertension	-	15 (30%)	-
Smoking	-	39 (78%)	-
Treatment			
Acetylsalicylic acid	-	50 (100%)	-
Clopidogrel	-	46 (92%)	-
ACEI/ARB	-	44 (88%)	-
Beta-blockers	-	41 (82 %)	-
Statins	-	50 (100%)	-
Data expressed as n (%) or mean ± SD			

Tabla 7. Datos demográficos y clínicos de 50 sujetos sanos y 50 pacientes con IAM de los que se obtuvieron muestras de sangre para la determinación de los niveles de CPE circulantes y CEC.

Debido al diseño del estudio en el que se toma muestras de sangre a lo largo de la evolución clínica del paciente, consideramos de interés destacar el tratamiento farmacológico de los pacientes en el momento del alta. De esta manera, los pacientes con IAM fueron tratados con mayor frecuencia con ácido acetil salicílico, clopidogrel, inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina/antagonistas del receptor de la

angiotensina, beta-bloqueantes y estatinas de acuerdo con las actuales guías para el tratamiento de IAM (Tabla 7).

5.2.1 Movilización de células progenitoras endoteliales circulantes y células endoteliales circulantes en el infarto agudo de miocardio

El estudio de las CPE circulantes y CEC se realizó por citometría de flujo en muestras de sangre periférica de sujetos sanos y de pacientes con IAM atendiendo a la expresión de los marcadores CD34, KDR y la falta de expresión de CD45 para las CPE circulantes y la expresión de los marcadores CD31, CD146 y la usencia de CD45 para las CEC (Figura 37 y 38).

El número de CPE en los pacientes que acababan de sufrir el evento isquémico triplicaba a los valores del grupo control (79 ± 236 control vs. 287 ± 267 IAM 0d; $p < 0,001$; Figura 37), indicando una movilización de esta población tras el infarto. Los niveles de CPE seguían aumentados 30 días después del infarto hasta alcanzar valores de 507 ± 658 células/mL ($p < 0,001$ vs. control). A los 6 meses de seguimiento, los niveles de CPE mostraron una tendencia a reducirse, ya que el número de CPE obtenido fue de 296 ± 333 células/mL. A pesar de este descenso, los niveles de CPE seguían siendo mayores que los registrados en el grupo control (79 ± 236 vs. 296 ± 333 ; $p < 0,01$).

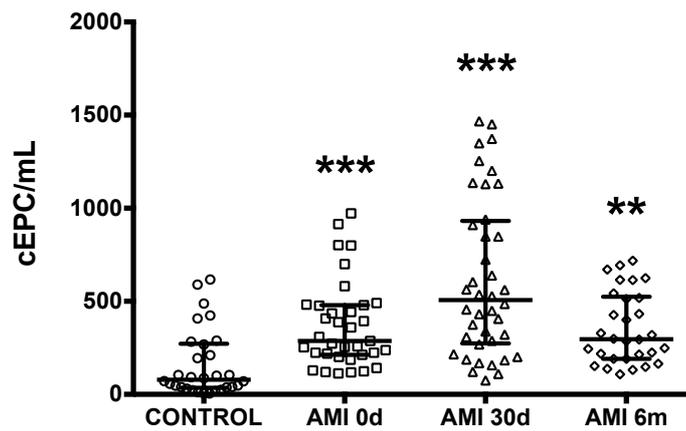


Figura 37. Recuento de CPE circulantes en sujetos sanos y en pacientes con IAM. Se determinó el número de CPE circulantes (células con fenotipo CD34+KDR+CD45-) por citometría de flujo en muestras de sangre periférica procedente de controles y pacientes con IAM a los 0 días (IAM 0d), a los 30 días (IAM 30d) y a los 6 meses (IAM 6m) tras el infarto. Los resultados se expresan como la mediana \pm IQR (**p < 0,01; ***p < 0,001 vs. control mediante el test de Kruskal-Wallis y el post-test de Dunn; n=30-45)

Por otro lado, el recuento de CEC en individuos sanos también demostró diferencias significativas con respecto al obtenido en los pacientes con infarto. El número de CEC en el día del infarto fue superior al de los sujetos control (182 ± 213 vs 58 ± 512 ; $p < 0,001$; Figura 38). Estos niveles de CEC en sangre periférica se mantuvieron sin cambios durante los 6 meses de seguimiento a diferencia de lo observado para los niveles de CPE circulantes.

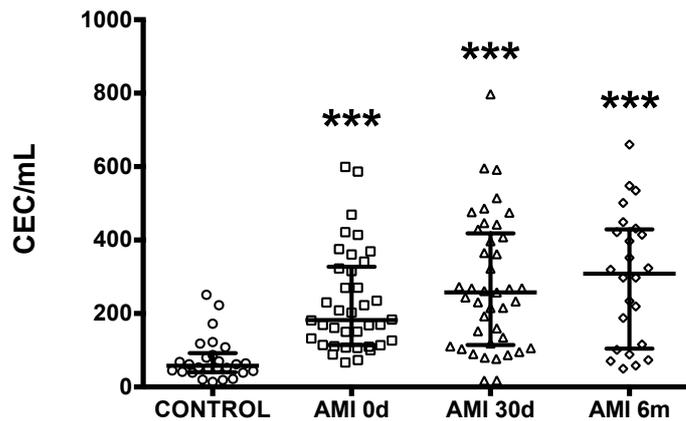


Figura 38. Recuento de CEC en sujetos sanos y en pacientes con IAM. Se determinó el número de CEC (células con fenotipo CD31+CD146+CD45-) por citometría de flujo en muestras de sangre procedentes de controles y pacientes con IAM a los 0 días (IAM 0d), a los 30 días (IAM 30d) y a los 6 meses (IAM 6m) tras el infarto. Los resultados se expresan como la mediana \pm IQR (**p < 0,001 vs. control mediante el test de Kruskal-Wallis y el post-test de Dunn; n=30-45)

5.2.2 Determinación de la capacidad funcional de las células progenitoras endoteliales en cultivo en el infarto agudo de miocardio

La determinación de la capacidad funcional se realizó en cultivos de CPE aisladas a partir de muestras de sangre periférica tanto de sujetos sanos como de pacientes con IAM. Esta parte del trabajo se realizó con un subconjunto de sujetos sanos (controles) (n=10) y pacientes con IAM (n=10). Los datos demográficos y clínicos basales para esta subpoblación de estudio se recogen en la Tabla 8. Los pacientes con IAM mostraron mayores valores de presión arterial, tanto sistólica como diastólica, comparado con los sujetos sanos. Los niveles de LDL y triglicéridos eran también mayores para los

pacientes con IAM que en los sujetos sanos. Sin embargo, los valores de colesterol HDL estaban reducidos en los pacientes con IAM ($p < 0,05$ vs. control). Estos datos indican que la subpoblación es representativa de la recogida en el estudio (Tabla 7).

Variable	CONTROL	AMI	P
Demographic data			
Men	7 (70)%	7 (70%)	-
Age (years)	50 \pm 8.6	48 \pm 11.2	-
Body mass index	25.3 \pm 1.3	28.4 \pm 5.5	0.125
Clinical data			
Systolic blood pressure (mmHg)	120.3 \pm 9.8	150.6 \pm 42.7	0.042
Diastolic blood pressure (mmHg)	75.6 \pm 5	94.6 \pm 26.2	0.032
Heart rate (bpm)	70.9 \pm 6.8	80.3 \pm 23.6	0.247
Total cholesterol (mg/dL)	177 \pm 24.5	204.3 \pm 29.5	0.161
LDL (mg/dL)	106.8 \pm 16.5	130.1 \pm 19.1	0.049
HLD (mg/dL)	56.9 \pm 5.1	42.9 \pm 11.8	0.007
Triglycerides	75.1 \pm 25.3	227.6 \pm 161.7	0.012
Diabetes	-	2 (20%)	-
Hypercholesterolemia	-	2 (20%)	-
Arterial hypertension	-	4 (40%)	-
Smoking	-	7 (70%)	-
Treatment			
Acetylsalicylic acid	-	10 (100%)	-
Clopidogrel	-	9 (90%)	-
ACEI/ARB	-	9 (90%)	-
Beta-blockers	-	8 (80%)	-
Statins	-	10 (100%)	-

Data expressed as n (%) or mean \pm SD

Tabla 8. Datos demográficos y clínicos de 10 sujetos sanos y 10 pacientes con IAM de los que se obtuvieron las muestras de sangre para el aislamiento y cultivo de CPE.

Siguiendo con el protocolo de cultivo establecido, se obtuvieron cultivos de CPE puros en los diferentes tiempos de evolución del IAM (caracterizados morfológica y fenotípicamente por citometría de flujo e inmunofluorescencia) sobre los cuales se realizó el estudio funcional.

5.2.2.1 Adhesión celular

Para estudiar las propiedades adhesivas de las CPE en el IAM y su posible modulación a lo largo de la evolución clínica, determinamos la capacidad de las CPE aisladas de muestras de sangre periférica a adherirse a una matriz extracelular de fibronectina. Observamos que el $23,1 \pm 2,6$ % de las CPE aisladas de sujetos sanos eran capaces de adherirse a la matriz de fibronectina (Figura 39). Este valor se incrementó hasta un $32,4 \pm 1,4$ % ($p < 0,05$ vs. control) en CPE de pacientes con IAM aisladas el mismo día del evento agudo. Además, este incremento en la capacidad de adhesión se mantenía durante al menos 30 días después del evento agudo ($35,5 \pm 4,0$ %; $p < 0,05$ vs. control). Sin embargo, la capacidad de adhesión se revirtió a valores encontrados en los controles en CPE aisladas en pacientes 6 meses después del infarto ($22,0 \pm 3,4$; $p < 0,05$ vs. IAM 0 d y IAM 30 d).

La adhesión de las CPE a los diferentes componentes de la matriz extracelular está mediada por integrinas. Por este motivo estudiamos el patrón de expresión de las integrinas $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 5$, αL , αV , $\beta 1$, $\beta 3$ y $\beta 4$ en CPE en el IAM y su evolución a lo largo del tiempo. La expresión de las integrinas $\alpha 2$, $\alpha 3$, αL , $\beta 1$, $\beta 3$ y $\beta 4$ mostraron niveles de expresión similares entre sujetos sanos y pacientes con IAM y se mantuvieron sin variación durante la evolución clínica del IAM.

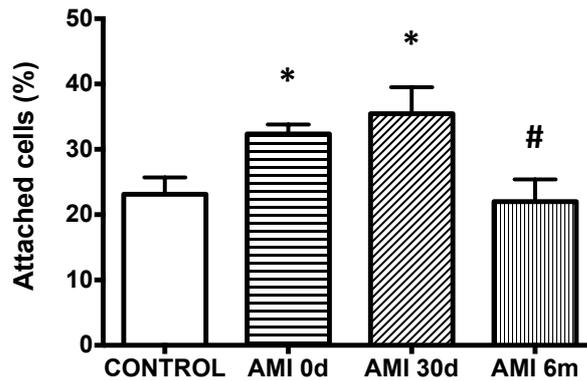


Figura 39. Adhesión celular de las CPE en el IAM. Propiedades adhesivas de las CPE sobre la matriz de fibronectina. CPE aisladas de muestras de sangre periférica se sembraron sobre una matriz de fibronectina y se incubaron durante 30 minutos. Después de la incubación se realizó el recuento las células adheridas a la matriz de fibronectina. Los resultados representan el porcentaje de células adheridas expresadas como media \pm SEM (n=6-8). *p<0,05 vs. control; # p <0,05 vs. IAM 0d y IAM 30d mediante ANOVA de una vía y el post-test Newman-Keuls para comparaciones múltiples.

Sin embargo, los niveles de expresión de las integrinas $\alpha 5$ and αV mostraron una fuerte tendencia al alza en CPE aisladas de pacientes con IAM el día del infarto (IAM 0d) (Figura 40A y B). Este aumento alcanzó la significación estadística 30 días después del infarto (IAM 30d) cuando los niveles de expresión para las integrinas $\alpha 5$ and αV habían aumentado $1,74 \pm 0,23$ y $1,45 \pm 0,11$ veces respectivamente, comparado con los niveles de expresión encontrados para las CPE aisladas de controles (p<0,05 vs. control). Los niveles de expresión de las integrinas $\alpha 5$ and αV en CPE aisladas de pacientes 6 meses después del infarto (IAM 6m) se restauraron a niveles similares a los encontrados en los controles (p<0,05 y p<0,01 respectivamente vs. control).

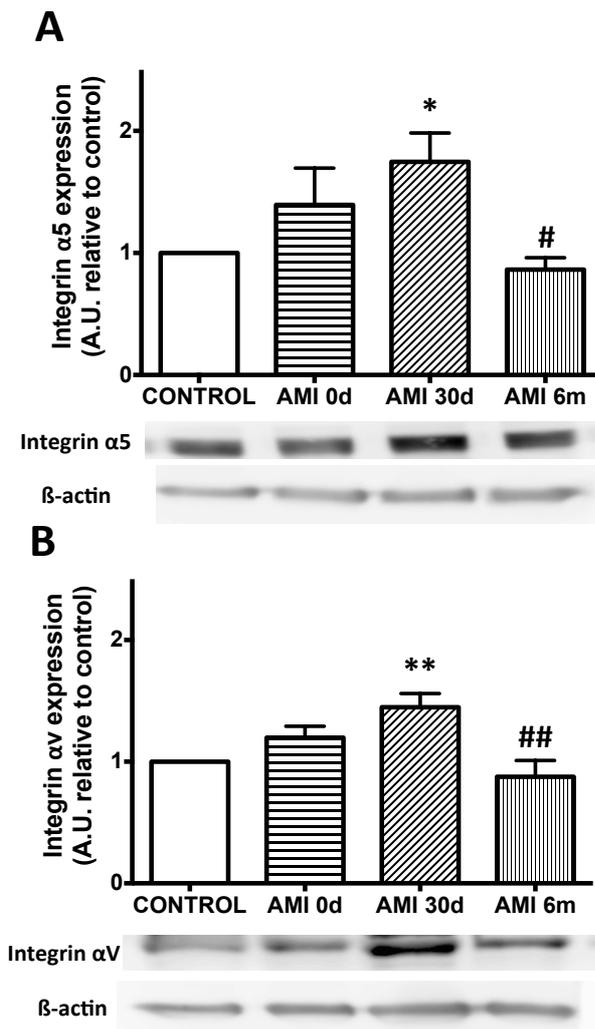


Figura 40. Niveles de expresión de las integrinas α5 y αV. La cuantificación de la expresión de las integrinas se realizó por Western Blot en cultivos de CPE aisladas de muestras de sangre periférica de sujetos sanos y de pacientes con IAM. Los niveles de expresión de las integrinas α5 (**A**) y αV (**B**) se presentan relativizados a los valores control, expresadas como media ± SEM (n=6) en unidades arbitrarias (A.U). *p<0.05 y **p<0.01 vs. control; #p<0.05 y ##p<0.01 vs. IAM 30d mediante ANOVA de una vía y el post-test Newman-Keuls para comparaciones múltiples.

5.2.2.2 Proliferación celular

La capacidad de proliferación de los cultivos de CPE se testó tras su estimulación con medio endotelial completo EGM-2 después de un periodo de ayuno. Los resultados obtenidos desvelaron una disminución en la capacidad proliferativa de las CPE aisladas de pacientes el día del infarto (IAM 0d) y 30 días después (IAM 30d) con respecto al grupo control ($p < 0,05$; Figura 41). Esta reducción en la capacidad proliferativa se revirtió completamente en CPE aisladas 6 meses después del infarto (IAM 6m) ($p < 0,05$ vs. IAM 0d e IAM 30d).

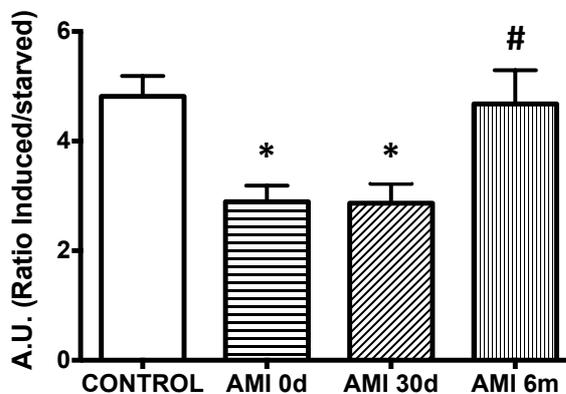


Figura 41. Proliferación celular de las CPE en el IAM. Proliferación inducida por los factores de crecimiento presente en el medio de cultivo EGM-2 en CPE aisladas de controles y pacientes con IAM a diferentes tiempos tras el infarto (IAM 0d, IAM 30d y IAM 6m). Los cultivos se sincronizaron en medio de ayuno durante 48 horas y después se estimularon con medio completo EGM-2 durante 18 horas. Tras estas incubaciones las células se recogieron y se tiñeron con yoduro de propidio para el análisis del ciclo celular mediante citometría de flujo. Los resultados representan el porcentaje de células en proliferación y se expresan como media \pm SEM ($n = 6-8$). * $p < 0.05$ vs. control; # $p < 0.05$ vs. IAM 0d y IAM 30d mediante ANOVA de vía y post-test para comparaciones múltiples de Newman-Keuls.

5.2.2.3 Curva de crecimiento celular

Para analizar la capacidad de crecimiento celular y su modificación en la evolución clínica del IAM, se sembraron cantidades idénticas de CPE de sujetos sanos y de pacientes con IAM obtenidas el mismo día del infarto, a los 30 días y 6 meses después del infarto.

Los cultivos de CPE aislados de sujetos sanos alcanzaron la fase de crecimiento estacionario a los 5 días del inicio del cultivo a una densidad de saturación de $6.0 \pm 1,1 \times 10^4$ cells/cm² (Figura 42). En cambio, para los cultivos de CPE aislados de muestras de sangre de pacientes con IAM el día del infarto, la fase de crecimiento estacionario se alcanzó a los 4 días de cultivo a una densidad de saturación de $3,6 \pm 0,5 \times 10^4$ cells/cm². Para las CPE aisladas 30 días después del infarto la fase de crecimiento estacionario se alcanzó a los 4 días de cultivo a una densidad de saturación de $1,9 \pm 0,5 \times 10^4$ cells/cm² ($p < 0,001$ vs. control). En CPE aisladas a los 6 meses del infarto la fase estacionaria se alcanzó a los 5 días a una densidad de saturación de $6.0 \pm 1,1 \times 10^4$ cells/cm² ($p < 0,01$ vs. IAM 0d y $p < 0,001$ vs. IAM 30d). Estos resultados indican que la capacidad de crecimiento de las CPE aisladas de muestras de sangre periférica está reducida en la fase inicial de la patología isquémica (IAM 0d y IAM 30d) con respecto a la que muestran las CPE aisladas de sujetos sanos y revierte a los 6 meses del infarto.

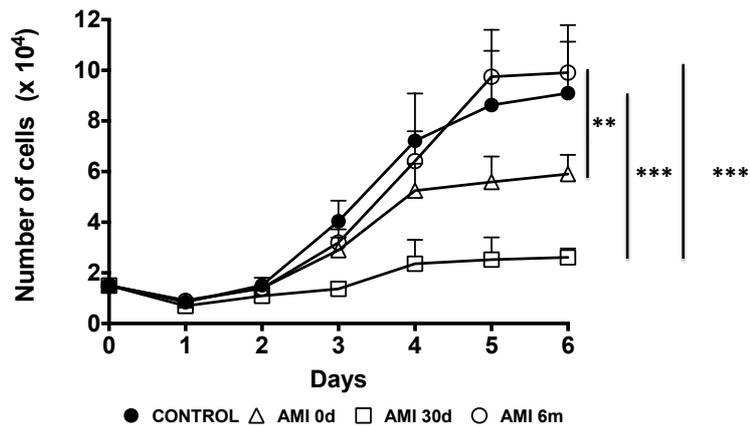


Figura 42. Curva de crecimiento de las CPE en el IAM. Cinética de crecimiento para CPE aisladas de sujetos sanos (controles) y de pacientes con IAM obtenidas el mismo día (IAM 0d), a los 30 días (IAM 30d) y 6 meses (IAM 6m) después del infarto. Se sembraron $1,5 \cdot 10^4$ células (día 0) en placas de cultivo de 24 pocillos y se determinó el número total de células/pocillo diariamente durante 6 días. Los resultados muestran los contajes totales de células para cada cultivo de los días 1 – 6. Los resultados se expresan como media \pm SEM (n =6-8). ***p < 0.001; **p < 0.01 mediante el test ANOVA de dos vías y el post-test de Bonferroni).

5.2.2.4 Capacidad vasculogénica

La capacidad vasculogénica *in vitro* de CPE en el IAM y su evolución en el tiempo se estudió midiendo la longitud total de las estructuras tubulares formadas por las CPE sobre una matriz de Matrigel (Figura 43A). Aunque no encontramos diferencias estadísticamente significativas en la longitud total de las estructuras tubulares entre controles ($563 \pm 45 \mu\text{m}$; Figura 43B) y etapas iniciales en la evolución del IAM (IAM 0d : $381 \pm 69 \mu\text{m}$; IAM 30d : $436 \pm 49 \mu\text{m}$), se observa morfológicamente una red menos establecida de contactos entre las células (Figura 43A). En

Resultados

cambio, en CPE aisladas 6 meses después del infarto (IAM 6m) observamos un incremento en la capacidad vasculogénica ($686 \pm 111 \mu\text{m}$; $p < 0,05$ vs. IAM 0d) y una morfología comparable a la obtenida para los cultivos control.

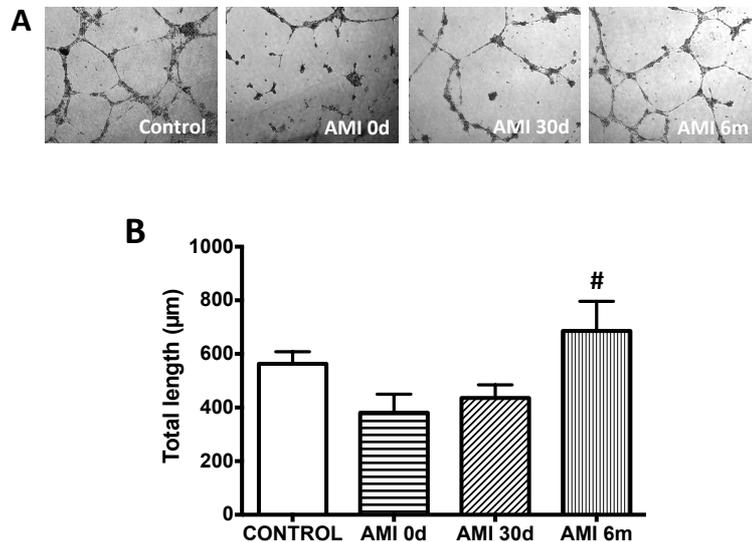


Figura 43. Capacidad vasculogénica *in vitro* de las CPE en el IAM. 1.5×10^5 CPE aisladas de controles y pacientes con IAM a diferentes tiempos tras el infarto se sembraron sobre una matriz de Matrigel y se incubaron durante 24 horas. (A) Imágenes representativas de las estructuras tubulares formadas sobre la matriz de Matrigel. (B) Cuantificación de la longitud total de las estructuras tubulares para cada condición experimental representada como media \pm SEM (n =6-8). # $p < 0.05$ vs. IAM 0d mediante ANOVA de una vía y el post-test Newman-Keuls para comparaciones múltiples.

En conjunto, los resultados indican una modulación de las capacidades funcionales de las CPE durante la evolución del IAM. Por un lado observamos una disminución en la capacidad de crecimiento, proliferación y vasculogénesis en CPE aisladas en las primeras etapas

de evolución clínica tras el infarto mientras que observamos un incremento de la capacidad adherente en CPE aisladas en estos mismos periodos. Estos hechos parecen indicar que tras el infarto, la principal actividad funcional de las CPE sería la adhesión. Sin embargo, 6 meses después del infarto, las principales actividades funcionales de las CPE son el crecimiento, la proliferación y la vasculogénesis y que además son similares a las encontradas para CPE aisladas de controles.

Por lo tanto, se produce una adaptación funcional de las CPE a lo largo de la evolución del IAM, comenzando con un aumento de la adhesión tras el evento isquémico que se prolonga durante un período de hasta 30 días. Una vez adheridas sobre la zona del endotelio dañada, las CPE adaptarían su función a las nuevas condiciones y aumentarían su capacidad de crecimiento, de proliferación y vasculogénica con la finalidad de restablecer la integridad endotelial comprometida por el proceso isquémico.

5.3 Modificación de la función de las células progenitoras endoteliales en cultivo por exposición a micropartículas Sonic Hedgehog

Las MP^{Shh+} han mostrado tener un efecto beneficioso sobre el sistema cardiovascular, como la inducción de la producción de NO por parte de CE en el modelo animal, la inducción de la angiogénesis en HUVEC en cultivo así como incrementar la expresión de diferentes factores proangiogénicos.

Por esta razón, testamos el efecto de las MP^{Shh+} sobre la biología de CPE en cultivo. Los cultivos de CPE se obtuvieron a partir de muestras de sangre periférica de sujetos sanos (n=5). Las MP^{Shh+} se produjeron a partir de la línea celular CEM sometida a un tratamiento específico para que contuvieran el morfogen Shh. A continuación, los cultivos de CPE se trataron con las MP^{Shh+} y MP^{Shh-} y se analizaron dos de los parámetros que mejor definen la función endotelial, la producción de NO y la vasculogénesis.

La producción de las MP y parte de los experimentos de este apartado se realizaron en el laboratorio *Stress oxydant et pathologies métaboliques* (UMR 1063) de Angers (Francia), bajo la supervisión de la Dra. M^ª Carmen Martínez, durante la estancia predoctoral del doctorando.

5.3.1 Interacción de las micropartículas Sonic Hedgehog con las células progenitoras endoteliales

La determinación de los mecanismos de interacción entre CPE y MP^{Shh+} se realizó mediante el tratamiento de cultivos de CPE confluentes con MP^{Shh+} marcadas con PKH67 a diferentes tiempos (30 minutos, 2 horas y 24 horas) a 37°C. Como control negativo de la internalización parte de los cultivos sometidos a los mismos tratamientos se incubaron a durante los mismos periodos a 4°C. Al finalizar los tiempos de incubación las células se observaron a través de un microscopio invertido de fluorescencia.

A las 24 horas de incubación a 37°C, las MP^{Shh+} marcadas con PKH67 se encontraban en el interior de todas las CPE analizadas. A tiempos de incubación menores, 30 minutos y 2 horas, no se observaron MP^{Shh+} marcadas en el interior de las CPE (Figura 44A-D). En un estudio más detallado del fenómeno de internalización, el citoesqueleto y los núcleos de las CPE se tiñeron con Rhodamina y DAPI respectivamente y se observaron con un microscopio confocal. En CPE tratadas con MP^{Shh+} teñidas con PKH67 durante 24 horas observamos como todas ellas presentan MP^{Shh+} teñidas en su interior (Figura 44E; plano XY). Además, en planos ortogonales obtenidos por microscopia confocal pudimos observar MP teñidas a lo largo de todo el grosor de la monocapa endotelial (Figura 44F; plano YZ) confirmando su localización citoplasmática, a la misma altura del núcleo celular.

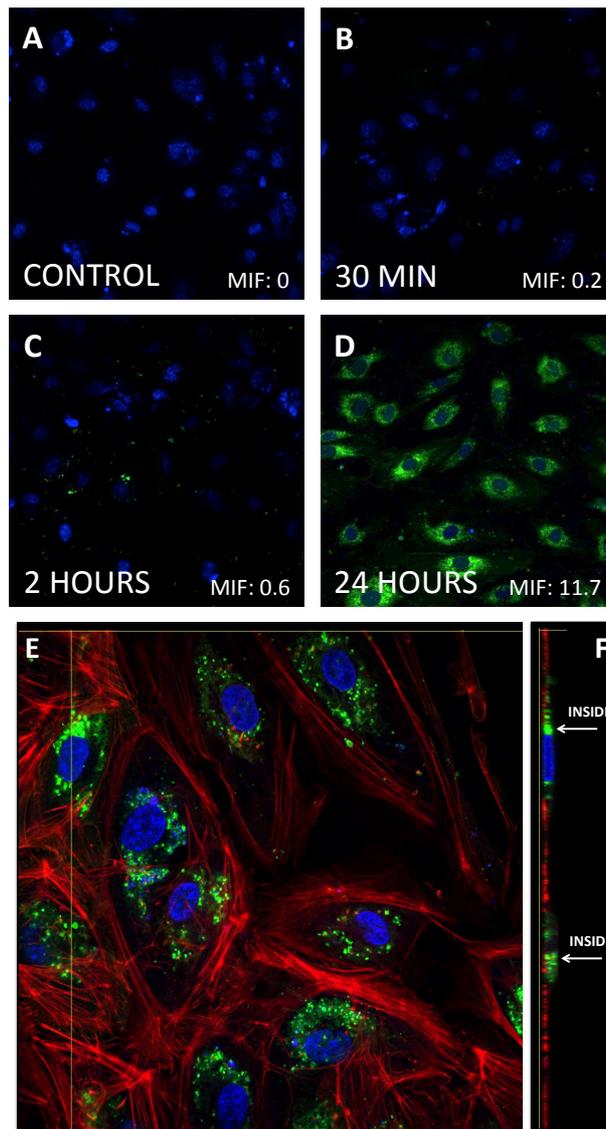


Figura 44. Internalización de las MP en CPE. Cultivos confluentes de CPE se incubaron con 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de $\text{MP}^{\text{Shh}+}$ marcadas con PKH67 (verde) durante 30 minutos, 2 y 24 horas. El citoesqueleto de actina se tiñó con rodamina (rojo) y los núcleos con DAPI (azul). **(A-D)** Imágenes de fluorescencia de CPE tratadas con $\text{MP}^{\text{Shh}+}$ marcadas con PKH67 capturadas con el microscopio invertido de fluorescencia Nikon Eclipse-Ti, objetivo 10X (magnificación total 100X). **(E)** Imágenes de fluorescencia capturadas con el microscopio confocal LMS 700, (objetivo 63X; magnificación total 630X; Plano XY). **(F)** Sección ortogonal (plano YZ). (MIF= intensidad media de fluorescencia). Las imágenes son representativas de 5 experimentos independientes.

5.3.2 Efecto de las micropartículas Sonic Hedgehog en la expresión génica de las células progenitoras endoteliales

La ruta de señalización Hedgehog esta mediada por dos proteínas transmembrana, PTCH1 y SMO (Marigo et al., 1996; Marrachelli et al., 2013). En ausencia del ligando Shh, el receptor PTCH1 inhibe la actividad de SMO. En presencia de Shh, el efecto inhibitorio de PTCH1 sobre SMO desaparece y SMO inicia una ruta de señalización que resulta en la activación de la señalización Hedgehog y aumento de la expresión del factor de transcripción GLI1 (Riobo and Manning, 2007). Además, se ha demostrado recientemente que la activación de esta ruta en CE tiene efectos beneficiosos en el sistema cardiovascular, especialmente en lo que se refiere a procesos angiogénicos y tubulogénicos (Benameur et al., 2010a; Marrachelli et al., 2013; Soleti et al., 2009).

Inicialmente se determinaron los niveles basales de expresión génica por RT-qPCR de los principales componentes de las ruta de señalización de Shh. Los resultados mostraron que los genes *PTCH1*, *SMO*, *GLI1* son expresados basalmente en las CPE (control). Cuando las CPE se trataron durante 24 horas con 10 µg/mL de MP^{Shh+}, la expresión de los genes *PTCH1*, *SMO*, *GLI1* aumentó significativamente en $1,64 \pm 0,05$, $1,46 \pm 0,14$ y $2,57 \pm 0,06$ veces respectivamente (Figura 45). Cuando las CPE se trataron con 10 µg/mL de MP^{Shh-} no se observó ninguna modificación en la expresión de estos genes comparada con CPE no tratadas, lo que implica que

Resultados

el efecto observado se debe únicamente al morfogen Shh y no a la presencia de las MP.

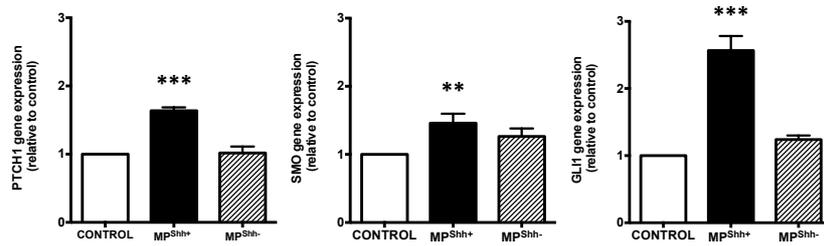


Figura 45. Efecto de las MP en la expresión génica de los componentes de la ruta de señalización Hedgehog en CPE. Las CPE se trataron con 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ MP^{Shh+} o 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ MP^{Shh-} durante 24 horas y se analizó la expresión de los genes *PTCH1*, *SMO*, *GLI1* por RT-qPCR. Los resultados se expresaron como media \pm SEM (n=3-5). **p<0,01; ***p<0,001 vs. control, mediante ANOVA de una vía y el post-test Newman-Keuls para comparaciones múltiples.

El tratamiento de CPE con MP^{Shh+} también aumentó significativamente la expresión de otros genes de interés cardiovascular como *NOS3*, *VEGFA*, *KDR* y *KLF2* en $2,94 \pm 0,91$, $1,53 \pm 0,17$, $1,54 \pm 0,11$, $1,76 \pm 0,18$ veces respectivamente (Figura 46). De nuevo, el tratamiento con MP^{Shh-} no tuvo efecto alguno en la expresión de estos genes.

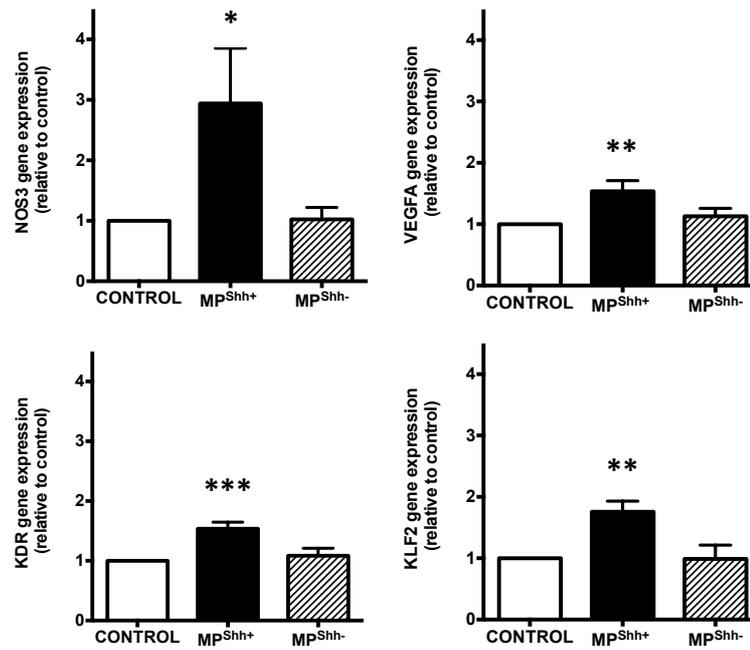


Figura 46. Efecto de las MP en la expresión de genes de interés cardiovascular en CPE. Las CPE se trataron con 10 µg/mL MP^{Shh+} o 10 µg/mL MP^{Shh-} durante 24 horas y se analizó la expresión de los genes *NOS3*, *VEGFA*, *KDR* and *KLF2* por RT-qPCR. Los resultados se expresaron como media ± SEM (n=3-5). *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001 vs. control, mediante ANOVA de una vía y el post-test Newman-Keuls para comparaciones múltiples.

5.3.3 Efecto de las micropartículas Sonic Hedgehog sobre la función de las células progenitoras endoteliales

Una vez demostrado que las MP pueden interactuar con las CPE e inducir un aumento en la expresión de genes de interés cardiovascular quisimos determinar su efecto sobre la función celular. Para ello se analizó la capacidad vasculogénica y la capacidad de producir NO mediante el uso de inhibidores

específicos los mecanismos moleculares de la ruta de señalización Shh implicados en estas funciones celulares.

5.3.3.1 Efecto de las micropartículas Sonic Hedgehog en la capacidad vasculogénica *in vitro* de las células progenitoras endoteliales

Como hemos visto durante la caracterización funcional de las CPE, en ausencia de tratamiento estas células fueron capaces de organizarse en estructuras tubulares cuando se sembraron sobre la matriz de Matrigel (Figura 47A). El tratamiento con 10 µg/mL MP^{Shh-} no afectó a la capacidad vasculogénica de las CPE. Sin embargo, cuando las CPE se trataron con 10 µg/mL de MP^{Shh+} la longitud total de las estructuras tubulares aumento $1,85 \pm 0,16$ veces (***) $p < 0,001$ vs. control; Figura 47B), observándose también una mejora en la organización de las estructuras tubulares (Figura 47A).

Para elucidar los mecanismos subyacentes al aumento de la capacidad vasculogénica de las CPE tratadas con MP^{Shh+} utilizamos dos inhibidores, la ciclopamina (15 µM; inhibidor selectivo del efector de la ruta de señalización de Shh, SMO) y el LY294002 (10 µM; inhibidor selectivo de la actividad PI3K). Comparado con las CPE tratadas únicamente con MP^{Shh+}, la longitud total de las estructuras tubulares para CPE tratadas con ciclopamina o LY294002 se redujo a valores controles. La

ciclopamina y el LY294002 por sí mismas no tuvieron efecto alguno en la capacidad vasculogénica de las CPE.

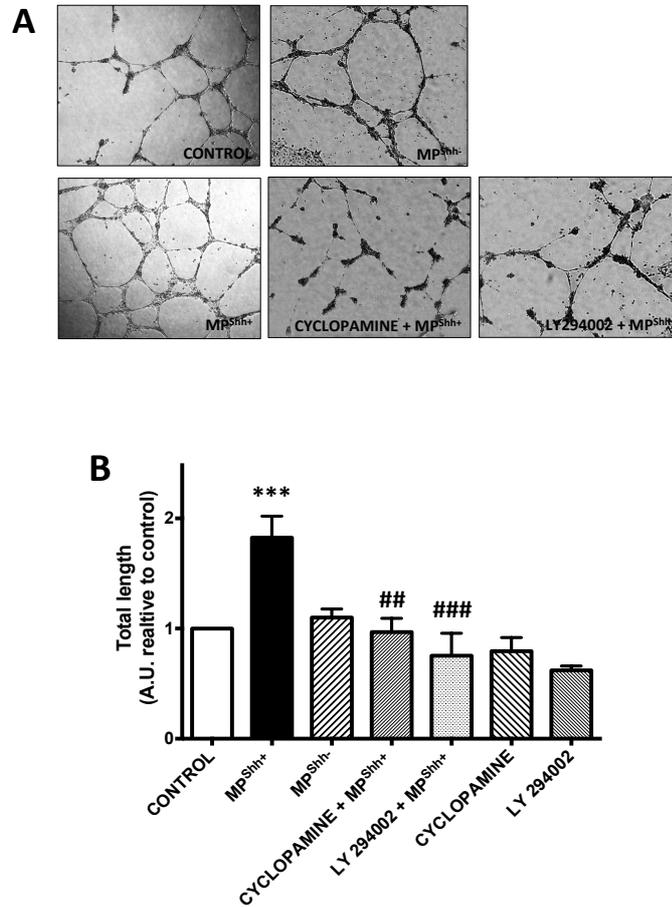


Figura 47. Efecto de las MP en la capacidad vasculogénica *in vitro* de CPE. Las CPE se trataron con 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ $\text{MP}^{\text{Shh}+}$ o 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ $\text{MP}^{\text{Shh}-}$ durante 24 horas, preincubadas o no con 15 μM ciclopamina o 10 μM LY294002 sobre una matriz de Matrigel. **(A)** Imágenes representativas de 5 experimentos independientes de las estructuras tubulares formadas sobre la matriz del Matrigel. **(B)** Cuantificación de la longitud total de las estructuras tubulares expresadas en unidades arbitrarias como media \pm SEM relativa a los valores control ($n=5$). *** $p<0,001$ vs. control; ## $p<0,01$; ### $p<0,001$ vs. $\text{MP}^{\text{Shh}+}$, mediante ANOVA de una vía y el post-test Newman-Keuls para comparaciones múltiples.

En conjunto, los resultados indican que en CPE el incremento de la capacidad vasculogénica inducida por el tratamiento con MP^{Shh+} está mediado por la activación de la ruta de señalización Hedgehog a través del receptor SMO y mediada por la PI3K.

5.3.3.2 Efecto de las micropartículas Sonic Hedgehog en la capacidad vasculogénica *in vivo* de las células progenitoras endoteliales

Para analizar el efecto *in vivo* de las MP^{Shh+} en la capacidad de la CPE para formar nuevos vasos sanguíneos se realizaron experimentos en ratón mediante la técnica “*Matrigel Plug Assay*”. Para ello, cultivos confluentes de CPE se incubaron o no con MP^{Shh+} durante 24 horas. Tras el periodo de incubación las células se recogieron y se prepararon los implantes de Matrigel que se inyectaron subcutáneamente en la zona dorsal de ratones nude RjOrl:NMRI-Foxn1^{nu}/Foxn1^{nu}. A los 7 días, los implantes se retiraron y se analizó el contenido total de hemoglobina por implante.

Cuando se retiraron los implantes de Matrigel se observó una mayor coloración roja, indicativo de un mayor número de vasos sanguíneos, en los implantes que contenían CPE pretratadas con MP^{Shh+} durante 24 horas (Figura 48A). Estos resultados fueron confirmados con la determinación del contenido total de hemoglobina en cada implante. La figura 48B muestra como el tratamiento con MP^{Shh+} incrementó en $2,54 \pm 0,39$ veces la

cantidad de hemoglobina presente en el interior del implante (**p<0,01 vs. control).

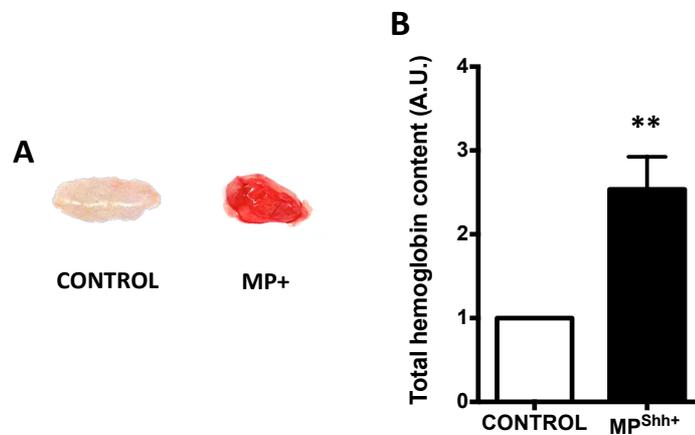


Figura 48. Efecto de las MP en la capacidad vasculogénica *in vivo* de CPE. Las CPE se trataron con o sin 10 µg/mL MP^{Shh+} durante 24 horas. Tras el tratamiento, las CPE se recuperaron y se incluyeron en los implantes de Matrigel que finalmente se trasplantaron subcutáneamente en ratones nude **(A)** Imágenes representativas de los implantes de Matrigel tras su extracción. **(B)** Contenido de hemoglobina total por implante expresado en unidades arbitrarias relativas a los valores control como media ± SEM (n=5). **p<0,01 vs. control mediante el test t-Student.

5.3.3.3 Efecto de las micropartículas Sonic Hedgehog en la capacidad de producción de NO de las células progenitoras endoteliales

A continuación estudiamos la producción de NO en CPE tratadas con MP^{Shh+} y para profundizar en los mecanismos implicados en este proceso las CPE se incubaron en presencia de MP^{Shh+} (10 µg/mL) pretratadas o no con los inhibidores ciclopamina (15 µM) y LY294002 (10 µM) durante 1 hora. El

Resultados

tratamiento de las CPE MP^{Shh+} incrementó la producción de NO en $2,12 \pm 0,16$ veces ($p < 0,001$ vs. control; Figura 49A). Cuando las CPE fueron pretratadas con los inhibidores ciclopamina y LY294002, el incremento en la producción de NO mediada por MP^{Shh+} fue completamente abolido ($p < 0,001$ vs. MP^{Shh+}; Figura 49B) restaurando los valores de producción de NO a los encontrados en células no tratadas. Las CPE tratadas con MP^{Shh-}, con ciclopamina o LY294002 mostraron niveles de producción de NO similares a los encontrados para CPE no tratadas, descartando un efecto sobre el incremento de producción NO.

Asimismo estudiamos la expresión de los enzimas encargados de regular la producción NO en CE. El tratamiento con MP^{Shh+} no tuvo ningún efecto en la expresión proteica del enzima AKT ni tampoco en la fosforilación en su sitio activador Ser 473 (Figuras 50A y B).

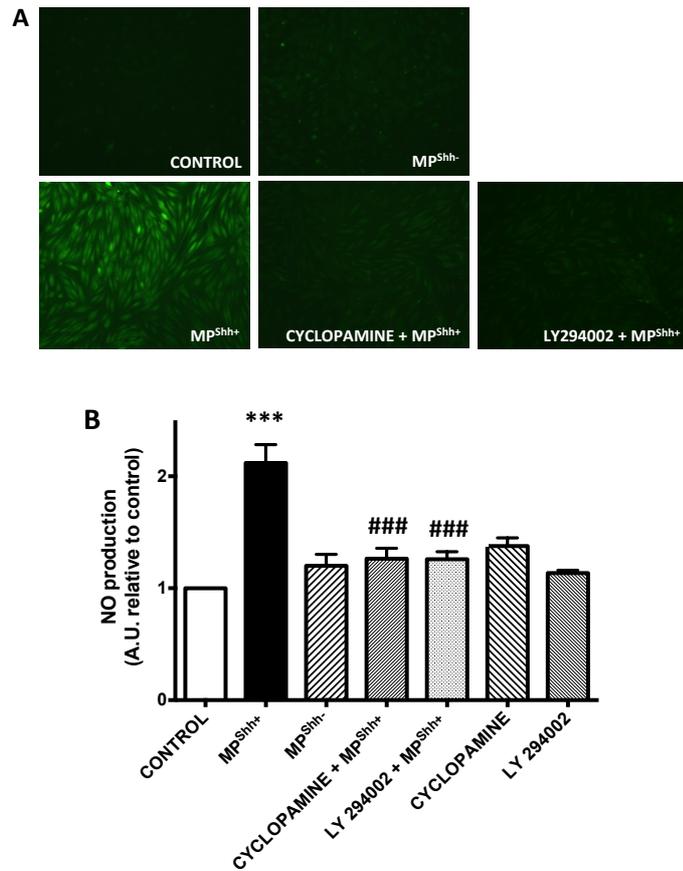


Figura 49. Efecto de las MP en la producción de NO en CPE. Las CPE se trataron con 10 $\mu\text{g/mL}$ $\text{MP}^{\text{Shh}+}$ o 10 $\mu\text{g/mL}$ $\text{MP}^{\text{Shh}-}$ durante 24 horas, preincubadas o no con ciclopamina 15 μM o LY294002 10 μM . Transcurrido este tiempo se añadió la sonda fluorescente DAF-FM diacetato para la determinación de la producción de NO. **(A)** Imágenes representativas obtenidas por microscopía de fluorescencia. **(B)** Cuantificación de la producción de NO medida como intensidad media de fluorescencia por campo ($n=5-8$). Los datos como media \pm SEM ($n=5$). *** $p<0,001$ vs. control; ### $p<0,001$ vs. $\text{MP}^{\text{Shh}+}$, mediante ANOVA de una vía y el post-test Newman-Keuls para comparaciones múltiples.

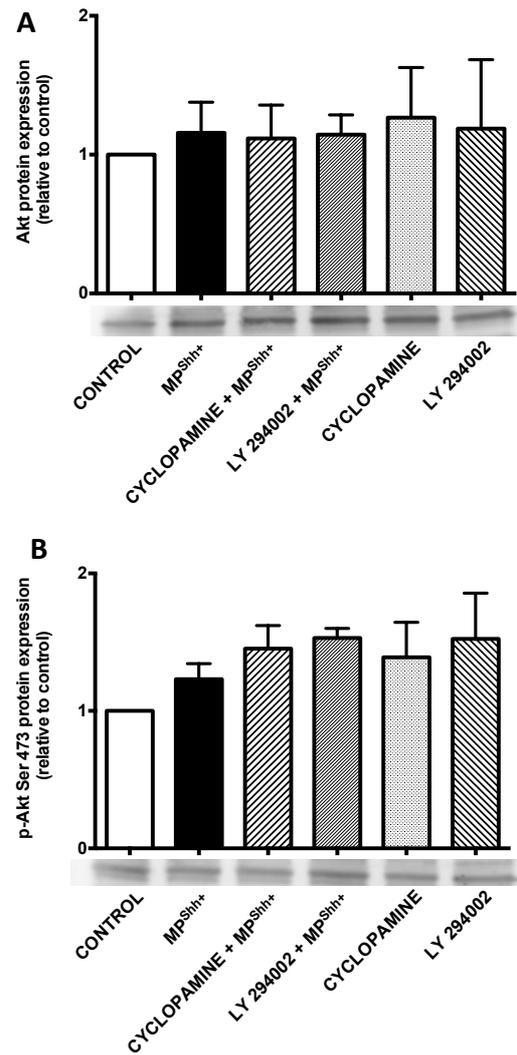


Figura 50. Efecto de las MP en la expresión proteica y fosforilación de la Akt. Las CPE se trataron con 10 µg/mL MP^{Shh+} o 10 µg/mL MP^{Shh-} durante 24 horas, preincubadas o no con ciclopamina 15µM o LY294002 10 µM. La cuantificación de la expresión proteica de Akt (A) y su fosforilación en el sitio activador (Ser 473) se determinó por Western Blot. Los datos están expresados como media ± SEM. (n=5)

Sin embargo, el tratamiento de las CPE con MP^{Shh+} aumentó la expresión proteica del enzima eNOS así como la fosforilación en su sitio activador (Ser 1177) en $1,79 \pm 0,29$ y $2,10 \pm 0,42$ veces respectivamente (Figuras 51A y B). De nuevo, la presencia de los inhibidores ciclopamina y LY294002 revirtió por completo el efecto de las MP^{Shh+} , devolviendo los niveles de producción de NO a valores similares a los observados en CPE no tratadas ($p < 0,05$ vs. MP^{Shh+}). El tratamiento con MP^{Shh+} no tuvo ningún efecto en la fosforilación de la eNOS en el sitio inhibidor (Thr 495) (Figura 51C). Cuando los inhibidores ciclopamina y LY294002 se utilizaron solos, éstos no ejercieron ningún efecto en la expresión o fosforilación del enzima eNOS.

Resultados

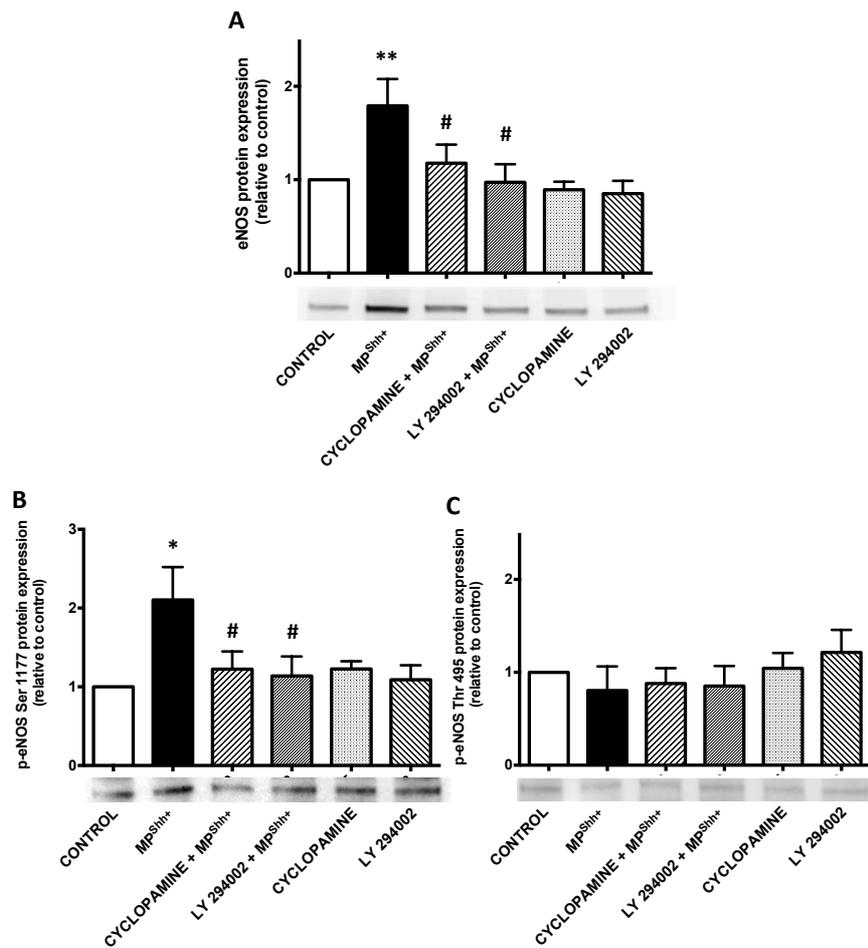


Figura 51. Efecto de las MP en la expresión proteica y fosforilación de la eNOS. Las CPE se trataron con 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ MP^{Shh+} o 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ MP^{Shh-} durante 24 horas, preincubadas o no con ciclopamina 15 μM o LY294002 10 μM . La de la expresión proteica de la eNOS (**A**), la fosforilación de su sitio activador (Ser 1177) (**B**) e inhibidor (Thr 495) (**C**) se determinó por Western Blot. Los datos están expresados en unidades arbitrarias (A.U) relativas a los valores control como media \pm SEM (n=5). *p<0,05; **p<0,01 vs. control; #p<0,05 vs. MP^{Shh+}, mediante ANOVA de una vía y el post-test Newman-Keuls para comparaciones múltiples.

Los resultados obtenidos para la producción de NO indican que las CPE tratadas con MP^{Shh+} durante 24 horas incrementan la producción de NO a través de la activación de la ruta de señalización Hedgehog, específicamente, a través de la activación del receptor SMO y de la quinasa PI3K. Además, el tratamiento con MP^{Shh+} supone un incremento de la expresión y la fosforilación en el sitio activador Ser 1177 de la eNOS. Los efectos observados en la regulación de la eNOS están también mediados por los componentes SMO y PI3K de la ruta de señalización Hedgehog.

Con la finalidad de investigar la posible relación de dependencia entre la producción de NO y la formación de estructuras tubulares sobre la matriz de Matrigel en CPE tratadas con MP^{Shh+} utilizamos el inhibidor de la actividad óxido nítrico sintasa, L-NAME (100 μ M).

Las CPE fueron sembradas en una matriz de Matrigel, preincubadas o no con L-NAME 100 μ M y tratadas con MP^{Shh+} durante 24 horas (Figura 52A). Tras este período se analizó la formación de estructuras tubulares sobre la matriz de Matrigel. Los resultados mostraron que la inhibición de la eNOS con L-NAME 100 μ M no tuvo ningún efecto en la capacidad vasculogénica mediada por las MP^{Shh+}, ya que los valores de la longitud total de las estructuras tubulares era similar a la encontrada para los cultivos de CPE tratadas únicamente con

Resultados

MP^{Shh+} ($1,83 \pm 0,06$ para MP^{Shh+} y $1,74 \pm 0,13$ para L-NAME + MP^{Shh+}, $p < 0,001$ vs. control; Figura 52B).

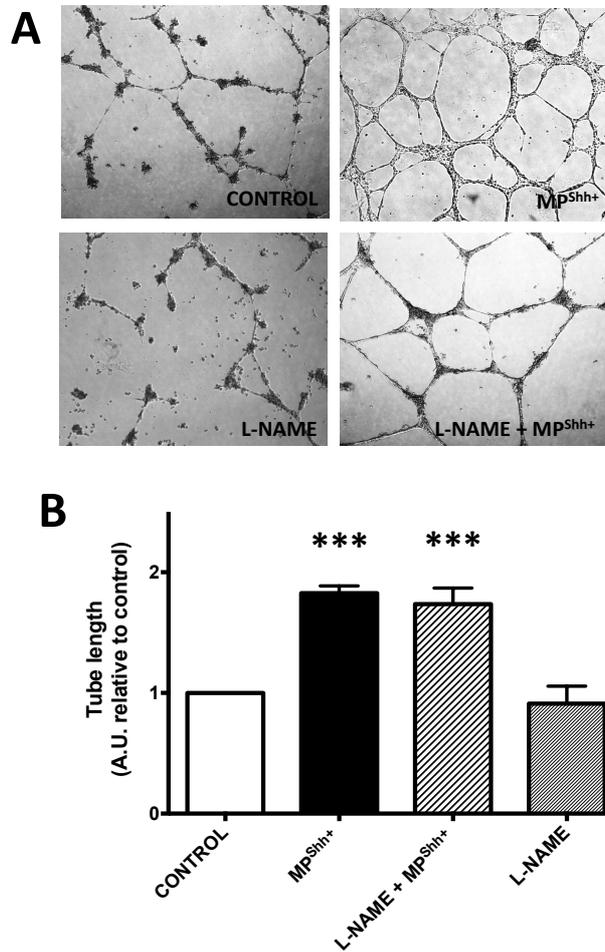


Figura 52. Relación entre la capacidad vasculogénica *in vitro* y producción de NO en CPE tratadas con MP. Las CPE se trataron con 10 $\mu\text{g/mL}$ MP^{Shh+} durante 24 horas, preincubadas o no con L-NAME (100 μM) sobre una matriz de Matrigel. **(A)** Imágenes representativas de las estructuras tubulares formadas sobre la matriz de Matrigel. **(B)** Cuantificación de la longitud total de las estructuras tubulares expresados como media \pm SEM ($n=3$). *** $p < 0,001$ vs. control, mediante ANOVA de una vía y el post-test Newman-Keuls para comparaciones múltiples.

Los resultados demuestran que en CPE tratadas durante 24 horas con MP^{Shh+} la capacidad vasculogénica no depende de la producción de NO.

5.3.4 Efecto de las micropartículas Sonic Hedgehog en la reorganización del citoesqueleto de actina en células progenitoras endoteliales

Los cultivos de CPE tratadas con MP^{Shh+} durante 24 horas modificaron su morfología (Figura 53A), adquiriendo una organización más elongada, similar a la que presentan las CE *in vivo* y las CE en cultivo sometidas a flujo laminar.

Para comprobar estos cambios estudiamos la reorganización del citoesqueleto de actina en CPE sometidas a diferentes tratamientos. El tratamiento con MP^{Shh+}, pero no con MP^{Shh-}, era capaz de inducir la reorganización de las fibras de actina. La preincubación con los inhibidores ciclopamina y LY294002 no afectaron a la reorganización de las fibras de actina inducido por el tratamiento con MP^{Shh+}. Únicamente la preincubación con el inhibidor de la ROCK, el Y27362, pudo abolir completamente el efecto de las MP^{Shh+} en el remodelado del citoesqueleto de actina (Figura 53B).

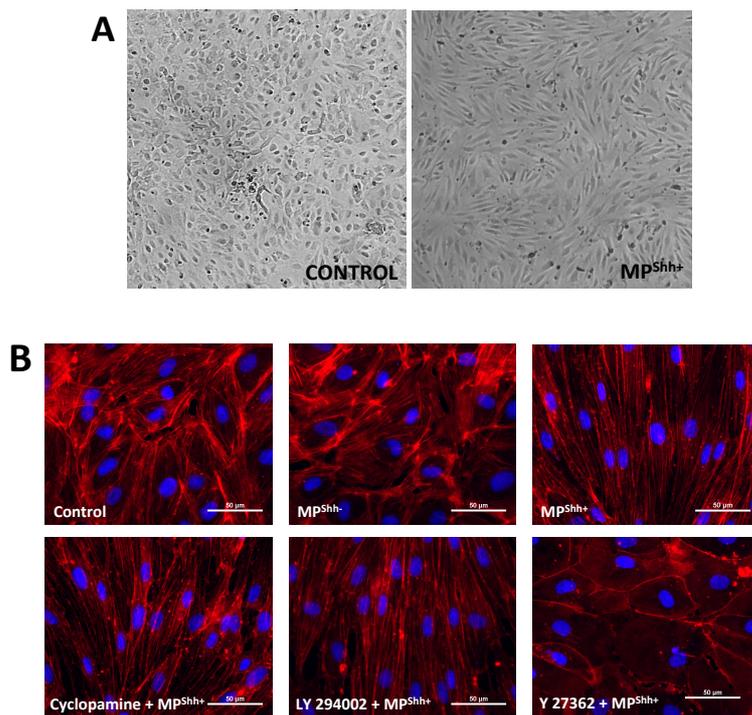


Figura 53. Reorganización del citoesqueleto de actina en CPE. Las CPE se trataron con 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ $\text{MP}^{\text{Shh}+}$ o $\text{MP}^{\text{Shh}-}$, pretatadas o no con ciclopamina 15 μM , LY 294002 10 μM o Y 27362 50 μM . El citoesqueleto de actina se tiñó con rodamina faloidina (rojo) y los núcleos con DAPI (azul). Se obtuvieron imágenes de tres campos aleatorios por condición experimental testada con el microscopio de fluorescencia invertido Nikon Eclipse-Ti, objetivo 40X (magnificación total 400X) (n=5).

Los resultados indican que la reorganización de citoesqueleto de actina en CPE tratadas con $\text{MP}^{\text{Shh}+}$ durante 24 horas es independiente de la ruta de señalización Hedgehog iniciada por el receptor Smo. Al mismo tiempo, la activación de la quinasa ROCK ocurriría a través de un mecanismo independiente de la quinasa PI3K.

Estos resultados indican que las MP^{Shh+} ejercen un efecto beneficioso sobre CPE humanas en cultivo aisladas a partir de muestras de sangre periférica. Concretamente, todas las CPE en cultivo mostraron MP^{Shh+} en el interior citoplasmático a las 24 horas de haber iniciado el tratamiento. A parte de ser internalizadas, las MP^{Shh+} inducen la expresión génica de los principales miembros de la ruta de señalización Hedgehog *PTCH1*, *SMO* y *GLI1* y de genes de interés cardiovascular como *ENOS*, *VEGFA*, *KDR* y *KLF2*. Todo ello indica que las MP^{Shh+} pueden ser internalizadas por CPE en cultivo y funcionar como vectores de información biológica. Además, a nivel funcional las MP^{Shh+} aumentan la producción de NO en CPE en cultivo mediado por dos miembros de la ruta de señalización Hedgehog no canónica, SMO y PI3k. De la misma manera, las MP^{Shh+} incrementan la capacidad vasculogénica *in vivo* e *in vitro* de las CPE en cultivo a través de mecanismos dependientes de SMO y PI3K. Los resultados demuestran que a nivel funcional, las MP^{Shh+} intensifican la capacidad de producción de NO y vasculogénica. De esta manera, las MP^{Shh+} podrían ser utilizadas como una herramienta terapéutica en patologías donde las CPE tienen afectadas las capacidades de producción de NO y vasculogénica.

6 Discusión

Esta tesis ha sido estructurada en tres partes diferentes. En la primera parte se centró en el desarrollo de un protocolo optimizado que recogiera las condiciones más adecuadas para el aislamiento y cultivo de las CPE a partir de muestras de sangre periférica. En la segunda parte se analizó el comportamiento funcional de estas CPE en cultivo procedentes de sujetos sanos y pacientes con IAM y su evolución clínica durante un período de 6 meses. En la tercera parte se estudió el efecto de las MP portadoras del morfogen Shh sobre la función de las CPE humanas en cultivo. Por ello, la discusión ha sido estructurada en estos tres bloques principales. Parte de los resultados presentados han sido publicados en forma de artículos científicos y aparecen recogidos en el Anexo de esta tesis.

6.1 Aislamiento y cultivo de células progenitoras endoteliales

El conocimiento de la biología de las CPE representa un avance en el entendimiento de los mecanismos de reparación vascular tanto en situaciones fisiológicas como patológicas. Además, el hecho de ser capaces de aislar y cultivar CPE de forma satisfactoria nos acerca cada vez más a la utilización de este tipo celular en terapias regenerativas (Khakoo and Finkel, 2005).

Los estudios dirigidos a la determinación de la función biológica de las CPE en diferentes contextos experimentales requiere del aislamiento y expansión *in vitro* de las mismas. Hasta el momento, las CPE de humanos se han obtenido a partir de la fracción de CMN de muestras de sangre periférica (Asahara et al., 1997; Ingram et al., 2004; van Beem et al., 2009) y de cordón umbilical (Ingram et al., 2004; van Beem et al., 2009) y a partir de muestras de médula ósea (Lin et al., 2000).

De estas tres fuentes posibles de CPE, las muestras de sangre periférica son las que más ventajas ofrecen. En primer lugar, la toma de muestras de sangre es un procedimiento sencillo y realizado de forma rutinaria en la práctica clínica. Además, si las CPE estuvieran destinadas a realizar algún tipo de terapia celular, el aislamiento a partir de muestras de sangre del mismo paciente (trasplante autólogo) eliminaría el rechazo por inmunocompatibilidad que podría encontrarse en CPE de procedentes de otro individuo.

Sin embargo, las CPE representan tan sólo un pequeño porcentaje, el 0,0001%, del total de las CMN presentes en muestras sanguíneas (Ingram et al., 2005a). Por este motivo, el desarrollo de un protocolo de cultivo con las condiciones óptimas es indispensable para la obtención de CPE a partir de muestras de sangre periférica.

Otro problema añadido hasta la fecha es la falta de un procedimiento estándar para el aislamiento y cultivo de las CPE. Diferentes condiciones de cultivo dan lugar a diferentes tipos celulares, a veces, con propiedades y funciones muy diferentes [107]. Un ejemplo de ello es la gran diferencia en morfología, fenotipo y comportamiento entre las llamadas CPE tempranas y las CPE tardías, donde la principal diferencia en las condiciones de aislamiento y cultivo es el tiempo [38]. Debido a la complejidad y la falta de consenso de los protocolos utilizados para el aislamiento y cultivo, la comparación de resultados obtenidos en diferentes trabajos es difícil. De ahí la importancia en desarrollar estudios que estandaricen las condiciones de aislamiento y cultivo de CPE.

Además de estar poco estandarizados, los protocolos para el aislamiento y cultivo de CPE a partir de muestras de sangre periférica presentan muy bajo porcentaje de éxito, situándose en alguno de ellos en tan sólo el 13% de las muestras procesadas (Campioni et al., 2013).

Tanto la falta de estandarización como el bajo porcentaje de éxito de los protocolos existentes suponían un impedimento para la

Discusión

realización de parte de los objetivos de este trabajo, específicamente, la obtención de cultivos de CPE de un mismo paciente a lo largo de 6 meses de evolución clínica. Por este motivo decidimos desarrollar un protocolo adecuado que nos permitiera superar todos estos inconvenientes.

6.1.1 Condiciones de aislamiento y cultivo para las células progenitoras endoteliales

Al trabajar con muestras biológicas de origen humano con fines analíticos y/o experimentales hay que tener en cuenta una serie de factores que pueden afectar a la estabilidad de las mismas. En el caso de muestras de sangre, los factores principales a tener en cuenta son el anticoagulante utilizado en la extracción de las muestras de sangre, la presencia de estabilizadores y el tiempo que transcurre desde la extracción de la muestra de sangre hasta su procesado (Holland et al., 2003).

En la práctica clínica se utilizan diferentes anticoagulantes para la obtención de muestras de sangre. Los anticoagulantes más utilizados son el EDTA, el citrato sódico y la heparina. A pesar del conocimiento del efecto nocivo que estos anticoagulantes pueden ejercer sobre diferentes componentes celulares de las muestras de sangre, su efecto en el proceso de aislamiento y cultivo de las CPE no ha sido testado todavía (Holland et al., 2003).

Cuando utilizamos el EDTA como anticoagulante para la obtención de muestras de sangre periférica tan sólo obtuvimos

cultivos de CPE en un 20% de las muestras procesadas, resultado muy similar al obtenido previamente por otros grupos de investigación (Campioni et al., 2013). Además, se ha puesto de manifiesto anteriormente que, aunque el EDTA es bueno para análisis de DNA a partir de muestras de sangre, éste puede influir en la concentración de Mg^{2+} y causar problemas en el análisis citogenético de los componentes celulares de la sangre (Holland et al., 2003). Por otro lado, el EDTA es utilizado también para la obtención de plasma sanguíneo y en general mantiene la integridad celular durante un periodo de tiempo limitado, inferior a 3 horas. El EDTA daña la integridad de las plaquetas y puede llegar a ser tóxico, motivo por el cual no es el anticoagulante de elección para el mantenimiento de las muestras de sangre destinadas a transfusiones (Ughachukwu P O et al.).

En cambio, cuando utilizamos citrato para la extracción de las muestras de sangre periférica, el porcentaje de cultivos de CPE fue del 80 % de las muestras procesadas. Sin embargo, todos los cultivos estaban contaminados con otros tipos celulares diferentes en morfología y fenotipo a las CPE. El citrato es también utilizado en la práctica clínica para obtención de plasma sanguíneo, ofrece mejor calidad que cualquier otro anticoagulante en el aislamiento del DNA y RNA de muestras de sangre y proporciona un elevado rendimiento en el aislamiento de linfocitos para su cultivo celular (Holland et al., 2003). Probablemente, este último sea el motivo responsable de la contaminación con otros tipos celulares de todos

Discusión

los cultivos de CPE obtenidos utilizando el citrato como anticoagulante.

Por último, nuestra experiencia nos permite identificar a la heparina como el coagulante de elección para la obtención de las muestras de sangre destinadas al aislamiento y cultivo de CPE. Aunque la heparina podría alterar la proliferación de las células T y la actividad antitrombina (Holland et al., 2003), permite la obtención de cultivos de CPE en el 80% de las muestras procesadas. Además, los cultivos obtenidos utilizando la heparina son homogéneos y muestran una morfología adoquinada similar al que muestran las CE en maduras en cultivo.

Otra variable importante en el manejo de muestras es el tiempo que transcurre desde la extracción de la sangre hasta su procesado. El procesado de muestras biológicas humanas por laboratorios de investigación básica requiere una sincronización entre el personal del centro clínico donde se obtienen y el personal del laboratorio que las va a procesar. En condiciones normales, estados no patológicos, los individuos son citados y el procesado de la muestra se realiza inmediatamente después de su obtención. Sin embargo, en estados patológicos el procesado inmediato de las muestras no es siempre posible ya que el reclutamiento de los pacientes se realiza durante las 24 horas del día. En general la viabilidad celular de las muestras empieza a decaer a las 48 horas tras su extracción (Holland et al., 2003). Otros investigadores han observado

diferencias en parámetros hematológicos en muestras de sangre procesadas 24 horas después de su extracción (Lippi et al., 2005). Es necesario conocer cual es la ventana temporal disponible entre la extracción de las muestras de sangre hasta su procesado que no comprometa la integridad de los componentes celulares de la sangre, entre los que se encuentran las CPE. Nuestros resultados indican que un tiempo de procesado de las muestras de sangre inferior a dos horas desde su extracción es el óptimo para la obtención de un número elevado de cultivos de CPE a partir de muestras de sangre periférica en adultos humanos.

Como hemos visto anteriormente, las CPE únicamente representan un pequeño porcentaje de la fracción de CMN. Por lo tanto, la única manera de aumentar la probabilidad de obtener cultivos de CPE es incrementando el volumen de muestra de sangre. Sin embargo, es necesario llegar a un compromiso entre el volumen de muestra procesada y el éxito de la técnica. Hasta el momento, los volúmenes de sangre periférica utilizados para el aislamiento y cultivo de CPE oscilan entre 50 y 100 mL (Ingram et al., 2004; Lin et al., 2000). Sin embargo, en la práctica clínica existe una reticencia a la extracción de volúmenes de sangre tan elevados de forma rutinaria. El protocolo aquí propuesto para el aislamiento y cultivo de CPE permite la obtención de un elevado número de cultivos de CPE a partir de muestras de sangre de tan sólo 30 mL. Este hecho supone una reducción del volumen de muestra de sangre necesaria para el aislamiento de CPE de forma satisfactoria con respecto a los

Discusión

protocolos utilizados hasta el momento (Campioni et al., 2013; Gulati et al., 2003; Ingram et al., 2004; Lin et al., 2000).

En cuanto a las condiciones de cultivo, otros dos parámetros demostraron ser cruciales en la obtención de cultivos de CPE y en el tiempo de aparición de los mismos. Por una parte, el uso de fibronectina como matriz extracelular en las placas de cultivo triplicó el número de cultivos obtenidos a la vez que redujo el tiempo de aparición de las primeras colonias a la mitad. Estos resultados están de acuerdo con otros obtenidos previamente en los que las CPE muestran una mayor adherencia sobre una matriz de fibronectina que sobre una matriz de colágeno (Asahara et al., 1997). Además, el uso de fibronectina como matriz extracelular incrementa el número de cultivos de CPE obtenidos con respecto al uso de colágeno (Gulati et al., 2003).

Por otra parte, cuando se desconocen los requerimientos específicos para el cultivo *in vitro* de un tipo celular se recurre al enriquecimiento de los medios de cultivo con factores de crecimiento, citoquinas y otros elementos que estimulen y favorezcan su crecimiento. Uno de los compuestos más utilizados para el enriquecimiento de los medios de cultivo es el SBF. El SBF, aislado de fetos bovinos, es muy rico en factores crecimiento, citoquinas y otros factores que estimulan el crecimiento de las células en cultivo. Asimismo, contiene una baja carga de

anticuerpos que pudieran interferir en el cultivo celular (Brunner et al., 2010).

En el aislamiento y cultivo de CPE, la cantidad de SBF utilizada para enriquecer el medio de cultivo es variable y oscila del 2% al 20% (Gulati et al., 2003; Hur et al., 2004; Ingram et al., 2004). Nuestros resultados demuestran que únicamente el enriquecimiento del medio de cultivo EGM-2 con un 20% de SBF aumenta el éxito en la obtención de cultivos de CPE a la vez que reduce el tiempo de aparición de los mismos.

6.1.2 Caracterización fenotípica de los cultivos de células progenitoras endoteliales

En la optimización del protocolo es necesario determinar las características fenotípicas y funcionales de las células obtenidas con el fin de garantizar la idoneidad de los cultivos contenidos .

Los cultivos de CPE obtenidos utilizando el protocolo optimizado presentan una morfología adoquinada como la que presentan los cultivos de CE, a diferencia de la morfología que presentan las EPC tempranas (Asahara et al., 1997) y las unidades formadoras de colonias Hill (Hill et al., 2003). El uso de los protocolos propuestos en estos trabajos dan lugar a colonias de células redondeadas en el centro, rodeadas por células en forma de huso en la periferia, con una baja capacidad proliferativa y que desaparecen a las tres semanas de cultivo (Fadini et al., 2012). La morfología de las CPE

Discusión

obtenidas en el presente trabajo es similar a la que presentan las CPE tardías (Hur et al., 2004), las células formadoras de colonias endoteliales (Ingram et al., 2004; Yoder et al., 2007) y las CE maduras en cultivo.

Además, todas las células de los cultivos de CPE obtenidos a partir de muestras de sangre periférica utilizando las condiciones óptimas de aislamiento y cultivo son capaces de captar acLDL y de unir Ulex-Lectina, criterio ampliamente utilizado para la caracterización de CE (Holthofer et al., 1982; Voyta et al., 1984). Sin embargo, esta característica también la poseen otras células aisladas con protocolos diferentes al propuesto en esta tesis como las unidades formadoras de colonias de Hill, las EPC tempranas, las EPC tardías y las células formadoras de colonias endoteliales (Fadini et al., 2008a; 2012).

Por ello, estudiamos en profundidad los marcadores progenitores y endoteliales más específicos. Los cultivos de CPE obtenidos en el presente trabajo expresan el marcador progenitor CD34 y los antígenos endoteliales CD31, KDR y vWF, al mismo tiempo que carecen de expresión del marcador leucocitario CD45. Las CPE tempranas y las células formadoras de colonias de Hill también muestran la expresión de estos mismos genes endoteliales. Sin embargo, estas células carecen de la expresión del marcador progenitor CD34 y expresan marcadores mieloides y leucocitarios como CD14, CD11b y CD45 (Fadini et al., 2012). Estos resultados

siguieren que los cultivos de CPE tempranas estarían formadas por células angiogénicas T mientras que las unidades formadoras de colonias de Hill estarían formadas por una combinación de células T y monocitos (Rohde et al., 2007). Por este motivo, descartamos los protocolos utilizados para el aislamiento y cultivo de CPE tempranas y unidades formadoras de colonias de Hill, ya que no serían los adecuados para la obtención de cultivos de CPE.

Los protocolos propuestos previamente para el aislamiento y cultivo de CPE tardías (Hur et al., 2004) y células formadoras de colonias endoteliales (Yoder et al., 2007) dan lugar a cultivos de células con fenotipo endotelial que carecen de la expresión del marcador progenitor CD34 y son indistinguibles de las CE maduras. El protocolo optimizado propuesto en este trabajo ofrece ventajas sobre ellos ya que reduce el volumen de la muestra de sangre y el tiempo de aparición de los cultivos a la vez que permite la obtención de cultivos celulares, que expresando el marcador progenitor CD34, se comportan morfológica y funcionalmente como células endoteliales.

6.1.3 Caracterización funcional de los cultivos de células progenitoras endoteliales

Las características funcionales que exhiben los cultivos aislados con un protocolo determinado son también muy importantes. Anteriormente hemos visto como un único parámetro en el protocolo de aislamiento y cultivo, el tiempo, puede afectar en gran

Discusión

manera al fenotipo de los tipos celulares obtenidos. De la misma manera, las diferentes condiciones de aislamiento y cultivo pueden afectar a las capacidades funcionales de los cultivos obtenidos.

Para garantizar que las CPE cultivadas exhibían una función endotelial adecuada medimos e parámetros como la capacidad de adhesión, de proliferación, de crecimiento y vasculogénica y las comparamos con HUVEC, el modelo celular endotelial más utilizado.

Los resultados obtenidos indican que los cultivos de CPE muestran una capacidad de adhesión sobre una matriz de fibronectina similar a la que presentan las HUVEC. Otros estudios han demostrado que las CPE presentan una fuerza de adhesión similar a las HUVEC sobre una matriz extracelular de gelatina cuando ésta se encuentra a bajas concentraciones. Sin embargo, a concentraciones mayores de gelatina, junto con la presencia en la matriz extracelular de los anticuerpos CD133, CD34 y KDR, la capacidad de adhesión de las CPE es superior a la que muestran las HUVEC (Wang et al., 2012). Cuando los experimentos para determinar la capacidad de adhesión se realizaron sometiendo a las células a estrés de cizalla, de nuevo, las CPE mostraron una capacidad de adhesión mayor que las HUVEC (Wang and Cooper, 2013). Conjuntamente, los resultados parecen indicar que la capacidad de adhesión de las CPE es similar a la que presentan las HUVEC y que ésta depende de la composición de la matriz extracelular y de las condiciones experimentales utilizadas.

La capacidad proliferativa de los cultivos de CPE se determinó bajo dos condiciones experimentales diferentes. En primer lugar, las células se sometieron a condiciones de ayuno, en la que los cultivos están privados de factores que estimulen su proliferación. Bajo estas condiciones, los niveles de proliferación de las CPE y de las HUVEC son similares, con aproximadamente el 10% de las células del cultivo en proliferación. Después, y tras el periodo de ayuno, los cultivos de CPE y HUVEC se estimularon durante 18 horas con medio EGM-2, con 2% de SBF y rico en factores de crecimiento. Con la presencia de los factores de crecimiento la capacidad proliferativa de ambos tipos celulares aumentó hasta 6 veces, sin observarse diferencias entre ellos. Estos resultados coinciden con otros obtenidos anteriormente en los que CPE obtenidas a partir de la fracción de células CD34+CD133+ de muestras de médula ósea mostraron un capacidad proliferativa similar a las HUVEC y a las células endoteliales microvasculares humanas (Bagley et al., 2003). Además, la capacidad proliferativa de cada uno de estos tipos celulares dependería de la composición del medio de cultivo elegido. Estos resultados demuestran que las CPE, al igual que las CE, son capaces de responder a los factores de crecimiento presentes en los medios de cultivo.

A continuación testamos la capacidad de crecimiento de los cultivos de CPE obtenidos a partir de muestras de sangre periférica bajo las condiciones óptimas de aislamiento y cultivo. Los cultivos

Discusión

de CPE mostraron una fase de latencia más prolongada que las HUVEC (2,4 días vs. 1,3 días) al igual que describen Bompais et al. (Bompais et al., 2004). Sin embargo, en este y otros estudios, la capacidad de crecimiento y clonogénica de las CPE es mucho mayor que las obtenida para HUVEC (Bompais et al., 2004; Hur et al., 2004; Ingram et al., 2005b). Una posible explicación a la diferencia entre nuestros resultados y los obtenidos por otros grupos podría radicar en el diseño experimental. Los resultados presentados en este trabajo muestran la capacidad de crecimiento de los cultivos de CPE y HUVEC durante un período de 6 días. En los trabajos citados anteriormente, la capacidad de crecimiento se determinó durante largos periodos de tiempo, hasta 14 semanas (Bompais et al., 2004), donde se observó que las CPE son capaces de crecer durante más tiempo, generar mayor descendencia y sufrir mayor número de divisiones que las HUVEC (Bompais et al., 2004; Hur et al., 2004).

En general, todos los protocolos utilizados en la bibliografía hasta el momento son capaces de dar lugar a células con capacidad para mejorar la neovascularización. Sin embargo, estas células difieren en la capacidad de diferenciarse completamente a CE con fenotipo maduro y de integrarse físicamente a los nuevos vasos formados (Fadini et al., 2012). La mayoría de los protocolos que utilizan tiempos cortos (< 7 días) para la obtención de cultivos CPE (Hill et al., 2003; Hur et al., 2004) obtienen células que principalmente mejoran la formación de vasos sanguíneos mediante la producción de diferentes factores de crecimiento que facilitan los

procesos angiogénicos (Hur et al., 2004; Urbich and Dimmeler, 2004). Por sí mismas, estas células no son capaces de formar estructuras tubulares sobre una matriz de Matrigel *in vitro* y tampoco son capaces de diferenciarse a CE maduras (Fadini et al., 2012). Sin embargo, los cultivos de CPE obtenidos con tiempos de cultivo más prolongados (> 7días) contribuyen directamente a la formación de nuevos capilares y son capaces de diferenciarse completamente a CE maduras (Fadini et al., 2012; Hur et al., 2004; Yoder et al., 2007). Al comparar la capacidad vasculogénica de los cultivos de CPE obtenidos con las condiciones óptimas de cultivo con la de cultivos de HUVEC, observamos que, aunque son capaces de formar estructuras tubulares sobre una matriz de Matrigel por sí mismas, presentan una capacidad vasculogénica inferior a las HUVEC. Sin embargo, otros estudios muestran que las CPE aisladas a partir de la fracción de células CD34+CD133+ de muestras de médula ósea presentan una capacidad vasculogénica similar a la que presentan cultivos de HUVEC o cultivos de CE microvasculares humanas (Bagley et al., 2003).

En definitiva, conseguimos poner a punto un protocolo para aislar CPE funcionales y con un fenotipo endotelial con un porcentaje de éxito que nos permitiera abordar los siguientes objetivos con suficientes garantías.

6.2 Infarto agudo de miocardio y células progenitoras endoteliales: movilización y funcionalismo

Las CPE tienen un papel fundamental en el mantenimiento de la integridad del endotelio en situaciones fisiológicas y en la regeneración del lecho vascular en situaciones patológicas (Grisar et al., 2011; Khakoo and Finkel, 2005; Shantsila et al., 2007). En nuestro estudio, la biología de las CPE y de cómo ésta puede estar afectada o modificada por diferentes condiciones patológicas puede abrir nuevas opciones terapéuticas en el tratamiento de las cardiopatías coronarias.

Como adelantamos, las CPE residen en la médula ósea, y desde allí tienen que ser movilizadas para que finalmente puedan acceder y adherirse en el lugar donde se ha producido la lesión endotelial. Una vez reclutadas, las CPE tienen que ser capaces de proliferar, migrar y organizarse para restablecer la lesión endotelial (Urbich and Dimmeler, 2004).

6.2.1 Niveles de células progenitoras endoteliales circulantes y células endoteliales circulantes en el infarto agudo de miocardio

La lesión endotelial representa el desencadenante inicial en la patogénesis de la aterosclerosis que, finalmente, puede manifestarse en una condición patológica como el IAM. La inaccesibilidad al endotelio vascular hace muy difícil la detección de

una lesión endotelial así como la determinación de su extensión (Mutin et al., 1999).

Las CEC son células que se desprenden de la pared vascular tras una lesión vascular, y son consideradas una consecuencia más que la causa inicial del estado patológico (Goon et al., 2006). Las CEC se han detectado en muestras de sangre de pacientes con diferentes condiciones asociadas a una lesión endotelial y podrían ser la prueba de un considerable daño en el árbol vascular (Mutin et al., 1999). Por este motivo las CEC podrían representar un biomarcador muy útil para determinar no sólo la existencia de lesión endotelial sino también de su extensión en el IAM.

Las CEC, en citometría de flujo, se caracterizan por la expresión de marcadores endoteliales como el vWF, el CD31, el CD146 y la ausencia de expresión del marcador leucocitario CD45 y del marcador progenitor CD133 (Blann et al., 2005). Por ello, para distinguirlas de las CPE, el fenotipo más aceptado para su determinación por citometría de flujo es CD31+CD146+CD45- (Mancuso et al., 2009).

Nuestros resultados muestran que en pacientes con IAM los niveles de CEC están aumentados con respecto a sujetos sanos desde el día del infarto y se mantienen durante 6 meses de evolución clínica, evidenciando la existencia de una lesión endotelial mantenida en el tiempo. Mutin et al. observó un incremento de los

Discusión

niveles de CEC en el contexto patológico del IAM con un pico situado entre las 18 y 24 horas después del infarto (Mutin et al., 1999). De la misma manera, Lee et al. observaron un incremento en el número de CEC en pacientes con IAM y, además, los niveles de CEC encontrados a las 48 horas del infarto eran capaces de predecir eventos cardiovasculares adversos mayores a los 30 días y al año de seguimiento (Lee et al., 2005).

El mantenimiento de los niveles de CEC durante los 6 meses de evolución clínica en el IAM pone de manifiesto que pueden existir otros factores, además del evento isquémico, que contribuyan a daño endotelial, ya que los pacientes no presentaron un segundo evento cardiovascular durante este tiempo. Sin embargo, no existe ningún estudio tan largo y que analice los niveles de CEC en el IAM durante 6 meses de evolución clínica, y que por tanto nos permita comparar nuestros resultados. No obstante, los factores de riesgo cardiovascular tradicionales como la hipertensión, la hipercolesterolemia, la hiperglicemia, el sexo, la edad y el tabaquismo pueden inducir daño o muerte de las CE (Hadi et al., 2005) y pueden explicar la permanencia de niveles elevados de CEC.

Por otra parte, los niveles de CPE circulantes observados en la fase aguda del IAM (el mismo día de infarto) son 3,6 veces superiores a los niveles observados en sujetos sanos. Estos resultados indican una movilización espontánea de las CPE circulantes a las pocas horas del evento isquémico, tal y como

describen Massa et al. (Massa et al., 2005) y contradiciendo los resultados presentados por Schmidt-Lucke et al. que observaron una disminución niveles de CPE basales en pacientes con IAM respecto a sujetos sanos (Schmidt-Lucke et al., 2005).

El estudio de la movilización de las CPE circulantes también revela un pico de movilización a los 30 días del infarto, situándose en niveles 6,4 veces superiores a los observados en sujetos sanos. El pico en la movilización de las CPE circulantes en el IAM obtenido en el presente trabajo no coincide con trabajos previos, que establecen este pico en el día del infarto (Massa et al., 2005) o a los 7 días del infarto (Shintani et al., 2001). Nuestros resultados muestran además cómo los niveles de CPE circulantes exhiben una tendencia a disminuir con la evolución clínica del IAM, ya que a los 6 meses estos niveles son similares a los observados el día del infarto en pacientes con IAM, pero superiores a los encontrados en sujetos sanos. Aunque nuestros resultados difieren de los previamente publicados en los que la normalización se produce a los 28 días (Shintani et al., 2001), sí coinciden con la tendencia a la normalización de los niveles de CPE circulantes con la evolución clínica del IAM (Massa et al., 2005).

Las razones que pueden explicar la discrepancia entre los resultados obtenidos en este trabajo y los presentados previamente por Shintani et al. y Massa et al. son varias (Massa et al., 2005; Shintani et al., 2001). En primer lugar, podría deberse a las

Discusión

características iniciales de la población de estudio seleccionada para la realización de estos trabajos. Otra razón podría residir en el diseño experimental, especialmente en la determinación de los tiempos para la extracción de las muestras tras el infarto. Sin duda, y quizá la más importante de todas las razones que explique las discrepancias entre los niveles de CPE circulantes obtenidas en los trabajos mencionados anteriormente sea la falta de consenso en la definición y en los protocolos para su cuantificación por citometría de flujo (Fadini et al., 2008a; 2012).

En conjunto, los resultados obtenidos en el presente trabajo y los publicados anteriormente revelan una activación inmediata de los mecanismos de reparación endotelial mediados por las CPE. Además, los niveles de CPE circulantes encontrados en pacientes con IAM el mismo día del infarto, definidas como células CD34+KDR+, fueron propuestos como biomarcadores capaces de predecir la ocurrencia de eventos cardiovasculares y muerte por causas cardiovasculares durante 12 meses de seguimiento (Werner et al., 2005).

Aunque la determinación de los niveles de CPE circulantes puede relacionarse con la evolución de los pacientes, es muy importante determinar la capacidad funcional de este tipo celular en el IAM, pues de ella dependerá la reparación endotelio. Es decir, no basta con tener más células potencialmente reparadoras, sino que tienen que ser funcionalmente capaces de hacerlo.

6.2.2 Determinación de la capacidad funcional de las células progenitoras endoteliales en el infarto agudo de miocardio

Los parámetros elegidos para analizar la capacidad funcional de las CPE en cultivo fueron la adhesión, crecimiento, proliferación y vasculogénesis.

Una vez en el torrente sanguíneo, las CPE tienen que ser capaces de adherirse a CE y/o a componentes de la matriz extracelular que, después de la lesión endotelial, han quedado expuestos al flujo sanguíneo (Caiado and Dias, 2012). Este proceso se conoce con el nombre de “*homing*” o emplazamiento y está mediada por diferentes proteínas como las selectinas y las integrinas (Caiado and Dias, 2012; Vajkoczy et al., 2003).

Nuestros resultados demuestran como las CPE en cultivo aisladas a partir de muestras de sangre de pacientes con IAM presentan un aumento en la capacidad adhesiva en la fase aguda del IAM con respecto a sujetos sanos, y que ésta se mantiene hasta 30 días después del infarto, cuando alcanza niveles máximos. A los 6 meses de evolución clínica, la capacidad de adhesión de las CPE se restablece a valores observados en sujetos sanos. Coincidiendo con nuestros resultados, Brehm et al. observaron un aumento en la movilización de CPE expresando moléculas de adhesión celular en pacientes con IAM después de 24 horas tras el infarto (Brehm et al., 2009). Tras una extensa búsqueda bibliográfica no hemos

Discusión

encontrado otros trabajos que hayan analizado la capacidad de adhesión de las CPE en el contexto del IAM y durante 6 meses de evolución clínica.

En cambio, existen algunos trabajos que muestran cómo la capacidad de adhesión de las CPE puede estar disminuida por la presencia de factores de riesgo vascular, como el colesterol (Chen et al., 2004b) y la homocisteína (Chen et al., 2004a) o incrementada por diferentes tratamientos como las estatinas, los inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina y los antagonistas de los receptores de angiotensina (Shantsila et al., 2007; Siddique et al., 2010; Wojakowski et al., 2012). Sin embargo, cualquier comparación de los resultados obtenidos en estos trabajos con los de la presente tesis es bastante compleja. En primer lugar, los criterios de selección de la población de estudio varían de un trabajo a otro. En segundo lugar, la mayoría de los trabajos encontrados en la bibliografía realizan la determinación de la capacidad de adhesión en CPE tempranas que, como hemos visto anteriormente, son células monocíticas y no CE. Finalmente, en la determinación de la capacidad de adhesión de las CPE se utilizan protocolos experimentales diferentes que pueden introducir diferencias significativas en los resultados obtenidos para el parámetro analizado (Grisar et al., 2011). Es preciso destacar que las dificultades encontradas a la hora de comparar los resultados obtenidos para la capacidad de adhesión son los mismos que nos

hemos encontrado con el resto de capacidades funcionales determinadas en esta tesis y presentadas a continuación.

Tal y como hemos visto anteriormente, la capacidad de adhesión es uno de los parámetros que puede determinar el éxito o el fracaso de la función biológica de las CPE. Por este motivo, decidimos analizar la expresión los principales componentes que median esta capacidad, las integrinas (Caiado and Dias, 2012). Los resultados mostraron que la expresión de las integrinas $\alpha 5$ y αV seguía un patrón similar al observado para la capacidad adhesiva en CPE de pacientes con IAM durante 6 meses de evolución clínica. Es decir, los niveles de expresión de las integrinas $\alpha 5$ y αV muestran una tendencia al alza el día del infarto, alcanzando valores significativos a los 30 días para volver a niveles similares a los encontrados en pacientes sanos a los 6 meses de evolución clínica.

La similitud del patrón de capacidad de adhesión con el de la expresión de las integrinas $\alpha 5$ y αV sugiere la implicación de éstas en el proceso de adhesión de las CPE sobre una matriz de fibronectina. Esto no es de extrañar ya que otros autores han obtenido resultados similares en diferentes modelos animales, ratones y conejos (Kokubo et al., 2007; Wary et al., 2009). En estos trabajos se demostró un papel indispensable de las integrinas $\alpha 5$ y αV en la adhesión de las CPE a vasos previamente denudados, lo que refuerza nuestra hipótesis. La buena evolución clínica que mostraron todos los pacientes con IAM incluidos en esta parte del

Discusión

estudio junto con la facilidad con la que se puede determinar la expresión de las integrinas $\alpha 5$ y αV en CPE por citometría de flujo, hace de éstas unas buenas candidatas a posibles indicadores de reparación endotelial y a biomarcadores de pronóstico en la cardiopatía isquémica.

Una vez adheridas sobre la zona del endotelio dañada, las CPE tienen que ser capaces de responder adecuadamente a los estímulos locales adecuadamente, proliferar, crecer y, finalmente, regenerar el endotelio.

En la presente tesis, la capacidad proliferativa de los cultivos de CPE se midió por citometría de flujo como la capacidad de éstos para iniciar el ciclo celular en respuesta a la adición de un medio de cultivo rico en factores de crecimiento tras un periodo de ayuno de 48 horas. Diferentes autores han descrito previamente que la presencia de factores de riesgo cardiovascular reduce la capacidad proliferativa de las CPE (Chen et al., 2004a; 2007). Los datos obtenidos en el presente trabajo confirman una reducción de la capacidad proliferativa de las CPE en pacientes con IAM. También demuestran cómo esta capacidad está reducida en las fases agudas del IAM, situación que se mantiene por lo menos hasta 30 días después del infarto, para restablecerse a valores observados en CPE de sujetos sanos tras 6 meses de evolución clínica.

La mayoría de estudios realizados hasta el momento para la determinación de la capacidad proliferativa han estado encaminados a testar el efecto de diferentes sustancias como la angiotensina II y la homocisteína sobre las CPE (Shantsila et al., 2007; Siddique et al., 2010). En estos trabajos se observó cómo el tratamiento de CPE en cultivo con estas sustancias reducía su capacidad proliferativa. También es notable el número de trabajos destinados a la determinación de este mismo parámetro en cultivos de CPE tratadas con estatinas, inhibidores del enzima convertidor de la angiotensina y bloqueadores del tipo 1 de receptores de la angiotensina II (Shantsila et al., 2007; Siddique et al., 2010). El uso de estos fármacos, ampliamente utilizados en el tratamiento de los pacientes con patologías cardiovasculares, resultó en una mejora en la capacidad proliferativa de los cultivos de CPE.

Como hemos indicado anteriormente, hasta la fecha no existen trabajos que estudien la capacidad proliferativa de las CPE en el contexto del IAM durante un periodo de tiempo tan extenso, por lo que la comparación de los resultados obtenidos a lo largo de la evolución clínica no es posible. Además, el diferente criterio de inclusión de pacientes entre diferentes estudios, la falta de un protocolo estándar para el aislamiento y cultivo de las CPE y el uso de diferentes técnicas para la determinación de la capacidad proliferativa nos ha dificultado la comparación estos resultados con los obtenidos por otros grupos.

Discusión

Otro de los parámetros funcionales analizados fue la capacidad de crecimiento de las CPE cultivadas durante un periodo de 6 días en medio de cultivo endotelial rico en factores de crecimiento. Todos los cultivos de CPE, tanto los aislados a partir de muestras de sangre de sujetos sanos como aquellos de pacientes con IAM a lo largo de su evolución clínica no mostraron diferencias en su crecimiento hasta el 5º y 6º día de cultivo. Los tiempos de latencia para todos los cultivos de CPE parecen indicar que todos ellos necesitan tiempos similares para adaptarse a las nuevas condiciones de cultivo, situándose en 2,4 días, tiempo bastante superior al encontrado en este trabajo para las HUVEC (1,3 días) y descrito con anterioridad por Bompais et al. (Bompais et al., 2004). De forma interesante, aunque no del todo sorprendente, el número máximo de células en cultivo en la fase estacionaria para cada cultivo sigue la misma tendencia que el observado para la capacidad proliferativa. De esta manera, hemos observado una reducción en la capacidad de crecimiento en CPE aisladas en pacientes con IAM a los 30 días de infarto. A los 6 meses, la capacidad de crecimiento de los cultivos de CPE se ha restablecido a valores similares a los que presentan las CPE de sujetos sanos. De nuevo, no hemos encontrado ningún trabajo que analice esta capacidad en CPE aisladas en pacientes con IAM durante 6 meses de evolución clínica.

La última fase el proceso vasculogénico consiste en la organización de las CPE, ya adheridas y en constante crecimiento, en estructuras tridimensionales que, tras un proceso de

maduración, conformarán los nuevos vasos sanguíneos. *In vitro*, la capacidad vasculogénica de cultivos celulares se determina midiendo la capacidad de éstos para formar estructuras tubulares sobre una matriz de Matrigel. Los resultados obtenidos en esta tesis revelan una modificación de la capacidad vasculogénica de las CPE a lo largo de 6 meses de evolución clínica en el contexto del IAM. Así, las CPE presentan una tendencia hacia una menor capacidad vasculogénica en las fases agudas del infarto. Sin embargo, esta tendencia se invierte a los 6 meses de evolución clínica, donde la capacidad vasculogénica de las CPE de pacientes con IAM es similar a la que presentan los sujetos sanos.

Aunque con un tipo celular y contexto patológico distinto, Heeschen et al. observaron una reducción de la capacidad vasculogénica de progenitores derivados de la médula ósea de pacientes con enfermedad coronaria isquémica crónica (Heeschen et al., 2004).

Aunque existen varios estudios que ponen de manifiesto una rápida movilización de CPE durante eventos isquémicos agudos y durante su evolución clínica, ninguno de ellos ha estudiado la capacidad vasculogénica de estos progenitores en el contexto del IAM (Lee and Poh, 2014; Shantsila et al., 2007; Siddique et al., 2010; Wojakowski et al., 2012). Por lo contrario, sí existen varios estudios dirigidos a la determinación de la capacidad funcional de las CPE en presencia de factores de riesgo cardiovascular. Así, Loomans et al. y

Discusión

Tepper et al., observaron una reducción de la capacidad vasculogénica en CPE en pacientes con diabetes mellitus de tipo 1 y 2 respectivamente (Loomans et al., 2004; Tepper et al., 2002). Resultados similares se han obtenido para la presencia de niveles elevados de colesterol total, homocisteína y dimetil arginina asimétrica (Chen et al., 2004a; 2004b; Thum et al., 2005).

Otra parte de los estudios de funcionalidad celular han perseguido la determinación del efecto de diferentes fármacos utilizados en patologías cardiovasculares sobre la biología de las CPE. En esta línea, se observó que el ramipril, un inhibidor del enzima convertidor de angiotensina, es capaz de aumentar la capacidad vasculogénica de las CPE *in vitro*. En cambio, las estatinas aumentan el número de CPE y su capacidad de migración, proliferación y de adhesión (Siddique et al., 2010).

Tomando los datos funcionales de forma conjunta, los resultados obtenidos muestran cómo las CPE son capaces de modular su actividad funcional en el IAM. De esta manera, encontramos que las CPE en fases agudas del IAM presentan aumentada su capacidad adhesiva mientras que las capacidades de crecimiento, proliferación y vasculogénesis se ven reducidas. A los 30 días tras el infarto esta situación se intensifica aún más y observamos un máximo de adhesión y mínimo para la capacidad de crecimiento. Finalmente, a los 6 meses del IAM, las CPE han restablecido su funcionalidad a los valores encontrados en sujetos sanos, en las que predomina una

mayor capacidad de crecimiento, de proliferación y vasculogénica y una menor capacidad de adhesión. Teniendo en cuenta que todos los pacientes incluidos en esta parte del trabajo mostraron una buena recuperación tras el IAM, el comportamiento de las CPE observado en ellos podría ser el que asegurara una buena recuperación del paciente.

Debido a la naturaleza multifactorial de la patología del IAM y los tratamientos que los pacientes reciben en estas situaciones, nuestro estudio tiene algunas limitaciones. Por una parte, la mayoría de pacientes con IAM son tratados con medicamentos capaces de incrementar al movilización y función de CPE como las estatinas y los inhibidores del enzima convertidor de angiotensina. Por este motivo, el principal factor implicado en el incremento de los niveles de CPE en las fases agudas el IAM y la modificación funcional de las mismas a lo largo de la evolución la clínica es incierto (Shantsila et al., 2007). Por otra parte, los factores de riesgo cardiovascular reducen el número y la función de las CPE (Shantsila et al., 2007). De esta manera, los resultados aquí presentados pueden estar influenciados por los factores de riesgo cardiovascular así como por el tratamiento que los pacientes con IAM reciben y no únicamente por el estado patológico del IAM.

6.3 Micropartículas Sonic Hedgehog y células progenitoras endoteliales

Uno de los objetivos de este trabajo fue determinar el efecto de las MP específicamente diseñadas para que alberguen el morfogen Shh (MP^{Shh+}) sobre la biología de CPE aisladas de muestras de sangre periférica de adultos humanos. Específicamente nos centramos en dos de los parámetros funcionales que mejor definen una adecuada función endotelial *in vitro*, la capacidad de producir NO y la capacidad vasculogénica.

6.3.1 Interacción de las micropartículas Sonic Hedgehog con las células progenitoras endoteliales

El efecto que las MP puedan ejercer sobre otras células, tanto en el estado fisiológico como en el patológico, depende del tipo de interacción que se establezca entre ambas y de si se produce o no la transferencia del contenido (proteínas, lípidos y RNAs) de la MP a la célula (Raposo and Stoorvogel, 2013). De esta manera, las MP pueden fusionarse con la membrana plasmática celular o ser endocitadas. Si la interacción se produce a través de la fusión entre la célula y la MP, la primera adquirirá las propiedades antigénicas y los receptores de la membrana de la segunda. Además, el contenido de la MP se liberará al citoplasma celular. De esta manera la célula puede adquirir nuevas funciones que antes no poseía. Sin embargo, cuando las MP son endocitadas, éstas pueden fusionarse con la membrana endocítica, y liberar su contenido al citoplasma, o ser dirigidas a los lisosomas para su degradación. En este caso, sólo si

las MP se fusionan con las membranas endocíticas, la célula adquirirá nuevas funciones.

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran cómo MP teñidas con PKH67 empiezan a ser internalizadas por las CPE a las dos horas de exposición. A las 24 horas de exposición todas las CPE muestran en su citoplasma MP marcadas. Imágenes de microscopia confocal revelan cómo las MP marcadas se encuentran concentradas en pequeñas vesículas, probablemente vesículas endocíticas, en el interior citoplasmático de las CPE. Resultados similares se han obtenido con HUVEC en cultivo y MP teñidas con PKH67 (Soleti et al., 2012). Otros autores han detectado la acumulación de vesículas extracelulares (MP o exosomas) en compartimentos endocíticos o fagocíticos a través de mecanismos dependientes del citoesqueleto de actina y de la actividad PI3K (Raposo and Stoorvogel, 2013).

Sin embargo, no podemos descartar que las MP puedan fusionarse con las CPE ya que el rápido dinamismo con el que se produce el evento de fusión junto con la limitada resolución de la microscopia de fluorescencia podría haber impedido su detección (Raposo and Stoorvogel, 2013). Algunos grupos han podido demostrar la fusión directa de exosomas con células dendríticas de ratón derivadas de la médula ósea mediante el uso del compuesto lipofílico R18 (Montecalvo et al., 2012). Es necesario destacar que únicamente se esperan mecanismos de fusión, que finalmente

conlleven a una exposición estable y duradera de las MP en la superficie celular, en aquellas células con poca o ninguna actividad endocítica (Raposo and Stoorvogel, 2013).

6.3.2 Efecto de las micropartículas Sonic Hedgehog en la expresión génica de las células progenitoras endoteliales

Los resultados obtenidos en el presente trabajo muestran como los principales miembros de la ruta de señalización de Hedgehog se expresan basalmente en CPE humanas aisladas a partir de muestras de sangre periférica. Así, pudimos observar una expresión basal del receptor de Shh, *PTCH1* así como del efector de la ruta, *SMO*. Además, observamos que en las CPE, el factor de transcripción activador de la ruta canónica Hh, *GLI1*, también se expresa basalmente.

Las CPE tratadas con MP^{Shh+} durante 24 horas incrementan la expresión de los genes *PTCH1*, *SMO* y *GLI1*. El incremento de la expresión de *GLI1* en respuesta al Shh se ha utilizado ampliamente como biomarcador de la activación de la ruta de señalización canónica Hedgehog (Boo et al., 2002; Hirschi et al., 2008). La expresión de los genes *PTCH1*, *SMO* y *SHH* también se ha observado en células sanguíneas CD34+ de humanos, donde la adición de Shh exógeno a cultivos *in vitro* en expansión incrementó el número de células progenitoras funcionales y promovió su diferenciación (Aberger et al., 2012). Los resultados de expresión génica demuestran la activación de la ruta de señalización Hedgehog

canónica en CPE tratadas con MP^{Shh+}. Sin embargo, sigue siendo controvertido el papel de los factores de transcripción GLI en la regulación de los procesos angiogénicos y tubulogénicos en CE (Chinchilla et al., 2010; Kanda et al., 2003; Spek et al., 2010).

El tratamiento de las CPE humanas con MP^{Shh+} aumenta la expresión de genes de interés cardiovascular. Específicamente se observa un incremento de la expresión de dos genes implicados en procesos vasculogénicos y angiogénicos, el *VEGFA* y su receptor, *KDR* (Fischer et al., 2006; Olsson et al., 2006; Soleti and Martínez, 2012). En CPE humanas sometidas a tratamiento con MP^{Shh+}, el gen *NOS3* que codifica para la proteína eNOS también incrementa su expresión. El NO producido por la eNOS regula numerosas acciones cardiovasculares como el tono vascular y la presión sanguínea, previene la agregación plaquetaria e inhibe la proliferación de las células de musculo liso vasculares (Moncada and Higgs, 2006). De la misma manera las MP^{Shh+} inducen la expresión del factor de transcripción inducido por el flujo laminar y ateroprotector, *KLF2* (Gimbrone and García-Cardena, 2013).

Los mecanismos de regulación de la expresión de estos genes en CPE humanas e inducidos por el tratamiento con MP^{Shh+} está aun por determinar. Algunos trabajos en CE de humanos y ratón muestran como el tratamiento con MP^{Shh+} modifican la expresión de varios genes implicados en procesos angiogénicos y cómo este efecto fue inhibido parcialmente por la ciclopamina (Soleti and

Martínez, 2009; 2012). Estos resultados podrían reflejar la compleja interacción entre las rutas canónicas y no canónicas de señalización Hedgehog en la regulación de la expresión génica.

6.3.3 Efecto de las micropartículas Sonic Hedgehog sobre la función celular de las células progenitoras endoteliales

Inicialmente se consideró que las CE *in vitro* no eran capaces de responder directamente a la proteína recombinante Shh. La inducción de la angiogénesis, el aumento del flujo sanguíneo y la recuperación de miembros isquémicos en el modelo murino se produciría a través de la inducción de la expresión de factores angiogénicos (VEGF y Angiopoyetina 1 y 2) en células intersticiales mesenquimales (Pola et al., 2001). Sin embargo, más recientemente se ha observado cómo las HUVEC sí son capaces de responder a Shh y de cómo la activación de la ruta de señalización de Hedgehog en HUVEC es capaz de inducir respuestas angiogénicas (Chinchilla et al., 2010; Spek et al., 2010).

Hasta la fecha no existe ningún estudio que describa el efecto de Shh sobre la biología de CPE aisladas de sangre periférica de adultos humanos. Los resultados aquí obtenidos demuestran cómo el Shh presente en las MP^{Shh+} es capaz de inducir un estímulo en la capacidad vasculogénica de las CPE aisladas de sangre periférica de adultos humanos.

Como mostramos anteriormente las CPE por sí mismas son capaces de formar estructuras tubulares sobre una matriz de

Matrigel. De hecho, este criterio es uno de los más utilizados para definir el fenotipo funcional de las CPE (Fadini et al., 2008a; 2012; Timmermans et al., 2009). El tratamiento con MP^{Shh+} desvela una inducción en la capacidad vasculogénica de las CPE así como una mejora en la organización de las estructuras tubulares formadas sobre la matriz de Matrigel.

Para analizar la posible implicación de la ruta de señalización de Shh en la inducción de la capacidad vasculogénica de las CPE utilizamos inhibidores selectivos de SMO, la ciclopamina y de PI3K, el LY294002. Los resultados obtenidos muestran como el efecto inducido por las MP^{Shh+} era completamente bloqueado tanto por la ciclopamina como por el LY204002. Este hecho parece indicar que las MP^{Shh+} son capaces de inducir la ruta de señalización Hedgehog y que, además, ésta está implicada en el proceso vasculogénico. La regulación de la vasculogénesis en CPE inducida por las MP^{Shh+} estaría mediada por mecanismos SMO y PI3K dependientes. Se han obtenido resultados similares a los aquí presentados en HUVEC tratadas con MP^{Shh+}. Específicamente, las MP^{Shh+} indujeron la formación de estructuras tubulares por parte de CE sembradas sobre una matriz de Matrigel a través de un mecanismo dependiente tanto del receptor PTCH1 como de SMO (Soleti et al., 2009). Otros trabajos empleando la proteína recombinante Shh demostraron un incremento de la capacidad angiogénica de las HUVEC a través de la activación de la ruta de señalización no

Discusión

canónica (Chinchilla et al., 2010) y mediados a través de la PI3K (Kanda et al., 2003).

Sin embargo, los resultados aquí obtenidos no permiten descartar el posible papel del factor de transcripción activador de la ruta canónica, GLI1, del factor proangiogénico VEGF y de su receptor KDR. Serían necesarios experimentos adicionales con inhibidores específicos de estos componentes para determinar el papel específico de cada uno de ellos en la inducción de la vasculogénesis en CPE tratadas con MP^{Shh+}. Otros estudios demostraron que las CE no respondían a las proteínas Hedgehog a través de un aumento de la actividad del factor de transcripción GLI y de la expresión de los genes regulados por éste (ruta canónica) si no que lo hacían a través de mecanismos GLI-independientes (Brennan et al., 2012; Chinchilla et al., 2010).

Es muy importante destacar que el efecto beneficioso de las MP^{Shh+} sobre la capacidad vasculogénica de las CPE se refleja, también, *in vivo*. CPE tratadas con MP^{Shh+} durante un período de 24 horas fueron trasplantadas subcutáneamente a ratones inmunodeprimidos durante 7 días mediante el procedimiento experimental conocido como “Matrigel Plug Assay”. Los resultados de estos experimentos muestran como las MP^{Shh+} son capaces de inducir la capacidad vasculogénica de las CPE *in vivo*. Estos resultados revelan cómo con tan sólo un tratamiento de 24 horas

con MP^{Shh+} es capaz de inducir cambios perdurables en la función de las CPE.

En este trabajo se describe por primera vez cómo las MP^{Shh+} son capaces de inducir la producción de NO en CPE en cultivo. El uso de los inhibidores ciclopamina y LY294002 revierte por completo el incremento en la producción de NO en CPE inducido por el tratamiento con MP^{Shh+}. Estos resultados demuestran que el incremento en la producción de NO en CPE sometidas a tratamiento con MP^{Shh+} está mediado por los componentes de la ruta de señalización de Hedgehog SMO y PI3K. El mecanismo de regulación en CPE de la producción de NO inducida por MP^{Shh+} coincide con el propuesto para la línea celular endotelial EA.hy 926 y en CE murinas, donde la producción de NO estaría mediada a través de un mecanismo dependiente de los receptores PTCH1 y SMO (Agouni et al., 2007; Soleti and Martínez, 2012).

La producción de NO en CPE y CE se realiza, principalmente, a través de la actividad del enzima eNOS. El gen de la eNOS ha sido estudiado extensamente. El promotor de este enzima posee una región promotora con múltiples secuencias reguladoras. Entre las sustancias que pueden interaccionar con estas secuencias reguladoras encontramos el VEGF, las estatinas y los estrógenos (Moncada and Higgs, 2006). Encontramos también múltiples elementos implicados en la regulación de su actividad de entre los cuales quizá el más importante sea la ruta de señalización del PI3K.

Discusión

La estimulación del PI3K por el flujo laminar conlleva la activación de la quinasa AKT, quien finalmente fosforila el enzima eNOS en su sitio activador Ser 1177. Sin embargo, existen otras proteínas quinasas que también pueden fosforilar el sitio activador Ser 1177 de la eNOS como la proteína quinasa A (PKA) (Boo et al., 2002) y la proteína quinasa activada por AMP (AMPK), que es capaz de activar a la eNOS en presencia de Ca²⁺/calmodulina (Moncada and Higgs, 2006).

Cuando estudiamos los mecanismos subyacentes al incremento de la producción de NO inducido por el tratamiento de MP^{Shh+} observamos que éstas no tuvieron ningún efecto en los niveles de expresión ni en la activación de la quinasa AKT. Sin embargo, observamos un aumento en la expresión y en la fosforilación de la eNOS en su sitio activador Ser 1177 sin efecto aparente sobre su sitio inhibitorio, Thr 495. De nuevo, el uso de los inhibidores ciclopamina y LY294002 mostraron como todos los mecanismos implicados en la producción de NO inducidos por las MP⁺ eran dependientes del receptor Smo y de la quinasa PI3K.

El NO parece estar implicado directamente en procesos angiogénicos y en la organización de capilares. Además, el VEGF es capaz de aumentar la producción de NO mediante el aumento de la expresión de la eNOS y, a su vez, el NO es capaz de inducir la expresión del TGF- β , un potente factor angiogénico (Moncada and Higgs, 2006). Parece clara la existencia de una interrelación entre la

producción de NO, el VEGF y la vasculogénesis. Con el fin de estudiar la posible dependencia entre la producción de NO y la capacidad vasculogénica inducidas por las MP+ realizamos el ensayo de vasculogénesis in vitro en presencia de un potente inhibidor de la actividad oxido nítrico sintasa, el L-NAME. La inhibición de la producción del NO no tuvo ningún efecto sobre la capacidad vasculogénica de las CPE tratadas con MP^{Shh+}. Todo ello sugiere que el incremento de la capacidad vasculogénica de las CPE mediada por MP^{Shh+} se produce a través de mecanismos diferentes y completamente independientes de la producción del NO.

Resultados similares a los presentados en este trabajo se han obtenido para CE cultivadas in vitro. El tratamiento de la línea celular endotelial EA.hy 926 con MP^{Shh+} aumentó la expresión de la eNOS así como la fosforilación en su sitio activador Ser 1177 (Agouni et al., 2007). En el modelo murino, las MP^{Shh+} fueron capaces de mejorar la función endotelial mediante la producción de NO (Agouni et al., 2007) y de rescatar la disfunción endotelial tras un proceso de isquemia y reperfusión. En el modelo murino de isquemia animal, la administración intravenosa de MP^{Shh+} durante 21 días incremento la activación de la eNOS, tanto en segmentos de aorta como en el tejido muscular (Benameur et al., 2010a).

En conjunto, todos los resultados presentados en este apartado demuestran cómo el tratamiento con MP que albergan el morfogen Shh son capaces de mejorar las capacidades vasculogénicas y de

producción de NO de CPE. Estos dos parámetros son dos de las funciones celulares más importantes y que mejor caracterizan la función endotelial. Por otra parte, sabemos que tanto el número de CPE circulantes como su función está afectada por la presencia de los factores de riesgo cardiovascular (Werner and Nickenig, 2006). De la misma manera, se ha observado una disminución en la movilización de las CPE en diferentes enfermedades cardiovasculares (Shantsila et al., 2007). El efecto observado de las MP^{Shh+} sobre las capacidades funcionales de las CPE las hace muy atractivas como posible terapia para mejorar la función de las CPE, afectada en pacientes que padecen enfermedades cardiovasculares o que presentan algún factor de riesgo cardiovascular.

6.3.4 Efecto de las micropartículas Sonic Hedgehog en la reorganización del citoesqueleto de actina en células progenitoras endoteliales

El tratamiento con MP^{Shh+} induce cambios morfológicos en las CPE. Las CPE en cultivo mostraban la característica morfología adoquinada endotelial. Sin embargo, tras 24 horas de tratamiento con las MP^{Shh+}, las CPE adquirirían una morfología mucho más fusiforme, muy similar a la que presentan las CE en arterias sometidas a flujo laminar (Dai et al., 2004). Además, el factor de transcripción KLF2 podría estar también implicado en el cambio morfológico observado en CPE tratadas con MP^{Shh+}. Sin embargo, aunque el tratamiento con MP^{Shh+} induce la expresión del gen KLF2, los datos obtenidos en esta tesis son insuficientes para dilucidar el

papel exacto del factor de transcripción KLF2 y de los mecanismos de regulación del mismo.

El estudio del efecto de las MP^{Shh+} sobre la organización del citoesqueleto de actina muestra cómo el tratamiento con MP^{Shh+} durante 24 horas induce la reorganización de los filamentos de actina en CPE. Además éstos se distribuyen de forma longitudinal a lo largo de toda la célula. La reorganización de los filamentos de actina no es dependiente de Smo ni de la actividad de la PI3K. El uso del inhibidor Y27362 desveló que la reorganización de los filamentos de actina esta mediada por la proteína ROCK, cuya activación, además, es independiente de Hedgehog. Colectivamente los resultados indican que la reorganización del citoesqueleto de actina en CPE sometidas al tratamiento con MP^{Shh+} puede estar mediada por uno o varios componentes presentes en las MP^{Shh+} y diferentes a Shh. Sin embargo, resultados obtenidos en HUVEC demostraron que la activación de las proteínas Rho GTPasa, Rac1 y RhoA estaría mediada por mecanismos Smo y PI3K dependientes, pero independientes de los factores de transcripción GLI (Chinchilla et al., 2010; Soleti et al., 2009).

Los resultados obtenidos en el análisis de la expresión génica en CPE tratadas tanto con MP^{Shh+} como con MP^{Shh-} revelan cómo solo las primeras son capaces de aumentar la expresión de los genes estudiados. Las MP^{Shh-} no tienen ningún efecto en la expresión de estos mismos genes. Lo mismo ocurre para todos los parámetros

Discusión

funcionales estudiados en esta parte del trabajo. A pesar de la diferente composición proteica de las micropartículas MP^{Shh+} y MP^{Shh-} (Miguet et al., 2006) únicamente aquellas MP que contienen al morfogen Shh son capaces de inducir cambios significativos en la expresión de genes de la ruta de señalización de Hedgehog y genes de interés cardiovascular. Además, todos los efectos positivos de las MP^{Shh+} sobre la capacidad funcional de las CPE parece estar mediada únicamente por la activación de la ruta de señalización Hedgehog, ya que la inhibición del receptor Smo es capaz de revertir todos los cambios evocados por las MP^{Shh+} .

7 Conclusiones/Conclusions

1. En los pacientes que sufren un IAM se produce un aumento en el número de CEC y EPC circulantes. Las CEC se mantienen elevadas durante los 6 meses de evolución clínica al igual que las EPC circulantes, que alcanzan su valor máximo 30 días después del infarto.
2. El protocolo óptimo de aislamiento de CPE de sangre periférica se basa en la recogida de al menos 30 mL de sangre por punción venosa en tubos con heparina sódica, procesada en un tiempo inferior a 2 horas. Las CPE se cultivarán sobre una matriz extracelular de fibronectina y se enriquecerá el medio de cultivo endotelial con un 20% SBF. Las CPE en cultivo así obtenidas muestran características fenotípicas y funcionales similares a las de líneas establecidas de células endoteliales (HUVEC).
3. Existen diferencias entre el comportamiento de las CPE en cultivo aisladas de individuos sanos y de pacientes con IAM. Además, durante la evolución clínica del paciente, las CPE también modifican sus características funcionales: en la fase aguda del proceso, el aumento en la adhesión de las CPE en cultivo asociado al aumento de expresión de las integrinas $\alpha 5$ y αV , está acompañado de una disminución de la proliferación celular y la vasculogénesis. La función de la CPE en cultivo de pacientes con IAM se reestablece a los niveles control después de 6 meses de evolución. Por ello, este cambio funcional de las CPE indicaría una adaptación a los requerimientos fisiopatológicos de cada momento.

Conclusiones/Conclusions

4. Las CPE en cultivo pueden incorporar MPP^{Shh+} e incrementar la expresión de diversos genes asociados a la vasculogénesis. Este tratamiento aumenta la capacidad vasculogénica en cultivos de CPE *in vitro* a través de mecanismos dependientes de la ruta de señalización Hedgehog (SMO y PI3K) y en implantes de CPE en Matrigel en un modelo de ratón inmunodeficiente. Sin embargo, la reorganización del citoesqueleto de actina depende de la ROCK y es independiente de la ruta de señalización Hedgehog.

5. El tratamiento de las CPE con MP^{Shh+} aumenta la producción de NO mediante un aumento en la expresión y activación de la eNOS y de mecanismos dependientes de la ruta de Hedgehog (SMO y PI3K).

1. In patients suffering AMI, CEC and circulating EPC numbers are increased. CEC levels remain elevated during 6 months of clinical evolution as circulating EPC do, reaching their maximum level 30 days after infarction.
2. The optimized protocol for isolating EPC from peripheral blood samples relies on the collection of at least 30 mL of blood by venipuncture in sodium heparin tubes, processed in less than 2 hours. EPC will be cultured on a fibronectin matrix and endothelial culture media will be enriched with 20% FBS. Isolated EPC cultures show similar phenotype and function to that of established lines of endothelial cells (HUVEC).
3. There are differences in behavior between EPC in culture isolated from healthy individuals and patients with AMI. Furthermore, during clinical evolution, EPC also modify their functional features: in acute phases of the process, increased EPC adhesion capacity, associated with increased expression of $\alpha 5$ and αV integrins, is accompanied by a decreased cell proliferation and vasculogenic capacity. Therefore, EPC functional modulation indicates a pathophysiological adaptation to specific requirements during AMI clinical evolution.
4. EPC in culture are able to incorporate MP^{Shh+} and to increase the expression of vasculogenesis associated genes. MP^{Shh+} treatment increases EPC vasculogenic capacity in vitro in a Hedgehog signaling pathway dependent manner (SMO and PI3K) and, *in vivo*, in an

Conclusiones/Conclusions

immunodeficient mouse model. However, actin cytoskeleton reorganization is mediated through ROCK-dependent but Hedgehog signaling pathway-independent mechanism.

5. EPC treated with MP^{Shh+} increase NO production by increasing expression and activation of eNOS in a Hedgehog signaling pathway-dependent mechanism (SMO and PI3K).

8 Bibliografía

- Aberger, F., Kern, D., Greil, R., and Hartmann, T.N. (2012). Canonical and noncanonical Hedgehog/GLI signaling in hematological malignancies. *Vitam. Horm.* *88*, 25–54.
- Agouni, A., Lagrue-Lak-Hal, A.H., Ducluzeau, P.H., Mostefai, H.A., Draunet-Busson, C., Leftheriotis, G., Heymes, C., Martínez, M.C., and Andriantsitohaina, R. (2008). Endothelial dysfunction caused by circulating microparticles from patients with metabolic syndrome. *Am. J. Pathol.* *173*, 1210–1219.
- Agouni, A., Mostefai, H.A., Porro, C., Carusio, N., Favre, J., Richard, V., Henrion, D., Martínez, M.C., and Andriantsitohaina, R. (2007). Sonic hedgehog carried by microparticles corrects endothelial injury through nitric oxide release. *FASEB J.* *21*, 2735–2741.
- Aicher, A., Zeiher, A.M., and Dimmeler, S. (2005). Mobilizing endothelial progenitor cells. *Hypertension* *45*, 321–325.
- Aird, W.C. (2007). Phenotypic heterogeneity of the endothelium: I. Structure, function, and mechanisms. *Circ. Res.* *100*, 158–173.
- Arnout, J., Hoylaerts, M.F., and Lijnen, H.R. (2006). Haemostasis. The Vascular Endothelium II. Ed. Springer-Verlag, Berlin, 1-41.
- Asahara, T., Murohara, T., Sullivan, A., Silver, M., van der Zee, R., Li, T., Witzenbichler, B., Schatteman, G., and Isner, J.M. (1997). Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* *275*, 964–967.
- Asahara, T., Takahashi, T., Masuda, H., Kalka, C., Chen, D., Iwaguro, H., Inai, Y., Silver, M., and Isner, J.M. (1999). VEGF contributes to postnatal neovascularization by mobilizing bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *EMBO J.* *18*, 3964–3972.
- Asahara, T., and Kawamoto, A. (2004). Endothelial progenitor cells for postnatal vasculogenesis. *Am. J. Physiol., Cell Physiol.* *287*, C572–C579.
- Asai, J., Takenaka, H., Kusano, K.F., Li, M., Luedemann, C., Curry, C., Eaton, E., Iwakura, A., Tsutsumi, Y., Hamada, H., et al. (2006). Topical sonic hedgehog gene therapy accelerates wound healing in diabetes by

Bibliografía

enhancing endothelial progenitor cell-mediated microvascular remodeling. *Circulation* 113, 2413–2424.

Bagley, R.G., Walter-Yohrling, J., Cao, X., Weber, W., Simons, B., Cook, B.P., Chartrand, S.D., Wang, C., Madden, S.L., and Teicher, B.A. (2003). Endothelial precursor cells as a model of tumor endothelium: characterization and comparison with mature endothelial cells. *Cancer Res.* 63, 5866–5873.

Banegas, J.R., Villar, F., and Graciani, A. (2006). Epidemiología de las enfermedades cardiovasculares en España. *Rev Esp Cardiol Supl* 6, 3-12.

Beltrami, A.P., Barlucchi, L., Torella, D., Baker, M., Limana, F., Chimenti, S., Kasahara, H., Rota, M., Musso, E., Urbanek, K., et al. (2003). Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell* 114, 763–776.

Benameur, T., Tual-Chalot, S., and Andriantsitohaina, R. (2010a). PPARalpha is essential for microparticle-induced differentiation of mouse bone marrow-derived endothelial progenitor cells and angiogenesis. *PLoS ONE* 5, e12392.

Benameur, T., Soleti, R., Porro, C., Andriantsitohaina, R., and Martínez, M.C. (2010b). Microparticles carrying Sonic hedgehog favor neovascularization through the activation of nitric oxide pathway in mice. *PLoS ONE* 5, e12688.

Bernimoulin, M., Waters, E.K., Foy, M., Steele, B.M., Sullivan, M., Falet, H., Walsh, M.T., Barteneva, N., Geng, J.-G., Hartwig, J.H., et al. (2009). Differential stimulation of monocytic cells results in distinct populations of microparticles. *J. Thromb. Haemost.* 7, 1019–1028.

Blann, A.D., Woywodt, A., Bertolini, F., Bull, T.M., Buyon, J.P., Clancy, R.M., Haubitz, M., Hebbel, R.P., Lip, G.Y.H., Mancuso, P., et al. (2005). Circulating endothelial cells. Biomarker of vascular disease. *Thromb. Haemost.* 93, 228–235.

Bompais, H., Chagraoui, J., Canron, X., Crisan, M., Liu, X.H., Anjo, A., Tolla-Le Port, C., Leboeuf, M., Charbord, P., Bikfalvi, A., et al. (2004).

Human endothelial cells derived from circulating progenitors display specific functional properties compared with mature vessel wall endothelial cells. *Blood* 103, 2577–2584.

Boo, Y.C., Hwang, J., Sykes, M., Michell, B.J., Kemp, B.E., Lum, H., and Jo, H. (2002). Shear stress stimulates phosphorylation of eNOS at Ser635 by a protein kinase A-dependent mechanism. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 283, H1819–H1828.

Boos, C.J., Lip, G.Y.H., and Blann, A.D. (2006). Circulating endothelial cells in cardiovascular disease. *J. Am. Coll. Cardiol.* 48, 1538–1547.

Boulanger, C.M., Scoazec, A., Ebrahimian, T., Henry, P., Mathieu, E., Tedgui, A., and Mallat, Z. (2001). Circulating microparticles from patients with myocardial infarction cause endothelial dysfunction. *Circulation* 104, 2649–2652.

Boulanger, C.M., Amabile, N., and Tedgui, A. (2006). Circulating microparticles a potential prognostic marker for atherosclerotic vascular disease. *Hypertension* 48, 180–186.

Brehm, M., Ebner, P., Picard, F., Urbien, R., Turan, G., and Strauer, B.-E. (2009). Enhanced mobilization of CD34(+) progenitor cells expressing cell adhesion molecules in patients with STEMI. *Clin Res Cardiol* 98, 477–486.

Brennan, D., Chen, X., Cheng, L., Mahoney, M., and Riobo, N.A. (2012). Noncanonical Hedgehog signaling. *Vitam. Horm.* 88, 55–72.

Brunner, D., Frank, J., Appl, H., Schöffl, H., Pfaller, W., and Gstraunthaler, G. (2010). Serum-free cell culture: the serum-free media interactive online database. *ALTEX* 27, 53–62.

Caiado, F., and Dias, S. (2012). Endothelial progenitor cells and integrins: adhesive needs. *Fibrogenesis Tissue Repair* 5, 4.

Campioni, D., Zauli, G., Gambetti, S., Campo, G., and Cuneo, A. (2013). In vitro characterization of circulating endothelial progenitor cells isolated from patients with acute coronary syndrome. *PLoS ONE* 8, e56377.

Bibliografia

Cantaluppi, V., Biancone, L., Figliolini, F., Beltramo, S., Medica, D., Deregibus, M.C., Galimi, F., Romagnoli, R., Salizzoni, M., Tetta, C., et al. (2012). Microvesicles derived from endothelial progenitor cells enhance neoangiogenesis of human pancreatic islets. *Cell Transplant* *21*, 1305–1320.

Case, J., Mead, L.E., Bessler, W.K., Prater, D., White, H.A., Saadatzaheh, M.R., Bhavsar, J.R., Yoder, M.C., Haneline, L.S., and Ingram, D.A. (2007). Human CD34+AC133+VEGFR-2+ cells are not endothelial progenitor cells but distinct, primitive hematopoietic progenitors. *Exp. Hematol.* *35*, 1109–1118.

Chargaff, E., and West, R. (1946). The biological significance of the thromboplastic protein of blood. *J. Biol. Chem.* *166*, 189–197.

Chen, J.Z., Zhu, J.H., Wang, X.X., Zhu, J.H., Xie, X.D., Sun, J., Shang, Y.P., Guo, X.G., Dai, H.M., and Hu, S.J. (2004a). Effects of homocysteine on number and activity of endothelial progenitor cells from peripheral blood. *J. Mol. Cell. Cardiol.* *36*, 233–239.

Chen, J.Z., Zhang, F.R., Tao, Q.M., Wang, X.X., Zhu, J.H., and Zhu, J.H. (2004b). Number and activity of endothelial progenitor cells from peripheral blood in patients with hypercholesterolaemia. *Clin Sci* *107*, 273–280.

Chen, Y.H., Lin, S.J., Lin, F.Y., Wu, T.C., Tsao, C.R., Huang, P.H., Liu, P.L., Chen, Y.L., and Chen, J.W. (2007). High Glucose Impairs Early and Late Endothelial Progenitor Cells by Modifying Nitric Oxide-Related but Not Oxidative Stress-Mediated Mechanisms. *Diabetes* *56*, 1559–1568.

Chinchilla, P., Xiao, L., Kazanietz, M.G., and Riobo, N.A. (2010). Hedgehog proteins activate pro-angiogenic responses in endothelial cells through non-canonical signaling pathways. *Cell Cycle* *9*, 570–579.

Chironi, G.N., Boulanger, C.M., Simon, A., Dignat-George, F., Freyssinet, J.-M., and Tedgui, A. (2009). Endothelial microparticles in diseases. *Cell Tissue Res.* *335*, 143–151.

Choi, K. (2002). The hemangioblast: a common progenitor of hematopoietic and endothelial cells. *J. Hematother. Stem Cell Res.* *11*,

91–101.

Dai, G., Kaazempur-Mofrad, M.R., Natarajan, S., Zhang, Y., Vaughn, S., Blackman, B.R., Kamm, R.D., García-Cardena, G., and Gimbrone, M.A. (2004). Distinct endothelial phenotypes evoked by arterial waveforms derived from atherosclerosis-susceptible and -resistant regions of human vasculature. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *101*, 14871–14876.

Deanfield, J.E., Halcox, J.P., and Rabelink, T.J. (2007). Endothelial function and dysfunction: testing and clinical relevance. *Circulation* *115*, 1285–1295.

Deanfield, J., Donald, A., Halcox, J., Lerman, A., Mancina, G., Oliver, J.J., and Pessina, A.C. (2005). Endothelial function and dysfunction. Part I: Methodological issues for assessment in the different vascular beds: a statement by the Working Group on Endothelin and Endothelial Factors of the European Society of Hypertension. *J Hypertens* *23*, 7–17.

Dorsam, R.T., and Gutkind, J.S. (2007). G-protein-coupled receptors and cancer. *Nat. Rev. Cancer* *7*, 79–94.

Eckers, A., and Haendeler, J. (2015). Endothelial cells in health and disease. *Antioxid. Redox Signal.* *22*, 1209–1211.

Erdbruegger, U., Haubitz, M., and Woywodt, A. (2006). Circulating endothelial cells: a novel marker of endothelial damage. *Clin. Chim. Acta* *373*, 17–26.

Fadini, G.P., Baesso, I., Albiero, M., Sartore, S., Agostini, C., and Avogaro, A. (2008). Technical notes on endothelial progenitor cells: ways to escape from the knowledge plateau. *Atherosclerosis* *197*, 496–503.

Fadini, G.P., de Kreutzenberg, S., Albiero, M., Coracina, A., Pagnin, E., Baesso, I., Cignarella, A., Bolego, C., Plebani, M., Nardelli, G.B., et al. (2008b). Gender differences in endothelial progenitor cells and cardiovascular risk profile: the role of female estrogens. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *28*, 997–1004.

Fadini, G.P., Losordo, D., and Dimmeler, S. (2012). Critical reevaluation

Bibliografía

of endothelial progenitor cell phenotypes for therapeutic and diagnostic use. *Circ. Res.* *110*, 624–637.

Fischer, C., Schneider, M., and Carmeliet, P. (2006). Principles and therapeutic implications of angiogenesis, vasculogenesis and arteriogenesis. *Handb Exp Pharmacol* *176/II*, 157–212.

Fleury, A., Martínez, M.C., and Le Lay, S. (2014). Extracellular vesicles as therapeutic tools in cardiovascular diseases. *Front Immunol* *5*, 370.

Fu, J.-R., Liu, W.-L., Zhou, J.-F., Sun, H.-Y., Xu, H.-Z., Luo, L., Zhang, H., and Zhou, Y.-F. (2006). Sonic hedgehog protein promotes bone marrow-derived endothelial progenitor cell proliferation, migration and VEGF production via PI 3-kinase/Akt signaling pathways. *Acta Pharmacol. Sin.* *27*, 685–693.

Gill, M., Dias, S., Hattori, K., Rivera, M.L., Hicklin, D., Witte, L., Girardi, L., Yurt, R., Himel, H., and Rafii, S. (2001). Vascular trauma induces rapid but transient mobilization of VEGFR2(+)/AC133(+) endothelial precursor cells. *Circ. Res.* *88*, 167–174.

Gimbrone, M.A., and García-Cardeña, G. (2013). Vascular endothelium, hemodynamics, and the pathobiology of atherosclerosis. *Cardiovasc. Pathol.* *22*, 9–15.

Goon, P.K.Y., Lip, G.Y.H., Boos, C.J., Stonelake, P.S., and Blann, A.D. (2006). Circulating endothelial cells, endothelial progenitor cells, and endothelial microparticles in cancer. *Neoplasia* *8*, 79–88.

Grisar, J.C., Haddad, F., Gomari, F.A., and Wu, J.C. (2011). Endothelial progenitor cells in cardiovascular disease and chronic inflammation: from biomarker to therapeutic agent. *Biomark Med* *5*, 731–744.

Grosser, T., Fries, S., and FitzGerald, G.A. (2006). Biological basis for the cardiovascular consequences of COX-2 inhibition: therapeutic challenges and opportunities. *J. Clin. Invest.* *116*, 4–15.

Gulati, R., Jevremovic, D., Peterson, T.E., Chatterjee, S., Shah, V., Vile, R.G., and Simari, R.D. (2003). Diverse origin and function of cells with endothelial phenotype obtained from adult human blood. *Circ. Res.* *93*,

1023–1025.

György, B., Szabó, T.G., Pásztói, M., Pál, Z., Misják, P., Aradi, B., László, V., Pállinger, É., Pap, E., Kittel, Á., et al. (2011). Membrane vesicles, current state-of-the-art: emerging role of extracellular vesicles. *Cell. Mol. Life Sci.* *68*, 2667–2688.

Hadi, H.A.R., Carr, C.S., and Suwaidi, Al, J. (2005). Endothelial dysfunction: cardiovascular risk factors, therapy, and outcome. *Vasc Health Risk Manag* *1*, 183–198.

Heal, W.P., Jovanovic, B., Bessin, S., Wright, M.H., Magee, A.I., and Tate, E.W. (2011). Bioorthogonal chemical tagging of protein cholesterylation in living cells. *Chem. Commun. (Camb.)* *47*, 4081–4083.

Heeschen, C., Lehmann, R., Honold, J., Assmus, B., Aicher, A., Walter, D.H., Martin, H., Zeiher, A.M., and Dimmeler, S. (2004). Profoundly reduced neovascularization capacity of bone marrow mononuclear cells derived from patients with chronic ischemic heart disease. *Circulation* *109*, 1615–1622.

Heissig, B., Hattori, K., Dias, S., Friedrich, M., Ferris, B., Hackett, N.R., Crystal, R.G., Besmer, P., Lyden, D., Moore, M.A.S., et al. (2002). Recruitment of stem and progenitor cells from the bone marrow niche requires MMP-9 mediated release of kit-ligand. *Cell* *109*, 625–637.

Hill, J.M., Zalos, G., Halcox, J.P.J., Schenke, W.H., Waclawiw, M.A., Quyyumi, A.A., and Finkel, T. (2003). Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk. *N. Engl. J. Med.* *348*, 593–600.

Hirschi, K.K., Ingram, D.A., and Yoder, M.C. (2008). Assessing identity, phenotype, and fate of endothelial progenitor cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *28*, 1584–1595.

Holland, N.T., Smith, M.T., Eskenazi, B., and Bastaki, M. (2003). Biological sample collection and processing for molecular epidemiological studies. *Mutat. Res.* *543*, 217–234.

Bibliografia

Holthofer, H., Virtanen, I., Kariniemi, A.L., Hormia, M., Linder, E., and Miettinen, A. (1982). Ulex europaeus I lectin as a marker for vascular endothelium in human tissues. *Lab. Invest.* *47*, 60–66.

Hur, J., Yoon, C.-H., Kim, H.-S., Choi, J.-H., Kang, H.-J., Hwang, K.-K., Oh, B.-H., Lee, M.-M., and Park, Y.-B. (2004). Characterization of two types of endothelial progenitor cells and their different contributions to neovasculogenesis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *24*, 288–293.

Hynes, R.O. (2002). Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* *110*, 673–687.

Ingham, P.W., and McMahon, A.P. (2001). Hedgehog signaling in animal development: paradigms and principles. *Genes Dev.* *15*, 3059–3087.

Ingram, D.A., Caplice, N.M., and Yoder, M.C. (2005a). Unresolved questions, changing definitions, and novel paradigms for defining endothelial progenitor cells. *Blood* *106*, 1525–1531.

Ingram, D.A., Mead, L.E., Moore, D.B., Woodard, W., Fenoglio, A., and Yoder, M.C. (2005b). Vessel wall-derived endothelial cells rapidly proliferate because they contain a complete hierarchy of endothelial progenitor cells. *Blood* *105*, 2783–2786.

Ingram, D.A., Mead, L.E., Tanaka, H., Meade, V., Fenoglio, A., Mortell, K., Pollok, K., Ferkowicz, M.J., Gilley, D., and Yoder, M.C. (2004). Identification of a novel hierarchy of endothelial progenitor cells using human peripheral and umbilical cord blood. *Blood* *104*, 2752–2760.

Jenkins, D. (2009). Hedgehog signalling: emerging evidence for non-canonical pathways. *Cell. Signal.* *21*, 1023–1034.

Kanda, S., Mochizuki, Y., Suematsu, T., Miyata, Y., Nomata, K., and Kanetake, H. (2003). Sonic hedgehog induces capillary morphogenesis by endothelial cells through phosphoinositide 3-kinase. *J. Biol. Chem.* *278*, 8244–8249.

Katoh, Y., and Katoh, M. (2005). Hedgehog signaling pathway and gastric cancer. *Cancer Biol. Ther.* *4*, 1050–1054.

Kawamoto, A., and Asahara, T. (2007). Role of progenitor endothelial cells in cardiovascular disease and upcoming therapies. *Catheter Cardiovasc Interv* 70, 477–484.

Khakoo, A.Y., and Finkel, T. (2005). Endothelial progenitor cells. *Annu. Rev. Med.* 56, 79–101.

Kokubo, T., Uchida, H., and Choi, E.T. (2007). Integrin alpha(v)beta(3) as a target in the prevention of neointimal hyperplasia. *J. Vasc. Surg.* 45 *Suppl A*, A33–A38.

Landmesser, U., Hornig, B., and Drexler, H. (2004). Endothelial function: a critical determinant in atherosclerosis? *Circulation* 109, II27–II33.

Lee, K.W., Lip, G.Y.H., Tayebjee, M., Foster, W., and Blann, A.D. (2005). Circulating endothelial cells, von Willebrand factor, interleukin-6, and prognosis in patients with acute coronary syndromes. *Blood* 105, 526–532.

Lee, P.S.S., and Poh, K.K. (2014). Endothelial progenitor cells in cardiovascular diseases. *World J Stem Cells* 6, 355–366.

Lerman, A., and Zeiher, A.M. (2005). Endothelial function: cardiac events. *Circulation* 111, 363–368.

Lin, Y., Weisdorf, D.J., Solovey, A., and Hebbel, R.P. (2000). Origins of circulating endothelial cells and endothelial outgrowth from blood. *J. Clin. Invest.* 105, 71–77.

Lippi, G., Salvagno, G.L., Solero, G.P., Franchini, M., and Guidi, G.C. (2005). Stability of blood cell counts, hematologic parameters and reticulocytes indexes on the Advia A120 hematologic analyzer. *J. Lab. Clin. Med.* 146, 333–340.

Loomans, C.J.M., de Koning, E.J.P., Staal, F.J.T., Rookmaaker, M.B., Verseyden, C., de Boer, H.C., Verhaar, M.C., Braam, B., Rabelink, T.J., and van Zonneveld, A.-J. (2004). Endothelial progenitor cell dysfunction: a novel concept in the pathogenesis of vascular complications of type 1 diabetes. *Diabetes* 53, 195–199.

Bibliografia

Lusis, A.J. (2000). Atherosclerosis. *Nature* 407, 233–241.

Madonna, R., and De Caterina, R. (2015). Circulating endothelial progenitor cells: Do they live up to their name? *Vascul. Pharmacol.* 67-69, 2–5.

Mancuso, P., Antoniotti, P., Quarna, J., Calleri, A., Rabascio, C., Tacchetti, C., Braidotti, P., Wu, H.-K., Zurita, A.J., Saronni, L., et al. (2009). Validation of a standardized method for enumerating circulating endothelial cells and progenitors: flow cytometry and molecular and ultrastructural analyses. *Clin. Cancer Res.* 15, 267–273.

Marigo, V., Davey, R.A., Zuo, Y., Cunningham, J.M., and Tabin, C.J. (1996). Biochemical evidence that patched is the Hedgehog receptor. *Nature* 384, 176–179.

Marrachelli, V.G., Mastronardi, M.L., Sarr, M., Soleti, R., Leonetti, D., Martínez, M.C., and Andriantsitohaina, R. (2013). Sonic hedgehog carried by microparticles corrects angiotensin II-induced hypertension and endothelial dysfunction in mice. *PLoS ONE* 8, e72861.

Martínez, M.C., Larbret, F., Zobairi, F., Coulombe, J., Debili, N., Vainchenker, W., Ruat, M., and Freyssinet, J.-M. (2006). Transfer of differentiation signal by membrane microvesicles harboring hedgehog morphogens. *Blood* 108, 3012–3020.

Martínez, M.C., Tual-Chalot, S., Leonetti, D., and Andriantsitohaina, R. (2011). Microparticles: targets and tools in cardiovascular disease. *Trends Pharmacol. Sci.* 32, 659–665.

Massa, M., Rosti, V., Ferrario, M., Campanelli, R., Ramajoli, I., Rosso, R., De Ferrari, G.M., Ferlini, M., Goffredo, L., Bertoletti, A., et al. (2005). Increased circulating hematopoietic and endothelial progenitor cells in the early phase of acute myocardial infarction. *Blood* 105, 199–206.

Mezentsev, A., Merks, R.M.H., O'Riordan, E., Chen, J., Mendeleev, N., Goligorsky, M.S., and Brodsky, S.V. (2005). Endothelial microparticles affect angiogenesis in vitro: role of oxidative stress. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 289, H1106–H1114.

Miguel, C.M. (2007). Libro de la salud cardiovascular del Hospital Clínico San Carlos y la Fundación BBVA (Fundacion BBVA). Ed. Nerea S.A., España.

Miguet, L., Pacaud, K., Felden, C., Hugel, B., Martinez, M.C., Freyssinet, J.-M., Herbrecht, R., Potier, N., van Dorsselaer, A., and Mauvieux, L. (2006). Proteomic analysis of malignant lymphocyte membrane microparticles using double ionization coverage optimization. *Proteomics* 6, 153–171.

Mitchell, A., Fujisawa, T., Newby, D., Mills, N., and Cruden, N.L. (2015). Vascular injury and repair: a potential target for cell therapies. *Future Cardiol* 11, 45–60.

Miyoshi, H., Umeshita, K., Sakon, M., Imajoh-Ohmi, S., Fujitani, K., Gotoh, M., Oiki, E., Kambayashi, J., and Monden, M. (1996). Calpain activation in plasma membrane bleb formation during tert-butyl hydroperoxide-induced rat hepatocyte injury. *Gastroenterology* 110, 1897–1904.

Moncada, S., and Higgs, E.A. (2006). Nitric oxide and the vascular endothelium. *Handb Exp Pharmacol* 176/1, 213–254.

Monsalve, E., Oviedo, P.J., García-Pérez, M.A., Tarín, J.J., Cano, A., and Hermenegildo, C. (2007). Estradiol counteracts oxidized LDL-induced asymmetric dimethylarginine production by cultured human endothelial cells. *Cardiovasc. Res.* 73, 66–72.

Montecalvo, A., Larregina, A.T., Shufesky, W.J., Beer Stolz, D., Sullivan, M.L.G., Karlsson, J.M., Baty, C.J., Gibson, G.A., Erdos, G., Wang, Z., et al. (2012). Mechanism of transfer of functional microRNAs between mouse dendritic cells via exosomes. *Blood* 119, 756–766.

Mutin, M., Canavy, I., Blann, A., Bory, M., Sampol, J., and Dignat-George, F. (1999). Direct evidence of endothelial injury in acute myocardial infarction and unstable angina by demonstration of circulating endothelial cells. *Blood* 93, 2951–2958.

Olsson, A.-K., Dimberg, A., Kreuger, J., and Claesson-Welsh, L. (2006). VEGF receptor signalling - in control of vascular function. *Nat. Rev. Mol.*

Bibliografía

Cell Biol. 7, 359–371.

Op den Buijs, J., Musters, M., Verrips, T., Post, J.A., Braam, B., and van Riel, N. (2004). Mathematical modeling of vascular endothelial layer maintenance: the role of endothelial cell division, progenitor cell homing, and telomere shortening. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 287, H2651–H2658.

O'Donnell, C.J., and Elosua, R. (2008). Cardiovascular risk factors. Insights from Framingham Heart Study. *Rev Esp Cardiol* 61, 299–310.

Paulis, L., Fauconnier, J., Cazorla, O., Thireau, J., Soleti, R., Vidal, B., Ouillé, A., Bartholome, M., Bideaux, P., Roubille, F., et al. (2015). Activation of Sonic hedgehog signaling in ventricular cardiomyocytes exerts cardioprotection against ischemia reperfusion injuries. *Sci Rep* 5, 7983.

Piccin, A., Murphy, W.G., and Smith, O.P. (2007). Circulating microparticles: pathophysiology and clinical implications. *Blood Rev.* 21, 157–171.

Pober, J.S., Min, W., and Bradley, J.R. (2009). Mechanisms of endothelial dysfunction, injury, and death. *Annu Rev Pathol* 4, 71–95.

Pola, R., Ling, L.E., Silver, M., Corbley, M.J., Kearney, M., Blake Pepinsky, R., Shapiro, R., Taylor, F.R., Baker, D.P., Asahara, T., et al. (2001). The morphogen Sonic hedgehog is an indirect angiogenic agent upregulating two families of angiogenic growth factors. *Nat. Med.* 7, 706–711.

Potente, M., Gerhardt, H., and Carmeliet, P. (2011). Basic and therapeutic aspects of angiogenesis. *Cell* 146, 873–887.

Psaltis, P.J., and Simari, R.D. (2015). Vascular Wall Progenitor Cells in Health and Disease. *Circ. Res.* 116 (8), 1392–1412.

Pytela, R., Pierschbacher, M.D., and Ruoslahti, E. (1985). Identification and isolation of a 140 kd cell surface glycoprotein with properties expected of a fibronectin receptor. *Cell* 40, 191–198.

Qin, G., Li, M., Silver, M., Wecker, A., Bord, E., Ma, H., Gavin, M., Goukassian, D.A., Yoon, Y.-S., Papayannopoulou, T., et al. (2006). Functional disruption of alpha4 integrin mobilizes bone marrow-derived endothelial progenitors and augments ischemic neovascularization. *J. Exp. Med.* 203, 153–163.

Raposo, G., and Stoorvogel, W. (2013). Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. *J. Cell Biol.* 200, 373–383.

Riobo, N.A., and Manning, D.R. (2007). Pathways of signal transduction employed by vertebrate Hedgehogs. *Biochem. J.* 403, 369–379.

Robbins, D.J., Fei, D.L., and Riobo, N.A. (2012). The Hedgehog signal transduction network. *Sci Signal* 5, re6.

Rohde, E., Bartmann, C., Schallmoser, K., Reinisch, A., Lanzer, G., Linkesch, W., Guelly, C., and Strunk, D. (2007). Immune cells mimic the morphology of endothelial progenitor colonies in vitro. *Stem Cells* 25, 1746–1752.

Rosell, A., Arai, K., Lok, J., He, T., Guo, S., Navarro, M., Montaner, J., Katusic, Z.S., and Lo, E.H. (2009). Interleukin-1beta augments angiogenic responses of murine endothelial progenitor cells in vitro. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 29, 933–943.

Schmidt, D.E., Manca, M., and Hofer, I.E. (2015). Circulating endothelial cells in coronary artery disease and acute coronary syndrome. *Trends Cardiovasc. Med.* 25, 578–587.

Schmidt-Lucke, C., Fichtlscherer, S., Aicher, A., Tschöpe, C., Schultheiss, H.-P., Zeiher, A.M., and Dimmeler, S. (2010). Quantification of circulating endothelial progenitor cells using the modified ISHAGE protocol. *PLoS ONE* 5, e13790.

Schmidt-Lucke, C., Rössig, L., Fichtlscherer, S., Vasa, M., Britten, M., Kämper, U., Dimmeler, S., and Zeiher, A.M. (2005). Reduced number of circulating endothelial progenitor cells predicts future cardiovascular events: proof of concept for the clinical importance of endogenous vascular repair. *Circulation* 111, 2981–2987.

Bibliografía

Shantsila, E., Watson, T., and Lip, G.Y.H. (2007). Endothelial progenitor cells in cardiovascular disorders. *J. Am. Coll. Cardiol.* *49*, 741–752.

Shintani, S., Murohara, T., Ikeda, H., Ueno, T., Honma, T., Katoh, A., Sasaki, K.-I., Shimada, T., Oike, Y., and Imaizumi, T. (2001). Mobilization of endothelial progenitor cells in patients with acute myocardial infarction. *Circulation* *103*, 2776–2779.

Siddique, A., Shantsila, E., Lip, G.Y.H., and Varma, C. (2010). Endothelial progenitor cells: what use for the cardiologist? *J Angiogenes Res* *2*, 6.

Soleti, R., and Martínez, M.C. (2009). Microparticles harbouring Sonic Hedgehog: role in angiogenesis regulation. *Cell Adh Migr* *3*, 293–295.

Soleti, R., and Martínez, M.C. (2012). Sonic Hedgehog on microparticles and neovascularization. *Vitam. Horm.* *88*, 395–438.

Soleti, R., Benameur, T., Porro, C., Panaro, M.A., Andriantsitohaina, R., and Martínez, M.C. (2009). Microparticles harboring Sonic Hedgehog promote angiogenesis through the upregulation of adhesion proteins and proangiogenic factors. *Carcinogenesis* *30*, 580–588.

Soleti, R., Lauret, E., Andriantsitohaina, R., and Carmen Martínez, M. (2012). Internalization and induction of antioxidant messages by microvesicles contribute to the antiapoptotic effects on human endothelial cells. *Free Radic. Biol. Med.* *53*, 2159–2170.

Soriano, A.O., Jy, W., Chirinos, J.A., Valdivia, M.A., Velasquez, H.S., Jimenez, J.J., Horstman, L.L., Kett, D.H., Schein, R.M.H., and Ahn, Y.S. (2005). Levels of endothelial and platelet microparticles and their interactions with leukocytes negatively correlate with organ dysfunction and predict mortality in severe sepsis. *Crit. Care Med.* *33*, 2540–2546.

Spek, C.A., Bijlsma, M.F., and Queiroz, K.C.S. (2010). Canonical Hedgehog signaling drives proangiogenic responses in endothelial cells. *Cell Cycle* *9*, 1683.

Taipale, J., Cooper, M.K., Maiti, T., and Beachy, P.A. (2002). Patched acts catalytically to suppress the activity of Smoothed. *Nature* *418*,

892–897.

Takahashi, T., Kalka, C., Masuda, H., Chen, D., Silver, M., Kearney, M., Magner, M., Isner, J.M., and Asahara, T. (1999). Ischemia- and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization. *Nat. Med.* 5, 434–438.

Tepper, O.M., Galiano, R.D., Capla, J.M., Kalka, C., Gagne, P.J., Jacobowitz, G.R., Levine, J.P., and Gurtner, G.C. (2002). Human endothelial progenitor cells from type II diabetics exhibit impaired proliferation, adhesion, and incorporation into vascular structures. *Circulation* 106, 2781–2786.

Thum, T., Tsikas, D., Stein, S., Schultheiss, M., Eigenthaler, M., Anker, S.D., Poole-Wilson, P.A., Ertl, G., and Bauersachs, J. (2005). Suppression of endothelial progenitor cells in human coronary artery disease by the endogenous nitric oxide synthase inhibitor asymmetric dimethylarginine. *J. Am. Coll. Cardiol.* 46, 1693–1701.

Timmermans, F., Plum, J., Yoder, M.C., Ingram, D.A., Vandekerckhove, B., and Case, J. (2009). Endothelial progenitor cells: identity defined? *J. Cell. Mol. Med.* 13, 87–102.

Ughachukwu P O, Ezenyeaku, C., and Ogamba, J.O. (2012) Comparative studies on anticoagulant properties of aqueous leaf extract of *Euphorbia heterophylla* and ethylene diamine tetra acetic acid (EDTA). *J Med Plant Res* 6(17), 3388-3392.

Urbich, C., and Dimmeler, S. (2004). Endothelial progenitor cells: characterization and role in vascular biology. *Circ. Res.* 95, 343–353.

Vajkoczy, P., Blum, S., Lamparter, M., Mailhammer, R., Erber, R., Engelhardt, B., Vestweber, D., and Hatzopoulos, A.K. (2003). Multistep nature of microvascular recruitment of ex vivo-expanded embryonic endothelial progenitor cells during tumor angiogenesis. *J. Exp. Med.* 197, 1755–1765.

van Beem, R.T., Verloop, R.E., Kleijer, M., Noort, W.A., Loof, N., Koolwijk, P., van der Schoot, C.E., van Hinsbergh, V.W.M., and Zwaginga, J.J. (2009). Blood outgrowth endothelial cells from cord

Bibliografia

blood and peripheral blood: angiogenesis-related characteristics in vitro. *J. Thromb. Haemost.* 7, 217–226.

Vasa, M., Fichtlscherer, S., Adler, K., Aicher, A., and Martin, H. (2001). Increase in circulating endothelial progenitor cells by statin therapy in patients with stable coronary artery disease. *Circulation* 103, 2885–2890.

Vita, J.A. (2011). Endothelial function. *Circulation* 124, e906–e912.

Voyta, J.C., Via, D.P., Butterfield, C.E., and Zetter, B.R. (1984). Identification and isolation of endothelial cells based on their increased uptake of acetylated-low density lipoprotein. *J. Cell Biol.* 99, 2034–2040.

Walter, D.H., Rittig, K., Bahlmann, F.H., Kirchmair, R., Silver, M., Murayama, T., Nishimura, H., Losordo, D.W., Asahara, T., and Isner, J.M. (2002). Statin therapy accelerates reendothelialization: a novel effect involving mobilization and incorporation of bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *Circulation* 105, 3017–3024.

Wang, G., Xiao, L., Wu, X., Xie, X., and Tang, C. (2012). Effects of Various Adhesive Substrates on the Adhesion Forces of Endothelial Progenitor Cells. *J Med Biol Eng* 32, 70-76.

Wang, X., and Cooper, S. (2013). Adhesion of endothelial cells and endothelial progenitor cells on peptide-linked polymers in shear flow. *Tissue Eng Part A* 19, 1113–1121.

Wary, K.K., Vogel, S.M., Garrean, S., Zhao, Y.D., and Malik, A.B. (2009). Requirement of alpha(4)beta(1) and alpha(5)beta(1) integrin expression in bone-marrow-derived progenitor cells in preventing endotoxin-induced lung vascular injury and edema in mice. *Stem Cells* 27, 3112–3120.

Werner, N., and Nickenig, G. (2006). Influence of cardiovascular risk factors on endothelial progenitor cells: limitations for therapy? *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 26, 257–266.

Werner, N., Kosiol, S., Schiegl, T., Ahlers, P., Walenta, K., Link, A., Böhm,

- M., and Nickenig, G. (2005). Circulating endothelial progenitor cells and cardiovascular outcomes. *N. Engl. J. Med.* 353, 999–1007.
- Williams, P.A., and Silva, E.A. (2015). The Role of Synthetic Extracellular Matrices in Endothelial Progenitor Cell Homing for Treatment of Vascular Disease. *Ann Biomed Eng* 43, 2301–2313.
- Wojakowski, W., Kucia, M., Kazmierski, M., Ratajczak, M.Z., and Tendera, M. (2008). Circulating progenitor cells in stable coronary heart disease and acute coronary syndromes: relevant reparatory mechanism? *Heart* 94, 27–33.
- Wojakowski, W., Landmesser, U., Bachowski, R., Jadczyk, T., and Tendera, M. (2012). Mobilization of stem and progenitor cells in cardiovascular diseases. *Leukemia* 26, 23–33.
- Wolf, P. (1967). The nature and significance of platelet products in human plasma. *Br. J. Haematol.* 13, 269–288.
- Yoder, M.C., Mead, L.E., Prater, D., Krier, T.R., Mroueh, K.N., Li, F., Krasich, R., Temm, C.J., Prchal, J.T., and Ingram, D.A. (2007). Redefining endothelial progenitor cells via clonal analysis and hematopoietic stem/progenitor cell principals. *Blood* 109, 1801–1809.
- Zanetta, L., Marcus, S.G., Vasile, J., Dobryansky, M., Cohen, H., Eng, K., Shamamian, P., and Mignatti, P. (2000). Expression of Von Willebrand factor, an endothelial cell marker, is up-regulated by angiogenesis factors: a potential method for objective assessment of tumor angiogenesis. *Int. J. Cancer* 85, 281–288.

9 Anexo

An affordable method to obtain cultured endothelial cells from peripheral blood

Carlos Bueno-Betí^a, Susana Novella^{a, b, *}, Macarena Lázaro-Franco^b, Daniel Pérez-Cremades^b,
Magda Heras^c, Juan Sanchís^{a, d}, Carlos Hermenegildo^{a, b}

^a Research Foundation, Hospital Clínico of Valencia – INCLIVA, Valencia, Spain

^b Department of Physiology, University of Valencia, Valencia, Spain

^c Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Institut Clinic de Torax, Hospital Clinic, Barcelona, Spain

^d Cardiology Department, Hospital Clínico of Valencia and Medicine Department, Universitat de València, Valencia, Spain

Received: May 24, 2013; Accepted: August 14, 2013

Abstract

The culture of endothelial progenitor cells (EPC) provides an excellent tool to research on EPC biology and vascular regeneration and vasculogenesis. The use of different protocols to obtain EPC cultures makes it difficult to obtain comparable results in different groups. This work offers a systematic comparison of the main variables of most commonly used protocols for EPC isolation, culture and functional evaluation. Peripheral blood samples from healthy individuals were recovered and mononuclear cells were cultured. Different recovery and culture conditions were tested: blood volume, blood anticoagulant, coating matrix and percentage of foetal bovine serum (FBS) in culture media. The success of culture procedure, first colonies of endothelial cells appearance time, correlation with number of circulating EPC (cEPC) and functional comparison with human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) were studied. The use of heparin, a minimum blood volume of 30 ml, fibronectin as a coating matrix and endothelial growing media-2 supplemented with 20% FBS increased the success of obtaining EPC cultures up to 80% of the processed samples while reducing EPC colony appearance mean time to a minimum of 13 days. Blood samples exhibiting higher cEPC numbers resulted in reduced EPC colony appearance mean time. Cells isolated by using this combination were endothelial cell-like EPCs morphological and phenotypically. Functionally, cultured EPC showed decreased growing and vasculogenic capacity when compared to HUVEC. Thus, above-mentioned conditions allow the isolation and culture of EPC with smaller blood volumes and shorter times than currently used protocols.

Keywords: endothelial progenitor cells • cell culture • vasculogenesis

Introduction

Vasculogenesis in adults was for first time reported after the identification and characterization of a population of EPC derived from peripheral blood [1]. Endothelial progenitor cells are incorporated into new vessels undergoing active angiogenesis. This process of post-natal vasculogenesis refers to the formation of new blood vessels from progenitor cells in the adult and has been associated with different physiological functions [2] and pathological disorders as cancer [3], cardiovascular diseases (CVD) [4, 5] and diabetes [6].

Since EPC were discovered, a great deal of literature has emphasized the importance of such progenitor cells in the maintenance of endothelial integrity by both exerting a paracrine effect to promote angiogenesis and integrating themselves into new vessels [6, 7]. Actually, an inverse correlation between EPC numbers and cardiovascular risk factors has been reported in patients with cardiovascular risk, but no history of CVD [8].

Besides the number of EPCs, the progenitor cell function could be affected by individual factors, such as cardiovascular risk factors, different drug treatments, hormone levels and others [9]. The study of EPC function requires obtaining EPC cultures, but one of the drawbacks existing is the lack of a simple and reproducible method to isolate, cultivate and expand EPC. It could be as a result of the small fraction at which these cells are found circulating level, representing only about 0.0001% of total mononuclear cells (MNC) of peripheral blood in human adults [10]. Culture of EPC has been performed in several ways, for early and late EPC [11], although a systematic and

*Correspondence to: Dr. Susana NOVELLA,
Research Foundation – INCLIVA,
Hospital Clínico Universitario de Valencia,
Av. Blasco Ibañez, 17, Valencia E 46010, Spain.
Tel.: +34 96 3864900
Fax: +34 96 3864642
E-mail: susana.novella@uv.es

doi: 10.1111/jcmm.12133

© 2013 The Authors.

Journal of Cellular and Molecular Medicine published by John Wiley & Sons Ltd and Foundation for Cellular and Molecular Medicine.

This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

detailed protocol to obtain replicate data on cultured EPC is still required.

Moreover, a potential clinical use of cultured EPC has been proposed, including re-endothelialization of injured vessels, reducing atherosclerotic disease appearance and progression and revascularization of infarcted regions [12]. Endothelial progenitor cells have also been proposed as potential therapeutic tools for gene therapy in growing cancers [13].

In the present study, we evaluated the influence of different culture conditions in obtaining EPC cultures, and we tested EPC functional capacity and compared it with HUVEC, widely used as a laboratory model system for studies on endothelial cell function and pathology. Therefore, we proposed an affordable and reproducible method to obtain EPC cultures to perform functional cell assays.

Materials and methods

Study design

This study was designed to compare different culture conditions for the best way to isolate and to obtain cultured, functional EPC. First, we selected the optimal blood sample withdrawal conditions in terms of volume and anticoagulant. Second, the culture conditions (extracellular matrix, culture media composition) were analysed. Finally, the functional capacity of the cultured EPC (measured in terms of cell growth and adhesion, cell proliferation and vasculogenesis) was the parameter to ensure the best culture conditions of the obtained cells, taking HUVEC as standard reference.

Blood samples

Peripheral blood samples were obtained from 60 healthy individuals at the Cardiology Service, Hospital Clinico of Valencia, in accordance with institutional guidelines. The characteristics of the participants enrolled are presented in Table S1.

Different blood volumes (60 ml) were withdrawn by venipuncture and were collected in tubes containing different anticoagulants: ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), heparin and sodium citrate (Vacutainer, Becton Dickinson, San Agustín del Guadalix, Madrid, Spain). To avoid sample contamination with mature endothelial cells (EC), first 6 ml of collected blood was discarded.

Blood samples were processed within 2 hr after extraction. To assess the effect of time sampling on EPC culture yields, a set of samples were left on a blood roller mixer at room temperature and were processed 24 hrs after withdrawal.

This investigation conforms to the principles outlined in the Declaration of Helsinki, was approved by the Ethical Committee of Clinical Research of the INCLIVA, Hospital Clinico of Valencia, Spain, and written informed consent was obtained from all donors.

Mononuclear cell isolation

Mononuclear cells from peripheral blood samples were isolated as described before [14]. Briefly, non-diluted blood was layered over

Lymphoprep (Axis-shield, Oslo, Norway) in a volume ratio 2:1, and centrifuged at 800 rcf for 30 min. at room temperature. Mononuclear cells from interphase were collected and washed twice with 6% foetal bovine serum (FBS) (Gibco, Life technologies, Alcobendas, Spain) in Dulbecco's PBS solution (Gibco).

Endothelial progenitor cell culture

Mononuclear cells isolated from blood samples were collected in endothelial growing media (EGM)-2 complete medium with the following composition (Lonza, Lonza Ibérica, Barcelona, Spain): Endothelial cell basal medium-2 supplemented with EGM Single Quots containing hydrocortisone, 2% FBS, hFGF-B, VEGF, R3-IGF-1, ascorbic acid, heparin, FBS, hEGF, and GA-1000 (gentamicin, amphotericin-B). Mononuclear cells were seeded onto fibronectin-treated plates (2.5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$; Becton Dickinson) at a final density of 1.5×10^5 cells/ cm^2 . Twenty-four hours after seeding, non-adherent cells were removed and attached cells were further cultured at 37°C and 5% of CO_2 . Culture media was changed every 2 days until first EPC colonies appeared or up to a maximum of 40 days.

To test different culture conditions, some of the above-mentioned parameters were modified. In this study, we tested two different FBS media concentrations, 2% and 20%, as well as two different coating matrixes, fibronectin 2.5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ and Gelatin 1% (Sigma-Aldrich, Tres Cantos, Madrid, Spain).

Human umbilical vein endothelial cell culture

Human umbilical vein endothelial cell culture was isolated by collagenase treatment of human umbilical veins from newborns as described earlier [15]. Briefly, umbilical veins were flushed with sterile PBS solution (Sigma-Aldrich) to wash the clotted blood out and then perfused with 1% collagenase solution and incubated at 37°C for 15 min. Endothelial cells were recovered by centrifugation and seeded onto gelatin-treated 25 cm^2 flasks (BioLite, LabClinics, Barcelona) in specific endothelial media EGM-2.

Quantification of circulating EPC in peripheral blood

Peripheral blood samples were recovered in heparin tubes and processed within 2 hrs after extraction. Circulating EPC (cEPC) were stained with anti-human VEGFR2/kinase insert domain receptor (KDR) conjugated with phycoerythrin (PE; R&D Systems, Madrid, Spain), fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated anti-human CD34 (Becton Dickinson) and peridinin chlorophyll protein complex (PerCP)-conjugated anti-human CD45 (Becton Dickinson) or with the appropriate isotype controls. Red blood cells were lysed (BD FACS Lysing solution, Becton Dickinson) for 10 min. and stained cells were detected with a FC5000 cytometer (Beckman-Coulter, Madrid, Spain) and results were analysed with Infinicyt software (Cytognos S.A., Salamanca, Spain). Circulating EPC were identified as negative for the leucocyte marker CD45, positive for the prototypical stem cell marker CD34 and positive for the endothelial cell marker KDR (CD45⁻CD34⁺KDR⁺) [11].

Endothelial progenitor cell characterization

Flow cytometry phenotypic characterization

Cultured EPC obtained under the most suitable conditions were also characterized by flow cytometry. The expression of endothelial antigens KDR and CD31 (also known as platelet-endothelial cell adhesion molecule, PECAM-1), progenitor antigen CD34 and leucocyte antigen CD45 was assessed. Briefly, harvested cells were stained with PE-conjugated anti-human KDR, FITC-conjugated anti-human CD31 or FITC-conjugated anti-human CD34 and PerCP-conjugated anti-human CD45, or with the appropriate isotype controls. CD45, CD34 and CD31 antibodies were purchased from Becton Dickinson and KDR antibody from R&D Systems. Stained cells were detected with a FC5000 cytometer (Beckman-Coulter) and results were analysed with Infinicyt software (Cytognos S.A.). Cultured EPC were considered as negative for the leucocyte marker CD45, positive for the stem-cell marker CD34 and positive for the endothelial cell markers KDR and CD31 (CD45⁻CD34⁺KDR⁺CD31⁺).

Immunofluorescence characterization

The ability of isolated EPC to uptake acetylated low density lipoprotein (Ac-LDL) and to bind Ulex-lectin, the classical way to define endothelial cells, was performed as described earlier [16,17]. Briefly, EPC were incubated with 1,1'-dioctadecyl-3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine-labelled Ac-LDL (Dii-acLDL, Life Technologies, Alcobendas, Spain), fixed with 4% paraformaldehyde and incubated with fluorescein isothiocyanate labelled Ulex europaeus agglutinin (FITC-UEA-1, Sigma-Aldrich). Cell nuclei were stained with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, Sigma-Aldrich). Stained samples were observed on a confocal spectral Leica SP2 microscope (Leica, Barcelona, Spain). Pictures were taken with a 40× objective and shown at ×1200 magnification.

Endothelial progenitor cells cultures were also tested for von Willebrand Factor (vWF) expression. In brief, cells were fixed with 4% paraformaldehyde solution and permeabilized for with PBS 0.25% Triton X-100 solution. Cells were incubated first with rabbit polyclonal vWF antibody (Abcam, Cambridge, United Kingdom) and then with a DyLight 488 conjugated anti-rabbit secondary antibody (Abcam). Counter staining was achieved by incubating cells with DAPI. Images were obtained with an inverted fluorescence microscope Nikon Eclipse Ti (100× magnification).

Functional parameters

Cell growth curve

1.5×10^4 cells were seeded in EGM-2 media on each well, culture media was changed daily and the counting process was repeated every day for 6 days. Briefly, cells were detached by using 0.05% trypsin solution, recovered by centrifugation and resuspended with 100 μ l of Tripa blue solution (Sigma-Aldrich). Cells were counted on a Neubauer modified chamber and total number of cells per well were plotted to calculate the lag period (latent period of no growth), the log phase (when cells underwent exponential growth), the plateau (when growth rate dropped close to zero) and the saturation density (at which the cell population reached the plateau phase).

Cell proliferation

Cell proliferation was measured by flow cytometry with propidium iodide (PI) staining (Immunostep, Salamanca, Spain) to quantify the content of

DNA and the distribution of a cell population along the different phases of the cell cycle [18]. Briefly, cells were starved for 48 hrs and then stimulated for 18 hrs with EGM-2 complete media. After incubation, cells were detached with a 0.05% trypsin solution, fixed with 70% ethanol and stained with PI-RNase solution (Immunostep). Stained cells were analysed with FC5000 cytometer (Beckman-Coulter) and Infinicyt software (Cytognos). Results are shown as percentage of cells undergoing DNA synthesis plus mitosis with respect to total cell number analysed.

Cell adhesion

Adhesion assays were performed on fibronectin (Becton Dickinson) treated dishes (2.5 μ g/cm²). In brief, 5×10^4 cells were seeded on dishes with a 4 mm² grid (Nunc, Madrid, Spain) and incubated at 37°C and 5% of CO₂. After 30 min., non-adherent cells were removed and adhered cells were counted in six random squares by two independent observers. Data were expressed as a percentage of adhered cells relative to the total number of seeded cells.

Vasculogenesis assay

Vasculogenesis was analysed in Matrigel (Becton Dickinson) as previously described [19]. In brief, Matrigel was diluted with EGM-2 media SBF free and allowed to solidify for 30 min. at 37°C. Thereafter, 1.5×10^5 cells/well were seeded and incubated for 8 hrs. Then, pictures were taken with a Nikon Eclipse-Ti inverted microscope (Nikon, Izaña, Valencia, Spain) with 4× objective (total magnification 40×) and images recorded by Nikon digital sight Ds-QiMc camera.

Images from five different random fields per well were processed and analysed with Image Pro-Plus Software V.6 (Media Cybernetics, Rockville, MD, USA). Total length data of the tube-like structures were expressed in micrometers (μ m).

Statistical analysis

Values shown in the text and figures are mean \pm SEM. For frequency comparison, contingency tables were analysed by Chi-squared test. Data normality was assessed by Kolmogorov-Smirnov test. Statistical comparisons were performed with one-way ANOVA for multiple comparisons and then Bonferroni's test was performed. Student's *t*-test was applied for single comparisons. Correlation analysis was performed by linear regression. Growth curve data were analysed by two-way ANOVA with Bonferroni's post-test. *P* < 0.05 was considered significant. The statistical analysis was carried out by using the Prism 5.04 software (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA).

Results

EPC isolation conditions

Three clinically used anticoagulants were tested to study how the anticoagulant used for blood sampling influences EPC isolation and culture procedure. Identical blood volumes were recovered in tubes containing EDTA, sodium heparin and sodium citrate. Mononuclear cells from these samples were cultured and both the percentage of

EPC cultures and the appearance mean time for the first EPC colonies were recorded.

Only 20% of EDTA-recovered blood samples gave rise to EPC cultures. However, when heparin or sodium citrate was used for blood recovery, 80% of EPC cultures were successfully obtained ($P < 0.01$; Fig. 1A). No significant differences were found with regard to EPC appearance mean time between anticoagulants (Fig. 1B). Moreover, 100% of cultures derived from citrated samples showed different morphology, were negative for the uptake of Ac-LDL and unable to bind Ulex-lectin, thus demonstrating they were not EPC (Fig. S1). Only heparin allows obtaining high yields of homogeneous EPC cultures with the shorter appearance mean time. Thus, rest of the experiments were performed with blood obtained with heparin as anticoagulant.

To assess the effect of blood volume on EPC isolation procedure, three different blood volumes (10, 20 and 30 ml) were tested. The highest EPC culture yields, referred as the percentage of EPC cultures obtained from blood samples, were found for blood samples of 30 ml (80%; $P < 0.05$ versus 10 ml). Although there were no statistically significant differences between samples of 20 and 30 ml, the 20% yield reduction in 20 ml blood samples is worth considering (Fig. 1B). The use of higher blood volumes for EPC isolation showed a decrease in EPC appearance mean time, from 16 days for 10 ml blood samples to 12 days for both 20 and 30 ml blood samples ($P < 0.05$; Fig. 1C). On the basis of obtained

results, we chose to collect 30 ml of blood to reach high yields in EPC cultures.

As quick blood processing is not always available, the effect of time sampling on EPC isolation and culture procedure was checked by dividing blood samples into two sets. One set was processed within 2 hrs after extraction. The other set was left in a blood roller mixer for 24 hrs and then processed in the same way (Fig. S2). For samples processed within 2 hrs after withdrawal, 80% of EPC cultures were obtained. For those samples left for 24 hrs in a blood roller mixer, only 30% of EPC cultures were obtained ($P < 0.05$). These results indicate the critical rapid processing of blood samples when they are intended to EPC isolation.

EPC culture conditions

To investigate the role of the most common culture matrixes in the cell culture procedure, MNC were seeded on culture plates previously treated with either gelatin or fibronectin. The highest number of EPC cultures was obtained when fibronectin was used as coating matrix (70% versus 20%; $P < 0.05$; Fig. 2A). A reduction in the appearance time was also observed, from 23 days for gelatin matrix to 12 days for fibronectin matrix ($P < 0.01$; Fig. 2B). Therefore, the use of fibronectin matrix for EPC culture increases EPC culture yields as well as it reduces the appearance mean time of the first

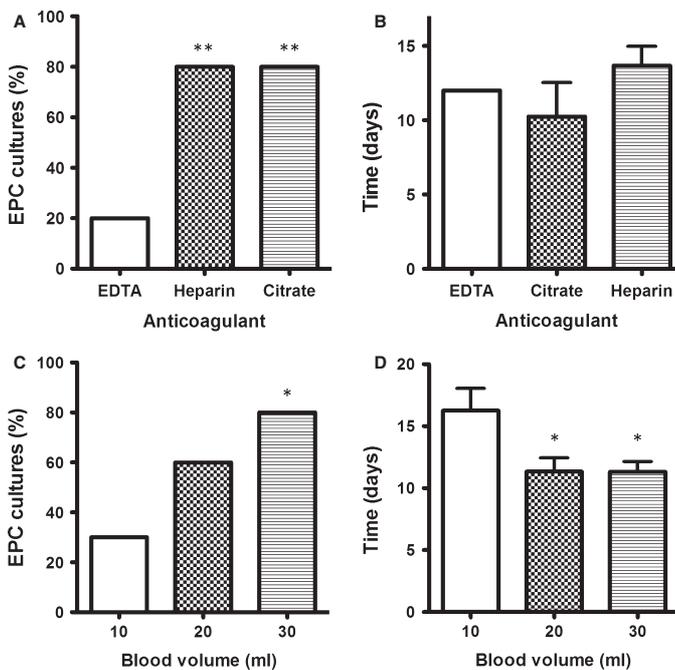


Fig. 1 Endothelial progenitor cells' (EPC) isolation conditions. **(A)** Effect of anticoagulant in the success of EPC cultures and **(B)** the time at which it was possible to observe the first EPC colonies. Blood samples were collected in tubes containing three different anticoagulants: ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), heparin and sodium citrate. EPC initial cultures were followed up to 40 days of culture (** $P < 0.01$ versus EDTA by Chi-squared test; $n = 10$). Effect of blood volume in the success of EPC cultures: bars represent **(C)** the percentages of EPC cultures obtained from mononuclear cells obtained from different blood volumes and **(D)** the time at which it was possible to observe the first EPC colonies (* $P < 0.05$ versus 10 ml; $n = 10$).

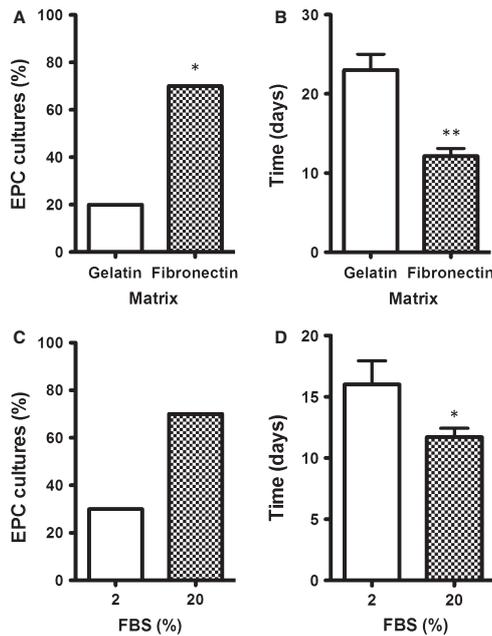


Fig. 2 Endothelial progenitor cells' (EPC) culture conditions. Effect of culture matrix on the development of EPC cultures. Results represent (A) the obtained EPC culture percentages from mononuclear cell (MNC) seeded in plates coated with 1% gelatin or 2.5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ fibronectin ($*P < 0.05$ by Chi-squared test; $n = 10$) and (B) EPC appearance time ($**P < 0.01$ by Student's *t*-test; $n = 10$). Effect of foetal bovine serum (FBS) media concentration on the development of EPC cultures. Results represent (C) the obtained EPC cultures from MNC maintained with endothelial growing media-2 complete media supplemented with 2% or 20% FBS ($n = 10$) and (D) EPC appearance time ($*P < 0.05$ by Student's *t*-test; $n = 10$).

EPC colonies. The rest of the experiments were performed onto fibronectin-coated culture surfaces.

Two different concentrations of FBS, 2% and 20%, were tested as complement to endothelial media EGM-2. The higher FBS concentration higher yield in EPC cultures is obtained (30% versus 70%; Fig. 2C), although differences did not reach statistical significance ($P = 0.074$). Endothelial progenitor cells appearance time, however, was significantly reduced from 16 to 11 days ($P < 0.05$) for media complemented with 2% and 20% FBS, respectively (Fig. 2D).

After testing different conditions for EPC isolation and culture, the best combination of them all is the use of fibronectin as a coating matrix, a minimum volume of 30 ml of fresh blood recovered in heparin tubes and EGM-2 supplemented with 20% FBS. Blood processing within 2 hrs after extraction is also recommended. (Fig. S3 shows bright field pictures of culture evolution from MNC seeding to EPC confluent cultures).

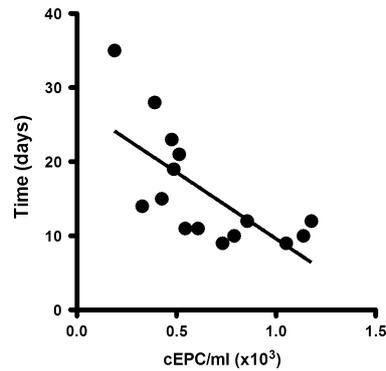


Fig. 3 Circulating endothelial progenitor cell (EPC) levels and EPC appearance mean time relationship. Correlation between circulating EPC levels and EPC cultures appearance mean time from mononuclear cell derived from donors blood. Circulating EPC were analysed by flow cytometry as $\text{CD45}^- \text{CD34}^+ \text{KDR}^+$, as detailed in the Methods section ($R^2 = 0.48$; $P < 0.01$; $n = 15$).

EPC culture appearance time and circulating levels of EPC

To test the relationship between cEPC and the success of its culture, blood samples from 20 healthy donors were processed in two sets: one for flow cytometry analysis for cEPC quantification, and the other one for cell culture following the above-mentioned conditions, and EPC culture yields and appearance time were recorded. With these conditions, 15 EPC cultures were obtained and the EPC appearance mean time was 13.5 days, in accordance with all the data presented so far. The cEPC levels were 647 ± 78 cEPC/ml of blood. Analysis of blood samples data that successfully gave rise to EPC cultures revealed that there was a significant, inverted correlation between cEPC levels and appearance time ($P < 0.01$; Fig. 3).

Cultured EPC characterization

After isolation and culture procedure, obtained EPC cultures were characterized morphologically. All EPC cultures showed the characteristic endothelial cobblestone morphology. To ensure that our modified procedure gave rise to true EPC, cells were phenotypically characterized by flow cytometry and immunofluorescence microscopy.

Flow cytometry immunophenotyping revealed that all isolated EPC expressed endothelial markers CD31 and KDR. Panleucocyte marker expression, CD45, was absent in all of them and progenitor marker expression, CD34, was found in 45% of cultured cells (Fig. 4A). Taken together, these results suggest our procedure allows the isolation of EPC with endothelial-like phenotype.

The capacity of EPC cultures to incorporate Dil-acLDL and their ability to bind FITC- UEA-1 were analysed in different cultures by confocal microscopy (Fig. 4B). All the cultures were positive for both

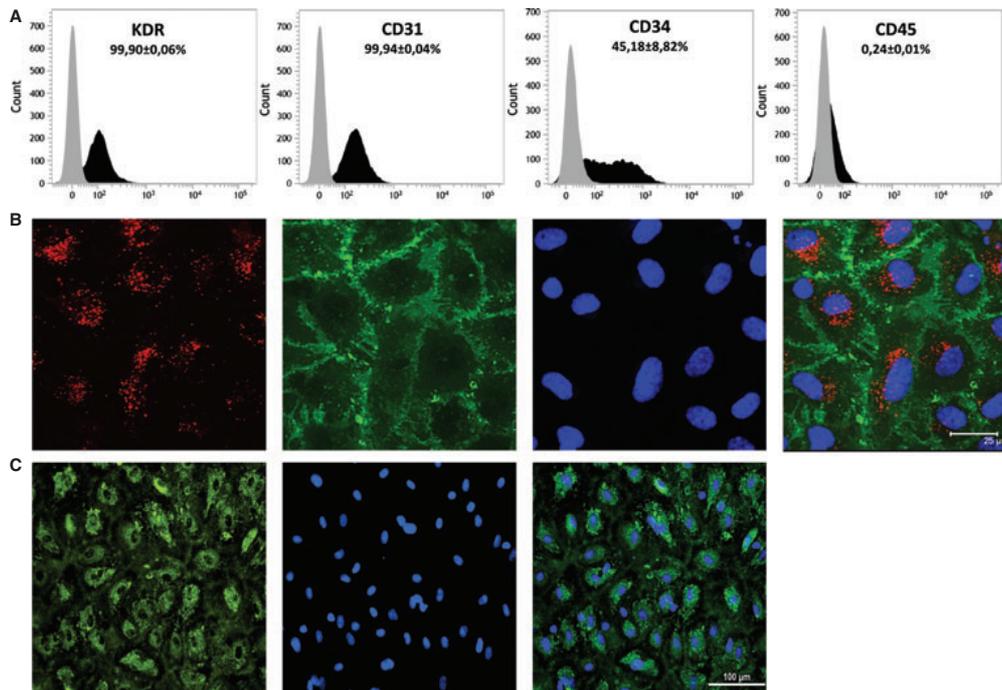


Fig. 4 Cultured endothelial progenitor cells' (EPC) phenotypic characterization. **(A)** Representative images for endothelial markers kinase insert domain receptor (KDR) and CD31, the progenitor maker CD34 and the leucocyte antigen CD45 expression were assessed by flow cytometry. Grey histograms are isotype-stained cells and black histograms represent cells positively stained with KDR, CD31, CD34 and CD45. The percentage of EPC expressing each marker is presented as mean \pm SEM ($n = 10$). **(B)** Confocal microscopy of Dil-Ac-LDL uptake, FITC-UEA-1 binding, 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) nuclei staining and merged images for EPC are shown. EPC were incubated with 2 μ g/ml of Ac-LDL for 1 hr, fixed with 4% paraformaldehyde and then incubated with 10 μ g/ml FITC-Ulex-lectin. Counterstaining was achieved by 1 μ g/ml DAPI staining. Scale bar represents 25 μ m (original magnification $\times 1200$). **(C)** Fluorescence microscopy of von Willebrand Factor expression, DAPI nuclei staining and merged images for EPC are shown. EPC were incubated for 1 hr with 1:100 dilution of FITC-vWF. Scale bar represents 100 μ m (original magnification $\times 200$). Images shown are representative of 10 EPC cultures.

markers indicating an endothelial-like phenotype. Moreover, vWF expression was also evaluated by fluorescence microscopy and all the cells were uniformly positive for this marker (Fig. 4C).

Therefore, our modified culture procedure successfully achieves the isolation of EPC with endothelial cell-like phenotype.

EPC functional parameters

To further confirm the excellence of obtained cultured EPC, the functional ability of EPC in cultures was evaluated in terms of cell growth kinetics, proliferation, adhesion and vasculogenesis. EPC functional parameters were compared with those obtained for HUVEC, the well-accepted endothelial cell model for studies *in vitro*.

Endothelial progenitor cells and HUVEC growth curves are presented in Figure 5A. Cells were counted every day until cells reached

confluence. Endothelial progenitor cells showed longer lag phase (2.4 days) compared with HUVEC (1.3 days; $P < 0.05$). Endothelial progenitor cells cultures were found to have shorter exponential growth phase. Endothelial progenitor cells plateau growth phase was reached on the 4th day after seeding at a saturation density of 5.2×10^5 cells/cm². By contrast, HUVEC reached plateau growth phase on the 5th day after seeding at a saturation density of 17.7×10^5 cells/cm² ($P < 0.001$; Fig. 5A).

Cell proliferation was studied both in starvation and after stimulation with complete EGM-2 media, after 48 hrs of starvation (Fig. 5B). In starved conditions, about 10% of cells were proliferating. When cells were stimulated with complete media, the percentage of cells actively involved in proliferation was increased four- to sixfold ($P < 0.05$ versus starvation). No differences in proliferation capacity between EPC and HUVEC cultures were found under starvation conditions or under induced conditions.

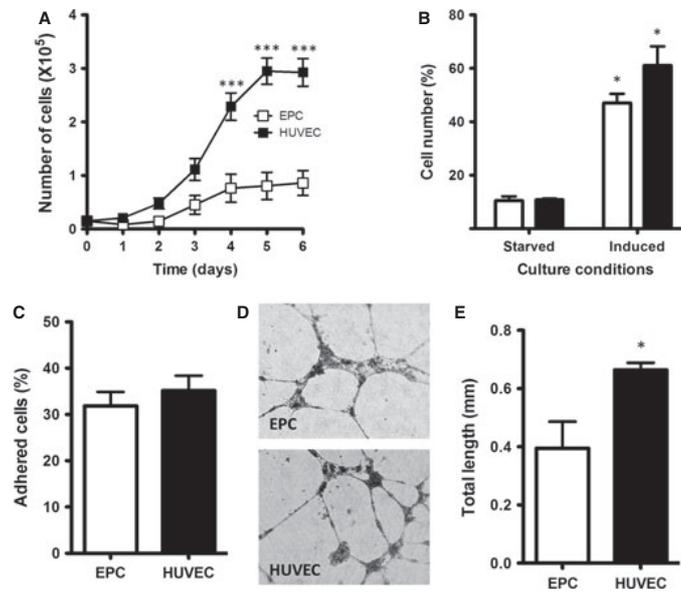


Fig. 5 Cultured endothelial progenitor cells' (EPC) functional characterization. **(A)** Growth curve of EPC and human umbilical vein endothelial cell (HUVEC) cultures followed up for 6 days. 15,000 cells were seeded on day one in 24-well plates and then counted daily. Results represent the number of cells from each culture counted every day ($***P < 0.001$ versus EPC by two-way ANOVA and Bonferroni's post-hoc test; $n = 10$). **(B)** Cell proliferation of EPC and HUVEC after stimulation with full endothelial growing media (EGM)-2. EPC were starved for 48 hrs and then stimulated with complete EGM-2 media for additional 18 hrs. Cells were harvested, stained with propidium iodide solution and measured by flow cytometry. Results represent the number cells in proliferation (mitosis plus interphase) for EPC (white) and HUVEC (black), expressed as a percentage of total cells ($*P < 0.05$ versus same starved cell type by Student's *t*-test; $n = 10$). **(C)** Cell adhesion of EPC and HUVEC. 50,000 cells were seeded on 2.5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ fibronectin-treated dishes with 4 mm^2 grid. Results represent the percentage of attached cells 30 min. after seeding as indicated in the Methods section ($n = 10$). **(D)** The vasculogenesis capacity of EPC and HUVEC seeded on Matrigel is shown in the representative images of tube-like structures formed by EPC and HUVEC (original magnification $\times 40$). 15,000 cells were seeded onto matrigel matrix diluted 1:1 with serum-free complete EGM-2 media and incubated for 8 hrs. **(E)** Total length analysis of tube-like structures for each sample ($*P < 0.05$ by Student's *t*-test; $n = 10$).

The cell adhesion function was evaluated by the cell ability to adhere to an extracellular matrix of fibronectin for 30 min. Results showed no differences between EPC and HUVEC (32% versus 35%, respectively; Fig. 5C).

Vasculogenesis, the ability to form tube-like structures, was assessed *in vitro* by seeding the cells on Matrigel matrix. All EPC and HUVEC cultures were able to organize themselves into similar tube-like structures (Fig. 5D). After 8 hrs of incubation, total length for these structures was measured. Human umbilical vein endothelial cells cultures formed larger tube-like structures ($664 \pm 25 \mu\text{m}$) when compared with those formed by EPC cultures ($394 \pm 92 \mu\text{m}$; $P < 0.05$; Fig. 5E).

Discussion

This study standardizes the most controllable conditions for optimal isolation and culture of EPC from peripheral blood samples, the

less invasive source for EPC available so far. Our results point to the need to control a number of parameters related to the sample collection and to the culture conditions to obtain an optimal functional performance of EPC. The conditions tested indicate (i) peripheral blood should be recovered in heparin tubes; (ii) in a minimum volume of 30 ml; (iii) blood samples should be processed within 2 hrs after collection; (iv) fibronectin is the best extracellular matrix and (v) culture media should be supplemented with 20% FBS.

Knowledge of EPC biology represents an advance in the understanding of vascular repair mechanisms in physiological and pathological situations. Furthermore, the fact of being able to successfully isolate and culture EPC makes us closer to test them for potential clinical applications in regenerative and anticancer therapies [12, 13].

In this regard, the use of standard procedures for isolating and culturing EPC is the only way to obtain comparable results. Different culture procedures could lead to the isolation of different cell types

with very different properties. A good example of this fact is the great difference in morphology, phenotype and behaviour between the so-called early and late EPC where time is the main difference condition for EPC culture and isolation (for a review, see [20]) Because of the complex procedures for EPC isolation and culture, the comparison of different works is quite challenging if not sometimes impossible. There is a lack, however, of a methodical comparison of different parameters for EPC isolation and culture.

Blood recovery and handling are an extremely important step in EPC isolation as anticoagulants and sample timing handling may affect EPC integrity. In some cases, other anticoagulants have been used, although their effect on EPC isolation and culture yields, to our knowledge, has not been systematically compared. Our results suggest that correct sample handling would involve the use of heparin as anticoagulant.

An important variable when using human samples, especially to apply the procedure to patients in different circumstances, is the time spent between blood sample collection and its processing. In our study, a sample process time inferior to 2 hrs after withdrawal is mandatory to obtain the highest EPC culture yields.

Regarding culture conditions, two important parameters demonstrated an important impact on the probability to obtain an EPC culture and the mean appearance time. On the one hand, the use of fibronectin as matrix to coat cell culture superficies triplicated the success and half-reduced the appearance time, in agreement with previous reports where EPC showed a greater adherence on fibronectin matrix than collagen [1]. On the other hand, the FBS, which is commonly added to cell culture media as a source of growth factors, cytokines and essential nutrients, is also critical to increase the likelihood to obtain EPC cultures and to reduce the EPC appearance mean time.

As previously reported, the volume used to isolate EPC from peripheral blood samples ranged from 50 to 100 ml [14, 21]. However, a minor volume of blood sample of 20 ml was required when the origin was human umbilical cord blood samples [14] probably because of a higher content in progenitor cells. Taken together, our results suppose a reduction in blood sample volumes and culture mean time than those found earlier for peripheral blood samples and a significant increase in the success rates (compared to 13% achieved in other studies [22]).

Circulating EPC levels change with several physiological conditions, such as menopause [23], physical training or ageing [24]. Acute disorders, such as myocardial infarction [25] or vascular trauma [26], increase the number of circulating EPC in blood samples. Conversely, an inverse correlation between EPC number and risk factors has been described in coronary artery disease [27].

The present study demonstrated an inverse correlation between the number of cEPC and EPC appearance mean time in culture, suggesting that the higher the number of circulating EPC in blood samples, the higher is the likelihood and the shorter the time to successfully obtain EPC cultures out of them. This information is of great importance if our proposed procedure is intended for EPC isolation, culture and cell therapy. In this case, previous EPC mobilization would be strongly recommended to ensure high yields and time reduction in EPC cultures, particularly in those

pathologies where EPC numbers have been reported to be reduced [27].

But not only is the yield of the method important but the functional characteristics of the obtained EPC. The morphological, phenotypical and functional characteristics of cultured EPC were comparable to endothelial cells from other sources, such as HUVEC. Cultured EPC showed a cobblestone-like morphology was positive for LDL uptake and Ulex-lectin binding, expressed progenitor antigen CD34 as well as endothelial antigens CD31, KDR, vWF while lack the expression of hematopoietic marker CD45. Our procedure give rise to EPC with similar traits to the so-called late EPC, endothelial colony forming cells or endothelial outgrowth cells [11, 14, 20, 21].

Endothelial progenitor cells obtained under the best conditions exhibited functional parameters comparable to those obtained for HUVEC in terms of growth curve, cell proliferation and adhesion and vasculogenesis. In spite of cultured EPC showed reduced growth (which can be attributed to the longer lag phase) and vasculogenic capabilities than HUVEC, no differences were found in proliferative and adhesive capabilities between these two cell types. Therefore, the culture conditions provided are not only an adequate tool to study EPC but also a source of endothelial cells from adults.

The agreement on EPC definition (CD34⁺KDR⁺ phenotype) represents the best compromise in terms of detection accuracy, biological meaning and clinical usefulness [28], as well as the development of standardized procedures for EPC isolation and culture opens the use of EPC for clinical application.

In summary, we presented a standard protocol for EPC isolation and culture from human peripheral blood. Additional *in vivo* testing of the isolated EPC following our procedure must be performed to fully characterize the possible potential of this cell population for cell therapy use and regenerative medicine.

Acknowledgements

This study was supported by the Spanish Ministerio de Ciencia e Innovación, Instituto de Salud Carlos III - FEDER-ERDF (grants FIS PI08/0272, PI10/00518 and Red Cardiovascular RD12/0042/0052 and RD12/0042/0010) and Consellería de Educación, Generalitat Valenciana (grant ACOMP/2013/171). DPC is an "Atracció de Talent" fellow (Univ. Valencia).

Conflicts of interest

The authors confirm that there are no conflicts of interest.

Supporting information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article:

Figure S1 Phenotypic characterization of cells isolated from citrate tube collected blood. Bright field images of cell cultures (A) $\times 40$ and

(B) $\times 200$ magnification. Fluorescence microscopy of Dil-Ac-LDL uptake (C), FITC-UEA-1 binding (D), DAPI nuclei staining (E) and merged images (F) are shown. Cells were incubated with 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of Ac-LDL for 1 hr, fixed with 4% paraformaldehyde and then incubated with 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ FITC-Ulex-lectin. Counterstaining was achieved by 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ DAPI staining. Scale bar represents 100 μm (original magnification for fluorescence microscopy images: $\times 200$).

Figure S2 Influence of processing time on the success of EPC cultures. Blood samples were divided into two sets. One was processed within 2 hrs and the other 24 hrs after withdrawal. The success of EPC culture was expressed as the

percentage of EPC cultures obtained ($*P < 0.05$ by Chi-squared test; $n = 10$).

Figure S3 MNC culture and EPC isolation. Representative images of EPC cultures. (A) MNC after seeding. After 24 hrs of incubation, non-adhered cells were removed and attached cells (B) were further cultivated. On day 15 of culture, first EPC colonies appeared (C). EPC colonies were cultured for 7 days or until they reached confluence (D). All the pictures above shown were taken at $\times 100$ magnification.

Table S1 Characteristics of healthy individuals.

References

- Asahara T, Murohara T, Sullivan A, *et al.* Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science*. 1997; 275: 964–6.
- Asahara T, Masuda H, Takahashi T, *et al.* Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circ Res*. 1999; 85: 221–8.
- Nolan DJ, Ciarrocchi A, Mellick AS, *et al.* Bone marrow-derived endothelial progenitor cells are a major determinant of nascent tumor neovascularization. *Genes Dev*. 2007; 21: 1546–58.
- Geft D, Schwartzberg S, George J. Circulating endothelial progenitor cells in cardiovascular disorders. *Expert Rev Cardiovasc Ther*. 2008; 6: 1115–21.
- Schmidt-Lucke C, Rössig L, Fichtlscherer S, *et al.* Reduced number of circulating endothelial progenitor cells predicts future cardiovascular events: proof of concept for the clinical importance of endogenous vascular repair. *Circulation*. 2005; 111: 2981–7.
- Yoder MC. Human endothelial progenitor cells. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2012; 2: a006692.
- Shantsila E, Watson T, Tse HF, *et al.* New insights on endothelial progenitor cell subpopulations and their angiogenic properties. *J Am Coll Cardiol*. 2008; 51: 669–71.
- Hill JM, Zalos G, Halcox J, *et al.* Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk. *N Engl J Med*. 2003; 348: 593–600.
- Wojakowski W, Landmesser U, Bachowski R, *et al.* Mobilization of stem and progenitor cells in cardiovascular diseases. *Leukemia*. 2012; 26: 23–33.
- Ingram DA, Caplice NM, Yoder MC. Unresolved questions, changing definitions, and novel paradigms for defining endothelial progenitor cells. *Blood*. 2005; 106: 1525–31.
- Hirschi KK, Ingram DA, Yoder MC. Assessing identity, phenotype, and fate of endothelial progenitor cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2008; 28: 1584–95.
- Khakoo AY, Finkel T. Endothelial progenitor cells. *Annu Rev Medicine*. 2005; 56: 79–101.
- Debatin KM, Wei J, Beltinger C. Endothelial progenitor cells for cancer gene therapy. *Gene Ther*. 2008; 15: 780–6.
- Ingram DA, Mead LE, Tanaka H, *et al.* Identification of a novel hierarchy of endothelial progenitor cells using human peripheral and umbilical cord blood. *Blood*. 2004; 104: 2752–60.
- Sobrinho A, Oviedo PJ, Novella S, *et al.* Estradiol selectively stimulates endothelial prostacyclin production through estrogen receptor α . *J Mol Endocrinol*. 2010; 44: 237–46.
- Voyta JC, Via DP, Butterfield CE, *et al.* Identification and isolation of endothelial cells based on their increased uptake of acetylated-low density lipoprotein. *J Cell Biol*. 1984; 99: 2034–40.
- Holthofer H, Virtanen I, Kariniemi AL, *et al.* Ulex europaeus I lectin as a marker for vascular endothelium in human tissues. *Lab Invest*. 1982; 47: 60–6.
- Krishan A. Rapid flow cytometric analysis of mammalian cell cycle by propidium iodide staining. *J Cell Biol*. 1975; 66: 188–93.
- Mezentsev A, Merks RMH, O'Riordan E, *et al.* Endothelial microparticles affect angiogenesis *in vitro*: role of oxidative stress. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005; 289: H1106–14.
- Fadini GP, Losordo D, Dimmeler S. Critical reevaluation of endothelial progenitor cell phenotypes for therapeutic and diagnostic use. *Circ Res*. 2012; 110: 624–37.
- Lin Y, Weisdorf DJ, Solovey A, *et al.* Origins of circulating endothelial cells and endothelial outgrowth from blood. *J Clin Invest*. 2000; 105: 71–7.
- Campioni D, Zauli G, Gambetti S, *et al.* *In vitro* characterization of circulating endothelial progenitor cells isolated from patients with acute coronary syndrome. *PLoS ONE*. 2013; 8: e56377.
- Hutter R, Badimon JJ, Fuster V, *et al.* Coronary artery disease in aging women: a menopause of endothelial progenitor cells? *Med Clin North Am*. 2012; 96: 93–102.
- Van Craenenbroeck EM, Conraads VM. Endothelial progenitor cells in vascular health: focus on lifestyle. *Microvasc Res*. 2010; 79: 184–92.
- Shintani S, Murohara T, Ikeda H, *et al.* Mobilization of endothelial progenitor cells in patients with acute myocardial infarction. *Circulation*. 2001; 103: 2776–9.
- Gill M, Dias S, Hattori K, *et al.* Vascular trauma induces rapid but transient mobilization of VEGFR2 + AC133 + endothelial precursor cells. *Circ Res*. 2001; 88: 167–74.
- Vasa M, Fichtlscherer S, Aicher A, *et al.* Number and migratory activity of circulating endothelial progenitor cells inversely correlate with risk factors for coronary artery disease. *Circ Res*. 2001; 89: e1–7.
- Fadini GP, Baesso I, Albiero M, *et al.* Technical notes on endothelial progenitor cells: ways to escape from the knowledge plateau. *Atherosclerosis*. 2008; 197: 496–503.



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Molecular and Cellular Cardiology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/yjmcc

Original article

Mobilization of endothelial progenitor cells in acute cardiovascular events in the PROCELL study: Time-course after acute myocardial infarction and stroke



Ander Regueiro^{a,*}, Elisa Cuadrado-Godia^b, Carlos Bueno-Betí^c, Maribel Diaz-Ricart^d, Anna Oliveras^e, Susana Novella^c, Gemma González Gené^g, Carole Jung^g, Isaac Subirana^h, Jose Tomás Ortiz-Pérez^a, Mercè Roqué^a, Xavier Freixa^a, Julio Núñez^f, Gines Escolar^d, Jaume Marrugat^h, Carlos Hermenegildo^c, Miguel Angel Valverde^g, Jaume Roquer^b, Juan Sanchis^f, Magda Heras^a

^a Cardiology Department, Thorax Institute, Hospital Clínic, IDIBAPS, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain

^b Neurology Department, Hospital del Mar, IMIM (Hospital del Mar Medical Research Institute), DCEXS Universitat Pompeu Fabra, Barcelona, Spain

^c INCLIVA Biomedical Research Institute, Hospital Clínico de Valencia, Department of Physiology, Universitat de València, Valencia, Spain

^d Hemotherapy-Hemostasis Department, Biomedical Diagnostics Center CDB, Hospital Clínic, IDIBAPS, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain

^e Nephrology Department, Hospital del Mar, Universitat Autònoma de Barcelona, IMIM (Hospital del Mar Medical Research Institute), Barcelona, Spain

^f Cardiology Department, Hospital Clínic Universitario, School of Medicine, Universitat de València, Valencia, Spain

^g Laboratory of Molecular Physiology and Channelopathies, Department of Experimental and Health Sciences, Universitat Pompeu Fabra, Barcelona, Spain

^h Epidemiology and Cardiovascular Genetic Group, IMIM (Hospital del Mar Medical Research Institute), Barcelona, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 17 September 2014

Received in revised form 8 January 2015

Accepted 13 January 2015

Available online 22 January 2015

Keywords:

Endothelial progenitor cell

Cell-adhesion molecule

Myocardial infarction

Stroke

ABSTRACT

The mobilization pattern and functionality of endothelial progenitor cells after an acute ischemic event remain largely unknown. The aim of our study was to characterize and compare the short- and long-term mobilization of endothelial progenitor cells and circulating endothelial cells after acute myocardial infarction or atherothrombotic stroke, and to determine the relationship between these cell counts and plasma concentrations of vascular cell adhesion molecule (VCAM-1) and Von Willebrand factor (VWF) as surrogate markers of endothelial damage and inflammation. In addition, we assessed whether endothelial progenitor cells behave like functional endothelial cells. We included 150 patients with acute myocardial infarction or atherothrombotic stroke and 145 controls. Endothelial progenitor cells [CD45⁻, CD34⁺, KDR⁺, CD133⁺], circulating endothelial cells [CD45⁻, CD146⁺, CD31⁺], VWF, and VCAM-1 levels were measured in controls (baseline only) and in patients within 24 h (baseline) and at 7, 30, and 180 days after the event. Myocardial infarction patients had higher counts of endothelial progenitor cells and circulating endothelial cells than the controls (201.0/mL vs. 57.0/mL; $p < 0.01$ and 181.0/mL vs. 62.0/mL; $p < 0.01$). Endothelial progenitor cells peaked at 30 days post-infarction (201.0/mL vs. 369.5/mL; $p < 0.01$), as did VCAM-1 (573.7 ng/mL vs. 701.8 ng/mL; $p < 0.01$). At 180 days post-infarction, circulating endothelial cells and VWF decreased, compared to baseline. In stroke patients, the number of endothelial progenitor cells – but not circulating endothelial cells – was higher than in controls (90.0/mL vs. 37.0/mL; $p = 0.01$; 105.0/mL vs. 71.0/mL; $p = 0.11$). At 30 days after stroke, however, VCAM-1 peaked (628.1/mL vs. 869.1/mL; $p < 0.01$) but there was no significant change in endothelial progenitor cells (90/mL vs. 78/mL; $p < 0.34$). At 180 days after stroke, circulating endothelial cells and VWF decreased, compared to baseline. Cultured endothelial progenitor cells from controls and myocardial infarction patients had endothelial phenotype characteristics and exhibited functional differences in adhesion and Ca^{2+} influx, but not in proliferation and vasculogenesis. In myocardial infarction patients, VCAM-1 levels and mobilization of endothelial progenitor cells peaked at 30 days after the ischemic event. Although a similar VCAM-1 kinetic was observed in stroke patients, endothelial progenitor cells did not increase. Endothelial progenitor cells had mature endothelial capabilities *in vitro*.

© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Abbreviations: AMI, acute myocardial infarction; CECs, circulating endothelial cells; EPCs, endothelial progenitor cells; NIHSS, National Institutes of Health Stroke Scale; NSTEMI, non-ST-segment myocardial infarction; STEMI, ST-segment elevation myocardial infarction; TIA, transient ischemic attack; VCAM, vascular cell adhesion molecule; VEGF, vascular endothelial growth factor; VWF, Von Willebrand factor.

* Corresponding author at: Cardiology Department, Hospital Clínic, IDIBAPS, University of Barcelona, Villarroel 170, 08036 Barcelona, Spain. Tel.: +34 93 227 93 05.

E-mail address: aregueir@clinic.ub.es (A. Regueiro).

1. Introduction

Acute myocardial infarction (AMI) and atherothrombotic stroke are hallmark examples of endothelial damage complicated by superimposed thrombosis [1,2]. After an endothelial injury, circulating endothelial cells (CECs) are detached from the intimal monolayer [3] and

endothelial progenitor cells (EPCs) are mobilized from the bone marrow into the peripheral circulation. EPCs can then differentiate into mature endothelial cells, initiating an ideal self-reparative process [4–6].

Increased CEC counts have been described in cardiovascular disease. A higher number of CECs predict adverse events after an acute coronary syndrome [7]. The CEC count has been shown to correlate with other markers of vascular disease such as Von Willebrand factor (VWF) in the acute phase after a myocardial infarction [8]. On the other hand, a reduction in EPCs has been associated with the presence of cardiovascular risk factors [9,10] and with a worse prognosis after ischemic events [11–14]. Systemic inflammation could play a role in the peripheral mobilization of EPCs [15]. Vascular cell adhesion molecule (VCAM)-1 is expressed and upregulated on endothelial cells of atherosclerotic lesions and is a marker of inflammation in atherosclerosis [16].

Information about long-term EPC mobilization and CEC counts after acute ischemic events is scarce because previous studies have been limited to the acute and subacute phase. To our knowledge, no studies have analyzed both cell subtypes after AMI or stroke. In addition, it is unknown if the EPC and CEC counts are correlated with known markers of endothelial injury and activation at different time points. Describing the long-term kinetics of EPC mobilization after two different ischemic events is important to better understand the pathophysiology of endothelial injury and repair.

This study had three objectives: (1) to characterize and compare the short- and long-term mobilization pattern of EPCs and CECs following AMI or stroke; (2) to determine the relationship between cell counts and plasma concentrations of VCAM-1 and VWF at different time points; and (3) to assess whether EPCs behave like functional endothelial cells in terms of cell adhesion, growth curve, vasculogenesis, and intracellular calcium signals triggered by endothelial activators.

2. Methods

The PROCELL study was a multicenter, prospective, population-based, case-control study paired by sex and age. The study protocol was approved by the Institutional Ethics Committees of the three participating hospitals in Spain. All patients gave a written informed consent to participate.

2.1. Study population

Between February 2009 and July 2012, we included 150 patients with AMI or stroke and 145 controls. Controls were recruited from a cross-sectional study nested in the REGICOR cohort study [17]. All included patients participated in follow-up at 7, 30, and 180 days.

2.1.1. AMI patients

We enrolled 100 consecutive patients with AMI. Inclusion criteria were age ≤ 75 years, with a first AMI and more than one traditional cardiovascular risk factor. Exclusion criteria were previously documented coronary artery disease and established statin therapy, because statins can modify EPC and CEC kinetics. All AMI patients received treatment according to current guidelines, including atorvastatin (40 mg per day at admission, modified during follow-up to achieve <70 mg/dL LDL).

2.1.2. Stroke patients

The study enrolled 50 consecutive patients with acute ischemic stroke or transient ischemic attack (TIA) of atherothrombotic origin. Inclusion criteria were age ≤ 75 years and initial severity <20 on the National Institutes of Health Stroke Scale (NIHSS). Exclusion criteria were previously documented stroke, disability (modified Rankin scale >2), or established statin therapy, which can modify EPC and CEC kinetics.

All patients with stroke/TIA were admitted to a stroke unit and a vascular neurologist used the NIHSS to categorize three groups of stroke severity (mild < 7 , moderate = 7–14, and high < 14). All strokes were assessed by an initial computed tomography scan performed at

admission. Control neuroimaging was performed using computed tomography or magnetic resonance imaging. Under current guidelines, all stroke patients received the same treatment as patients with AMI.

2.1.3. Control group

Participants in the REGICOR cohort study [18] who were free of selected cardiovascular risk factors (hypertension, dyslipidemia, diabetes) were invited to participate in this study. Controls were matched by age and sex.

2.2. Endothelial progenitor cell and circulating endothelial cell counts

Blood samples were collected into low-molecular-weight heparin tubes and processed twice within 4 h of extraction. Circulating EPC and CEC counts were determined by flow cytometry (FC5000 cytometer, Beckman-Coulter, Madrid, Spain). EPCs were defined as negative for CD45 and positive for CD34, KDR, and CD133 [CD45 – CD34 + KDR + CD133 +]. CECs were defined as negative for CD45 and positive for CD146 and CD31 [CD45 – CD146 + CD31 +], as previously described [19]. Counts were calculated by multiplying the ratio of EPCs and CECs obtained in the flow cytometry analysis by the number of leukocytes/mL in the blood sample to obtain the absolute number of EPCs and CECs per 1 mL of whole blood.

2.3. Endothelial progenitor cell culture and characterization

Peripheral blood samples were collected from controls upon inclusion and from AMI patients within 24 h of the event. Blood was recovered in heparinized tubes and processed within 2 h. Unfortunately, the hospital from which stroke patients were recruited was too far from the lab to process the samples within this time limit; in this group, therefore, EPCs were not isolated and cultured in vitro. Mononuclear cells were isolated by density gradient centrifugation. After isolation, mononuclear cells were seeded on fibronectin-treated culture dishes. After 24 h, nonadhered cells were removed and attached cells were further cultured up to 30 days, as previously described [20].

2.4. Functional characterization of cultured endothelial progenitor cells

2.4.1. Cell adhesion

EPC adhesion was defined as the cells' ability to adhere to a fibronectin matrix. Two independent observers counted adhered cells in 6 random squares. Data were expressed as percentage of adhered cells related to total number of seeded cells.

2.4.2. Cell proliferation

Cell-cycle phases were determined by propidium iodide staining to determine cell DNA content and flow cytometry. To determine the proliferative response to the growth factors contained in EGM-2 culture media, confluent EPC cultures were starved for 48 h, stimulated for 18 h, and then proliferative cells were counted. The EPCs were recovered, fixed, and stained with propidium iodide-RNase solution (Immunostep, Salamanca, Spain) for 15 min. Stained cells were analyzed with FC500 cytometer and Infinicyt software (Cytognos, Salamanca, Spain).

2.4.3. Growth curve

To determine the expansion capacity over time, EPCs were seeded on 24-well plates (1.5×10^4 cells/well), and media was changed daily. For 6 days, cells were harvested daily, pelleted, and re-suspended in Trypan blue solution (Sigma Aldrich). Viable EPCs were determined by counting cells in a modified Neubauer chamber.

2.4.4. Vasculogenesis

The ability of EPCs to form capillary-like structures was determined by seeding 1.5×10^5 EPCs on Matrigel-pretreated plates. Total length of capillary-like structures is expressed in micrometers.

2.4.5. Measurement of intracellular $[Ca^{2+}]$

Cytosolic Ca^{2+} signals were determined at room temperature ($-24^{\circ}C$) in cells loaded with $4.5 \mu M$ fura-2 · AM for 30 min, as previously described [21]. Videomicroscopic measurements of $[Ca^{2+}]$ were obtained using an Olympus IX70 inverted microscope (Hamburg, Germany) with a $40\times$ oil-immersion objective (Olympus). A Polychrome IV monochromator (Till Photonics, Martinsried, Germany) supplied the excitation light (340 and 380 nm), which was directed toward the cells in the field of view by a 505DR dichromatic mirror (Omega Optical, Brattleboro, VT). Images were passed through a 535DF emission filter (Omega Optical) and collected by a digital charge-coupled device camera (Hamamatsu Photonics, Hamamatsu City, Japan), using the AquaCosmos software program (Hamamatsu Photonics). The 340/380 nm ratio images were computed every 5 s. Cytosolic $[Ca^{2+}]$ increases were presented as the ratio of emitted fluorescence (510 nm) after excitation at 340 nm and 380 nm, relative to the ratio measured before cell stimulation (340/380 ratio). To evaluate time-dependent differences in EPC response to vascular endothelial growth factor (VEGF), we measured Ca^{2+} signals at 0, 7, and 180 days post-AMI. Relative changes in intracellular Ca^{2+} were measured in EPCs loaded with the fluorescent Ca^{2+} indicator fura-2. To distinguish endoplasmic reticulum Ca^{2+} release from Ca^{2+} influx, EPCs were exposed to VEGF (100 ng/mL) in the absence of extracellular Ca^{2+} and after addition of Ca^{2+} to the external medium.

2.5. Vascular cell adhesion molecule and Von Willebrand factor

Peripheral blood samples were withdrawn from controls (baseline only) and in patients within 24 h after the ischemic event, and at 7, 30, and 180 days. VWF antigen and plasma levels of soluble VCAM-1 were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (DG-EIA VWF®, Grifols; Barcelona, Spain and Millipore Corporation, Billerica, MA, USA, respectively).

2.6. Outcome measures and endpoints

2.6.1. Primary objectives

- To obtain EPC and CEC counts in controls (baseline) and <24 h after an AMI or a stroke and at 7, 30, and 180 days of follow-up.
- To compare EPC and CEC counts between controls and patients.

2.6.2. Secondary objectives

- To test correlation of EPC count with VCAM-1 levels, and CEC count with VWF levels.
- To test correlation of EPC and CEC counts with severity of the ischemic event as assessed by magnetic resonance imaging and degree of disability.
- To characterize cultured EPC function: cell adhesion, proliferation, growth curve, vasculogenesis, and intracellular Ca^{2+} signals in response to VEGF, in controls and AMI patients at 0, 7, and 180 days after the event.

2.7. Statistical analysis

Mean, standard deviation, and Student t test were computed for continuous normally distributed variables, and frequencies and chi-square test were performed for categorical variables. CEC and EPC counts are presented as median and interquartile range. Comparison between groups was performed using unpaired Mann–Whitney U test.

Linear mixed models, which take into account the repeated measures within individuals, were performed to assess changes over time in AMI and stroke cases. All the models were adjusted by age, taking “CEC” and “EPC” as the response variable and study group (AMI/Stroke), time

(baseline, 7 days, 30 days, and 180 days) and group:time interaction as factors. The variable of main interest was the group:time interaction, which assessed whether changes in response time differed between AMI and stroke patients. In each model, the response was logarithmically transformed using normality assumptions. Patients with zero values in response were assigned randomly to values near zero, and multiple imputation techniques were used to summarize the estimated results. Data analyses were performed using version 3.0.1 of the R statistical program (R Development Core Team).

3. Results

3.1. Study population

The study flowchart is depicted in Fig. 1. The demographics and clinical characteristics of the study population are shown in Table 1. Patients with AMI were younger (53.7 vs. 64.5 years; $p < 0.01$) and had a lower prevalence of hypertension (27% vs. 68%; $p < 0.01$), diabetes mellitus (20% vs. 68%; $p < 0.01$), hypercholesterolemia (11% vs. 28%; $p < 0.01$), and a higher prevalence of cigarette smoking (74% vs. 56%; $p < 0.01$) than patients with stroke. Following discharge, AMI patients were more frequently treated with aspirin (99% vs. 78%; $p < 0.01$), clopidogrel (95% vs. 24%; $p > 0.01$), beta-blockers (85% vs. 6%; $p < 0.01$), and angiotensin-converting enzyme inhibitors or angiotensin receptor blockers (85% vs. 44%) than were patients with stroke. The prescription of statins at discharge was similar between AMI and stroke patients (100% vs. 98%; $p = 0.94$).

3.1.1. AMI patients

One hundred consecutive AMI patients were recruited. Eighty-seven presented with ST-segment elevation myocardial infarction (STEMI), and 13 with non-STEMI. Coronary angiography was performed in all patients. In the STEMI group, primary percutaneous coronary intervention was the revascularization method in 66 (76%) patients and fibrinolysis in 15 (17%). Seven (54%) patients initially treated with fibrinolysis were subsequently treated with percutaneous coronary intervention. Killip > 1 was observed in 13 (13%) patients. In-hospital left-ventricular ejection fraction measured by cardiac magnetic resonance imaging was $50.6 \pm 11.8\%$. Infarct size, expressed as percentage of left ventricular mass, was $17.2 \pm 13.8\%$, with a 45% prevalence of microvascular obstruction (≥ 1 segment).

3.1.2. Stroke patients

Fifty patients were recruited, 35 (70%) with a diagnosis of stroke and 15 (30%) with TIA. The prevalence of classical vascular risk factors is summarized in Table 1. Neurological symptoms were classified as total anterior circulation stroke in 4 (8%) patients, partial anterior circulation stroke in 21 (42%), posterior circulation stroke in 10 (20%), lacunar stroke in 14 (28%), and transient monocular blindness in one patient (2%). Initial severity was mild in 44 (88%), moderate in 2 (4%), and high in 4 (8%) patients. The stenosis degree in the symptomatic intracranial arteries was 30% to 50% in 14 (34%), 51% to 70% in 10 (20%), and $> 70\%$ in 21 (42%). Two patients had complete occlusion of the symptomatic artery. Two patients (4%) were treated with intravenous thrombolysis and 12 patients (24%) with delayed surgical or endovascular revascularization therapies. Disability was present in 9 (18%) patients at discharge, but persisted in only one patient (2%) at 180 days.

3.2. EPC and CEC counts and kinetics

3.2.1. AMI patients

At baseline, EPC and CEC counts were higher than in controls. During follow-up, both counts were also higher at 7, 30, and 180 days, compared to controls (Table 2). Over time, intra-subject EPC peaked at day

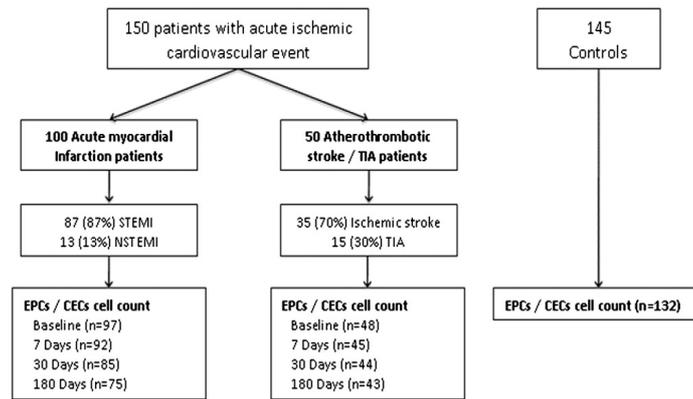


Fig. 1. Study flowchart.

30, and decreased thereafter up to 180 days post-event; CEC counts showed a progressive decrease in patients with AMI (Fig. 2).

3.2.2. Stroke patients

At baseline, EPC count — but not CEC count — was higher in stroke patients than in controls (Table 3). At 180 days of follow-up, there was no significant change in intra-subject EPC and CEC count over time for patients with stroke (Fig. 2).

3.2.3. Comparison between AMI and stroke patients

Patients with AMI had higher EPC and CEC counts than stroke patients at all time-points measured. The differences were statistically significant, except for CECs at 30 days (supplementary appendix, Table 4).

3.3. Correlation of EPC and CEC count according to severity of disease

There was no relationship between the number of EPCs or CECs and infarct size, microvascular obstruction, or troponin peak (data not shown). Similarly, baseline EPC or CEC count was not associated with stroke severity, OXFORD classification, or degree of stenosis. However, there was a trend to higher EPC counts at 7 days in stroke patients with a high degree of stenosis (>70%), compared to mild stenosis (138.0/mL vs. 57.0; $p = 0.07$).

3.4. Correlations of EPCs and CECs with VCAM-1 and VWF

VCAM-1 levels and VWF plasmatic concentrations and intrasubject kinetics are shown in Tables 2, 3, and 4 (supplementary appendix) and Fig. 3. Correlation coefficients between VCAM-1 and EPC counts,

and between VWF and CEC counts were not statistically significant at any time point (Table 5, supplementary appendix).

3.4.1. AMI patients

At baseline, VCAM-1 levels were similar in AMI patients and controls, peaking in the patient group at 30 days of follow-up. Intra-subject VCAM-1 and EPC changes were similar in these patients, both reaching their highest level at 30 days of follow-up (Figs. 2A and 3A).

Plasma concentration of VWF was higher in AMI patients than in controls at baseline, and had decreased continuously at 180 days of patient follow-up. Intra-subject VWF concentration kinetics and that of CECs were similar, with their highest level at baseline, decreasing thereafter (Figs. 2C and 3C).

3.4.2. Stroke patients

VCAM-1 levels at baseline were similar between stroke patients and controls. VCAM-1 peaked after 30 days of patient follow-up. There were no similarities between intra-subject EPCs and VCAM-1 kinetics during follow-up (Figs. 2B and 3B).

VWF was significantly higher in stroke patients at baseline than in controls. Plasma VWF concentration decreased from baseline until 180 days of follow-up in these patients and in intra-subject analysis (Figs. 2D and 3D).

3.5. Characterization of cultured EPCs

The first EPC colonies appeared at 13 ± 2 days after mononuclear seeding in two groups, controls and AMI patients. In order to ensure the successful isolation of EPC from blood samples in both groups,

Table 1
Demographics and clinical characteristics of all study groups.

	AMI n = 100	AMI controls n = 98	p value	Stroke n = 50	Stroke controls n = 47	p value
Age (years)	53.7 (10.2)	54.7 (9.6)	0.48	64.5 (9.4)	64.4 (9.3)	0.94
Males	85 (85.0%)	83 (84.7%)	0.95	42 (84.0%)	42 (84.0%)	1.00
Hypertension	27 (27.0%)	0	–	34 (68.0%)	0	–
Hypercholesterolemia	20 (20.0%)	0	–	21 (42.9%)	0	–
Diabetes mellitus	11 (11.0%)	0	–	14 (28.0%)	0	–
Current cigarette smoker	74 (74.0%)	0	–	28 (56.0%)	0	–
Total cholesterol (mmol/L)	5.10 (1.03)	5.11 (0.63)	0.96	5.15 (1.32)	5.07 (0.75)	0.71
LDL cholesterol (mmol/L)	3.33 (0.85)	3.28 (0.53)	0.69	3.33 (1.01)	3.3 (0.67)	0.61
Triglycerides (mmol/L)	1.89 (1.52)	0.95 (0.39)	<0.01	1.82 (0.99)	0.89 (0.38)	<0.01

AMI: acute myocardial infarction; LDL: low density lipoprotein.

Table 2

EPC counts, CEC counts, VCAM-1 and VWF plasmatic levels in AMI patients and controls.

	Controls	AMI patients			
	Baseline	Baseline	7 days	30 days	180 days
EPC/mL	57.0 [17.0:100.8]	201.0 [66.3:420.0] [*]	178.3 [86.0:349.6] [*]	369.5 [157.1:723.3] [*]	207.8 [103.0:452.5] [*]
CEC/mL	62.0 [19.0:118.0]	181.0 [109.0:360.9] [*]	198.1 [102.1:315.1] [*]	192.5 [63.8:407.9] [*]	118.0 [50.0:323.4] [*]
VCAM-1	532.1 [366.8:747.7]	573.7 [394.0:881.5]	569.6 [475.2:920.9]	701.8 [515.7:936.3] [†]	584.4 [375.8:811.2]
VWF	85.6 [70.9:108.8]	145.4 [102.5:180.4] [†]	137.5 [109.7:155.7] [*]	113.4 [82.7:139.5] [*]	106.9 [93.0:130.1] [*]

AMI: acute myocardial infarction; EPC: endothelial progenitor cells; CEC: circulating endothelial cells; VCAM: vascular cell adhesion molecule; VWF: Von Willebrand factor.

^{*} p value < 0.01 between controls and AMI patients.[†] p value < 0.05 between controls and AMI patients.

leukocyte antigen CD45, endothelial antigen KDR, and progenitor antigen CD34 expression were tested by flow cytometry (Fig. 4A) and VWF expression by immunofluorescence (Fig. 4B). All cultures were positive for the expression of VWF and KDR, and negative for CD45 antigen expression. CD34 was expressed in 45% of cultured cells. No differences in antigenic expression on EPC between controls and AMI patients were found (data not shown).

Further functional characterization was carried out in EPCs obtained from controls and AMI patients. The regeneration of damaged endothelial monolayer relies on the ability of EPCs to adhere, proliferate, and form tubular structures in vitro (vasculogenesis). Cultured EPCs were able to adhere to a fibronectin matrix in both groups, and the percentage

of attached EPCs was higher in AMI patients at baseline than in the healthy controls (32.35% vs. 23.12%, respectively; $p < 0.01$; Fig. 5A). No significant differences were observed in proliferative, growth, and vasculogenic capacities between EPCs isolated from controls and from AMI patients (Fig. 5B–D).

We also tested whether EPCs from healthy controls (Fig. 6A) and AMI patients (Fig. 6B–D) elicited intracellular Ca^{2+} increases in response to VEGF. In the absence of extracellular Ca^{2+} , VEGF elicited Ca^{2+} release from the endoplasmic reticulum (first peak), followed by Ca^{2+} influx (second peak) upon readdition of Ca^{2+} to the external medium. VEGF-mediated Ca^{2+} entry was increased in the EPCs obtained from AMI patients, peaking at day 0 (Fig. 6B). The SOCE response at

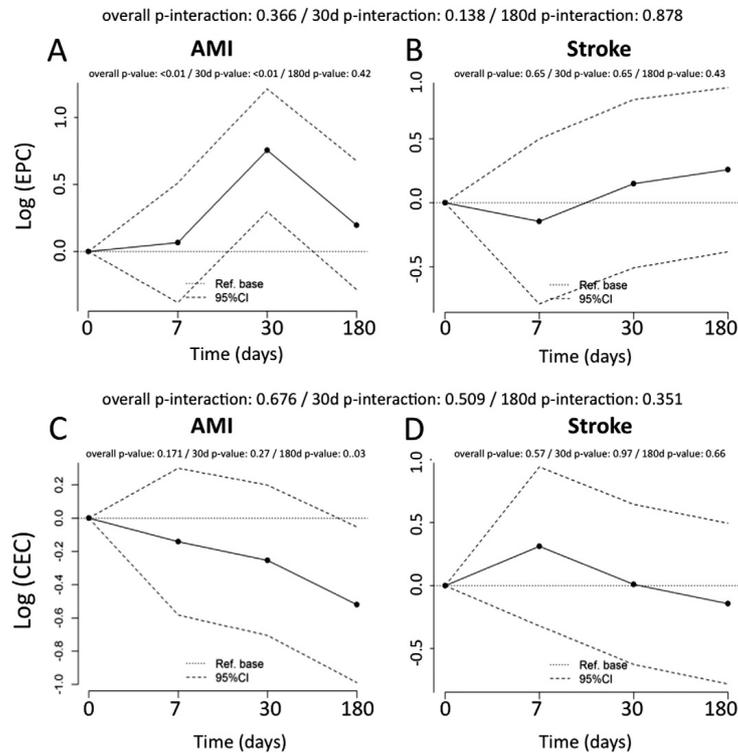


Fig. 2. Linear mixed model showing intra-subject changes in EPCs and CECs over time. EPC count in AMI patients (Panel-A), and stroke patients (Panel-B). CECs count in AMI patients (Panel-C), and stroke patients (Panel-D).

Table 3
EPC counts, CEC counts, VCAM-1 and VWF plasmatic levels in stroke patients and controls.

	Controls	Stroke patients			
	Baseline	Baseline	7-day follow-up	30-day follow-up	180-day follow-up
EPC/mL	37.0 [9.0:84.0]	90 [38.0:171.0] [*]	78.0 [33.0:165.0]	78.0 [27.0:228.0]	89.0 [38.0:164.0] [†]
CEC/mL	71.0 [32.0:146.0]	105.0 [39.5:193.5]	147.0 [55.0:198.0] [*]	140.0 [30.0:261.0]	71.0 [41.5:113.0]
VCAM-1	721.3 [510.1:878.8]	628.1 [528.2:953.7]	719.7 [565.0:1045.4]	869.7 [630.2:1093.6] [*]	800.4 [584.8:1054.1]
VWF	92.1 [69.1:110.3]	149.7 [114.0:165.6] [†]	135.3 [109.0:169.8] [†]	129.6 [104.0:149.3] [†]	119.7 [111.0:151.9] [†]

EPC: endothelial progenitor cells; CEC: circulating endothelial cells; VCAM: vascular cell adhesion molecule; VWF: Von Willebrand factor.

^{*} p value < 0.05 between controls and stroke patients.

[†] p value < 0.01 between controls and stroke patients.

7 days (Fig. 6C) and 180 days (Fig. 6D) did not differ between the healthy controls and AMI patients.

4. Discussion

Major findings of our study can be summarized as follows: (1) EPC and CEC counts in AMI and stroke patients were higher at baseline and after 7, 30, and 180 days, compared to healthy controls (baseline). (2) In patients with AMI, there was a peak in EPC and VCAM-1 levels at 30 days after the ischemic event. CEC counts decreased progressively from baseline to six-month follow-up. (3) In stroke patients, a peak in VCAM-1 at 30 days after the ischemic event was not accompanied by any change in EPC count from baseline to 30-day follow-up.

(4) Functionality of cultured EPCs from AMI patients was enhanced, compared to healthy controls.

4.1. EPC and CEC mobilization after AMI or stroke

EPC mobilization after AMI was first described by Shintani [22], but follow-up was limited to only 7 days. To our knowledge, the present study is the first to describe the kinetics of EPCs and CECs for up to 6 months after AMI or stroke. We observed an increased number of EPCs and CECs immediately after the ischemic event, compared to healthy controls, and 6 months after the event the number of EPCs and CECs remained higher in the patient population. Although the number of EPCs is inversely correlated with cardiovascular risk factors

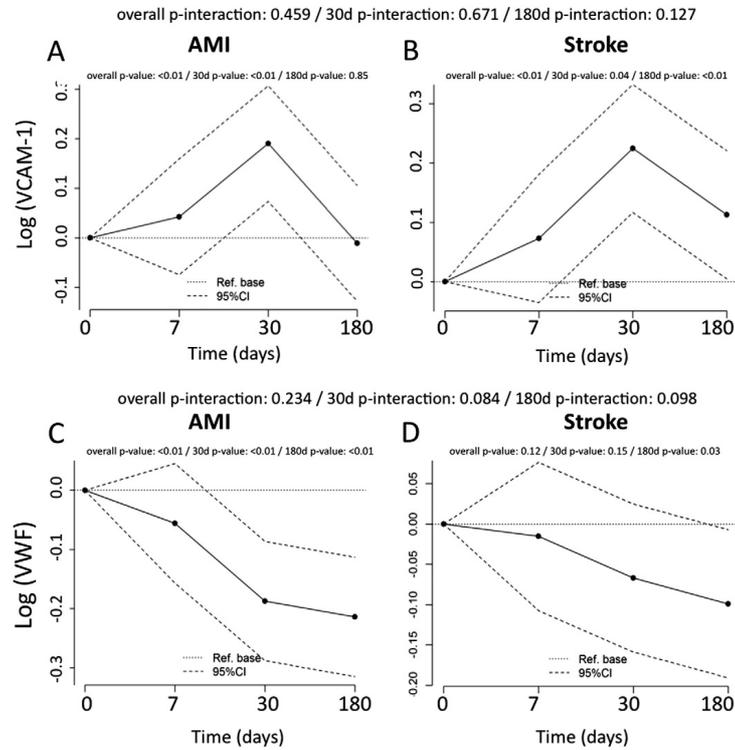


Fig. 3. Linear mixed model showing intra-subject changes in VCAM-1 and VWF over time. VCAM-1 in AMI patients (Panel-A), and VCAM-1 in stroke patients (Panel-B). VWF in AMI patients (Panel-C), and VWF in stroke patients (Panel-D).

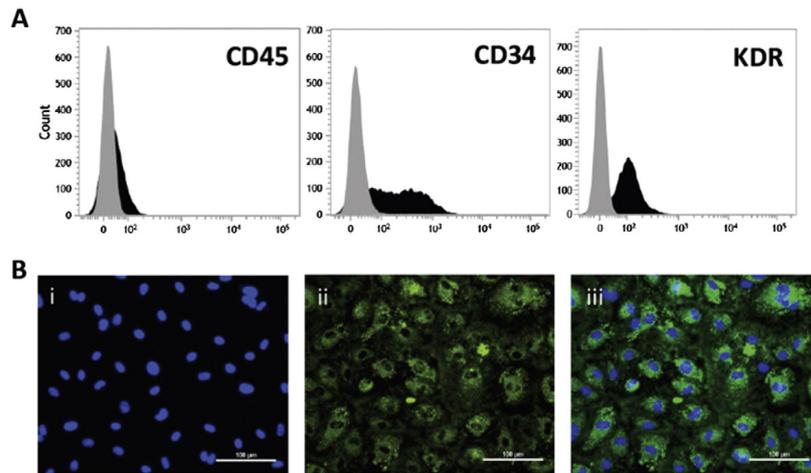


Fig. 4. Isolated EPC characterization from controls and AMI patients. EPC phenotype was assessed by flow cytometry and immunofluorescence. A) CD45, CD34, and KDR expression by flow cytometry. In gray, isotype controls; in black, stained cells. B) i. VWF expression, ii. immunofluorescent nuclei staining (DAPI), and iii. merged images. Total magnification 200×; scale bar represents 100 μm. Data are representative of 5 different cultures from each group.

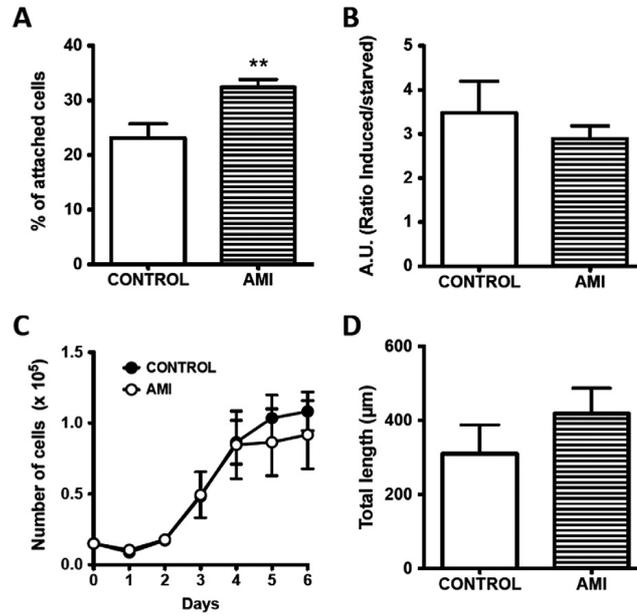


Fig. 5. Functional characterization of cultured endothelial progenitor cells. A) Adhesion of EPCs to a fibronectin matrix after 30 min of incubation was expressed as a percentage of total seeded cells. B) EPCs were starved for 48 h and then stimulated with complete EGM-2 media for 18 h. We measured the number of proliferative EPCs induced by growth factors present in the culture media. Results represent the ratio of proliferative cells to stimulated and starved EPC cultures. C) EPC growth capacity was measured for 6 days until cultures reached confluence. Growth kinetics of EPCs was expressed as total number of cells. D) Vasculogenesis was expressed as EPC ability to form capillary-like structures on Matrigel matrix. Results represent total capillary-like structures' length per power field. ***p* < 0.01 by Student *t* test.

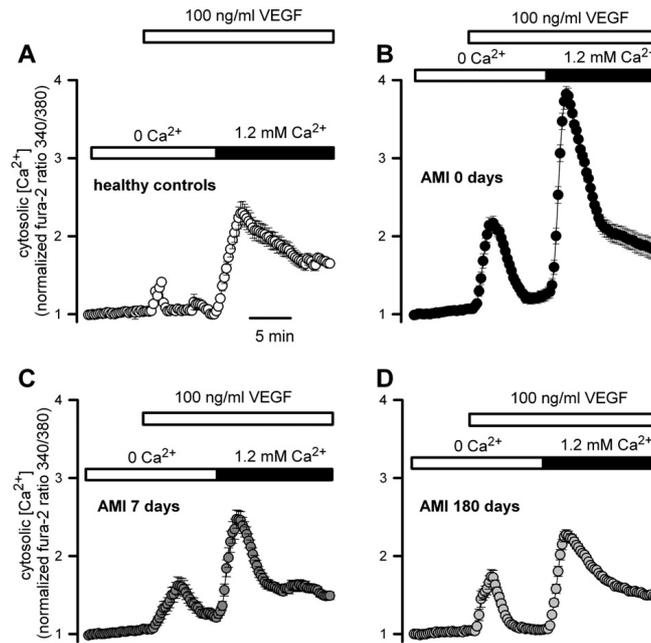


Fig. 6. VEGF-stimulated Ca^{2+} signals in EPC. Mean intracellular Ca^{2+} signals measured in response to VEGF (100 ng/ml) in EPCs obtained from healthy volunteers (A, $n = 74$ from 3 subjects) and from AMI patients at day 0 (B, $n = 219$ from 3 subjects) day 7 (C, $n = 280$ from 3 subjects), and day 180 (D, $n = 216$ from 3 subjects). EPCs were stimulated first in Ca^{2+} -free solutions (white box, reflecting intracellular Ca^{2+} release), followed by addition of 1.2 mM Ca^{2+} to the bath (black box) to detect Ca^{2+} influx.

and predicts the occurrence of cardiovascular events and death in stable patients [12], an increase in EPCs after an acute ischemic event that persists for 6 months of follow-up may be explained by persistent inflammatory stimuli [23]. In contrast with our findings, Massa et al. [24] reported that 60 days after a myocardial infarction there were no significant differences in EPC count between patients and healthy controls. This discrepancy may be explained by the smaller sample size in their earlier study.

EPC mobilization differed between AMI and stroke patients. In patients with AMI, the number of EPCs increased after 7 days and peaked at 30 days after an ischemic event in our study, and not immediately afterwards or at 7 days, as reported previously [25]. However, comparison between studies is not possible because of differences in methodology, including patient selection criteria and EPC definition. Unlike the increase in the number of EPCs observed in AMI patients, in patients with stroke there was no increase at 7 or 30 days of follow-up. After ischemic stroke, EPC count is heterogeneous across the literature, again due to differences in methodologies [13,25]. All the previous studies have included all stroke subtypes, with a higher proportion of cardioembolic and cryptogenic strokes that might contribute to the heterogeneity of the results. Our study included only atherothrombotic strokes, because this stroke subtype is the most closely related to ischemic heart disease and endothelial dysfunction. Differences in the number of EPCs between AMI and stroke patients at baseline and after 7 days and 30 days of follow-up could be attributed to bone marrow senescence related to higher atherosclerotic burden and comorbidities in the patients with stroke enrolled in our study. At discharge, 99% of AMI patients and 98% of stroke patients received statins. High-dose

statin treatment has been reported to mobilize EPCs into the circulation [26]. Statin treatment could contribute to the mobilization of EPCs observed in our study; however, the difference in the kinetics of EPC counts between groups does not seem related to statin therapy, as both groups received treatment in similar proportions.

Patients with AMI were treated more frequently with beta-blockers than were patients with stroke. Catecholamine signaling is beneficial in mobilizing EPCs after the acute ischemic event; however, without pharmacological intervention, there is an adrenergic desensitization. Beta-blockers resensitize the heart and enhance the release of EPCs [27]. In contrast with the difference in EPC mobilization between stroke and AMI patients, CECs decreased from baseline until 6 months of follow-up in both groups of patients. Beyond 6 months, the number of CECs in patients remained higher than baseline CECs in controls, due to chronic endothelial dysfunction and damage.

It is well known that the endothelium has site-specific characteristics, with unique structural and functional properties in each vascular bed [28]. As a result of the phenotypic heterogeneity of the endothelium, direct comparison of EPC and CEC counts between AMI or stroke patients may be difficult to interpret.

4.2. Relationship of EPCs and CECs with VCAM-1 and VWF

Interestingly, the progressive increase in EPCs with a peak at 30 days resembled VCAM-1 kinetics in AMI but not in stroke. VCAM-1 expression is induced by several stimuli in arterial endothelial cells and is a critical feature of vascular inflammation [29,30]. VCAM-1 values can predict an increased risk of new vascular events in acute cardiovascular

disease, and at the same time reflect endothelial cell activation with a specific role in atherosclerotic plaque development due to monocyte and T-lymphocyte recruitment. In human coronary arteries, increased expression of VCAM-1 is observed in areas of plaque neovascularization [31]. Furthermore, VCAM-1 is upregulated at the earliest stages after an ischemic event with little constitutive expression. The parallelism between VCAM-1 behavior and EPC count in patients with AMI could reflect endothelial recruitment. However, in patients with stroke, the absence of an increase in the number of EPCs despite VCAM-1 changes might be related to an impaired mobilization of EPCs secondary to bone marrow senescence in patients with high atherosclerotic burden, older age, and increased comorbidities. The difference between AMI and stroke patients in the VCAM-1 and EPC relationship might be secondary to the severity of the ischemic injury. The observed decrease in CECs followed a pattern similar to that of VWF, a biomarker of endothelial damage or dysfunction caused by inflammatory and vascular diseases that has been correlated with cardiovascular outcomes [32]. VWF plasmatic concentration was higher in AMI and stroke patients at baseline and after follow-up, compared with controls (baseline), as a consequence of not only the ischemic event but also the chronic endothelial dysfunction.

4.3. EPC differentiation from mature endothelial cells

In controls and AMI patients, EPCs exhibited not only morphological and immunological endothelial characteristics but also endothelial behavior, as they were able to adhere to a fibronectin matrix, proliferate upon stimulation, grow and form capillary-like structures in vitro, and respond to VEGF with typical intracellular Ca^{2+} signals. The second peak observed in Intracellular Ca^{2+} as a response to VEGF upon re-addition of Ca to the external medium reflects the store-operated Ca^{2+} entry (SOCE) that is triggered following the depletion of intracellular Ca^{2+} stores (mainly the ER), and has been related to the expansion of EPCs in vitro [33] and to tube formation [34]. The increased adhesion in samples from AMI patients is the first step for EPCs to induce re-endothelization after an ischemic event [35]. Interestingly, store-operated Ca^{2+} entry generated by VEGF was greater in EPCs obtained from AMI patients at day 0 than at 7 and 180 days. Most likely, this difference reflects the increased expression of the VEGF receptor under post-ischemic conditions [36].

4.4. Limitations

In order to properly culture EPCs, blood samples from patients should be processed within 2 h. Stroke patients were recruited in a hospital more than 450 km from the lab processing the samples to be cultured in vitro. Therefore, only blood samples from AMI patients and healthy controls could be used for cultures and functional characterization. Soluble VCAM-1 was chosen from among several markers of inflammation and endothelial activation; future studies could be useful to evaluate the correlation between cell numbers and various markers of endothelial damage. In addition, future experiments that correlate serial in vitro analysis with cell function could add useful information to better understand the pathophysiology of EPCs after an acute cardiovascular event.

5. Conclusions

Our study contributes to understanding the pathophysiology of endothelial repair in different vascular beds. In AMI patients, EPC mobilization and VCAM-1 levels peaked at 30 days after the ischemic event; an equivalent increase in EPCs was not observed in stroke patients, despite similar VCAM-1 kinetics. The different patterns of EPC release could be due to a decreased mobilization from the bone marrow secondary to a higher cardiovascular burden in stroke patients. Cultured EPCs had a mature endothelial capability and may contribute to atherosclerotic

lesion repair. CEC and EPC quantification is a complex procedure. Further research is needed to determine whether the increase in EPC counts could predict adverse events during follow-up. In patients with AMI, future studies could evaluate the prognostic value of serum biomarkers such as VCAM-1.

Supplementary data to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmcc.2015.01.005>.

Funding sources

This work was supported by grants from Spain's Ministry of Economy and Competitiveness through the State Plan for Research and Innovation, and co-financed by the ISCIII-Subdirecció General for Research Assessment and the European Regional Development Fund - FEDER- (grants Red Cardiovascular RD12/0042/0006, RD12/0042/0010, RD12/0042/0014, RD12/0042/0020, RD12/0042/0052, PI08/0272, PI08/0634, PI13/00517, PI13/00617), SAF2011-28214 and SAF2012-38140.

Disclosures

None.

Acknowledgments

All of the co-authors wish to acknowledge our dear friend and colleague, Magda Heras, recently deceased. She was the driving force of this line of research and none of the present work would have been possible without her leadership. Our memories of her will remain with us always.

We want to thank Susanna Tello and her collaborators in recruiting the control group, and to Marta Palomo for her help with setting up the cell counting technique. Their work has been instrumental to the conduct of this trial, and we are very grateful for their commitment. We also appreciate the English language revision by Elaine Lilly, Ph.D.

References

- [1] Lerman A, Holmes DR, Herrmann J, Gersh BJ. Microcirculatory dysfunction in ST-elevation myocardial infarction: cause, consequence, or both? *Eur Heart J* 2007; 28:788–97.
- [2] Madden JA. Role of the vascular endothelium and plaque in acute ischemic stroke. *Neurology* 2012;79:558–62.
- [3] Boos CJ, Lip GY, Blann AD. Circulating endothelial cells in cardiovascular disease. *J Am Coll Cardiol* 2006;48:1538–47.
- [4] Asahara T, Masuda H, Takahashi T, Kalka C, Pastore C, Silver M, et al. Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circ Res* 1999;85:221–8.
- [5] Takahashi T, Kalka C, Masuda H, Chen D, Silver M, Kearny M, et al. Ischemia- and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization. *Nat Med* 1999;5:434–8.
- [6] Suarez de Lezo J, Herrera C, Romero M, Pan M, Suárez de Lezo Jr J, Carmona MD, et al. Functional improvement in patients with dilated cardiomyopathy after intracoronary infusion of autologous bone marrow mononuclear cells. *Rev Esp Cardiol* 2013;66:450–7.
- [7] Boos CJ, Soor SK, Kang D, Lip GY. Relationship between circulating endothelial cells and the predicted risk of cardiovascular events in acute coronary syndromes. *Eur Heart J* 2007;28:1092–101.
- [8] Boos CJ, Balakrishnan B, Blann AD, Lip GYH. The relationship of circulating endothelial cells to plasma indices of endothelial damage/dysfunction and apoptosis in acute coronary syndromes: implications for prognosis. *J Thromb Haemost* 2008;6:1841–50.
- [9] Hill JM, Zalos G, Halcox JP, Schenke WH, Waclawiw MA, Quyyum AA, et al. Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk. *N Engl J Med* 2003;348:593–600.
- [10] Vasa M, Fichtlscherer S, Aicher A, Adler K, Urbich C, Martin H, et al. Number and migratory activity of circulating endothelial progenitor cells inversely correlate with risk factors for coronary artery disease. *Circ Res* 2001;89:e1–7.
- [11] Schmidt-Lucke C, Rössig L, Fichtlscherer S, Vasa M, Britten M, Kämper U, et al. Reduced number of circulating endothelial progenitor cells predicts future cardiovascular events: proof of concept for the clinical importance of endogenous vascular repair. *Circulation* 2005;111:2981–7.
- [12] Werner N, Kosiol S, Schiegl T, Ahlers P, Walenta K, Link A, et al. Circulating endothelial progenitor cells and cardiovascular outcomes. *N Engl J Med* 2005;353:999–1007.

- [13] Sobrino T, Hurtado O, Moro MA, Rodríguez-Yáñez M, Castellanos M, Brea D, et al. The increase of circulating endothelial progenitor cells after acute ischemic stroke is associated with good outcome. *Stroke* 2007;38:2759–64.
- [14] Padfield GJ, Tura-Ceide O, Freyer E, Barclay GR, Turner M, Newby DE, et al. Endothelial progenitor cells, atheroma burden and clinical outcome in patients with coronary artery disease. *Heart* 2013;99:791–8.
- [15] George J, Goldstein E, Abashidze S, Deutsch V, Shmilovich H, Finkelstein A, et al. Circulating endothelial progenitor cells in patients with unstable angina: association with systemic inflammation. *Eur Heart J* 2004;25:1003–8.
- [16] Michalska M, Machtoub L, Manthey HD, Bauer E, Herold V, Krohne G, et al. Visualization of vascular inflammation in the atherosclerotic mouse by ultrasmall superparamagnetic iron oxide vascular cell adhesion molecule-1-specific nanoparticles. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2012;32:2350–7.
- [17] Lluís-Ganella C, Subirana I, Lucas G, Tomás M, Muñoz D, Sentí M, et al. Assessment of the value of a genetic risk score in improving the estimation of coronary risk. *Atherosclerosis* 2012;222:456–63.
- [18] Grau M, Subirana I, Elosua R, Solanas P, Ramos R, Masiá R, et al. Trends in cardiovascular risk factor prevalence (1995–2000–2005) in northeastern Spain. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil* 2007;14:653–9.
- [19] Freixa X, Masotti M, Palomo M, Diaz-Ricart M, Escolar G, Guasch E, et al. Endothelin-1 levels predict endothelial progenitor cell mobilization after acute myocardial infarction. *Microvasc Res* 2011;82:177–81.
- [20] Bueno-Betí C, Novella S, Lázaro-Franco M, Pérez-Cremades D, Heras M, Sanchis J, et al. An affordable method to obtain cultured endothelial cells from peripheral blood. *J Cell Mol Med* 2013;17:1475–83.
- [21] Fernandes J, Lorenza IM, Andrade YN, García-Elias A, Serra SA, Fernández-Fernández JM, et al. IP₃ sensitizes TRPV4 channel to the mechano- and osmotransducing messenger 5'-6'-epoxyicosatrienoic acid. *J Cell Biol* 2008;181:143–55.
- [22] Shintani S, Murohara T, Ikeda H, Ueno T, Honma T, Katoh A, et al. Mobilization of endothelial progenitor cells in patients with acute myocardial infarction. *Circulation* 2001;103:2776–9.
- [23] Moniche F, Gonzalez A, Gonzalez-Marcos J, Carmona M, Piñero P, Espigado I, et al. Intra-arterial bone marrow mononuclear cells in ischemic stroke: a pilot clinical trial. *Stroke* 2012;43:2242–4.
- [24] Massa M, Rosti V, Ferrario M, Campanelli R, Ramajoli I, Rosso R, et al. Increased circulating hematopoietic and endothelial progenitor cells in the early phase of acute myocardial infarction. *Blood* 2005;105:199–206.
- [25] Yip HK, Chang LT, Chang WN, Lu CH, Liou CW, Lan MY, et al. Level and value of circulating endothelial progenitor cells in patients after acute ischemic stroke. *Stroke* 2008;39:69–70.
- [26] Hibbert B, Simard T, Ramirez FD, Pourdjabbar A, Raizman JE, Maze R, et al. The effect of statins on circulating endothelial progenitor cells in humans: a systematic review. *J Cardiovasc Pharmacol* 2013;62:491–6.
- [27] Sorrentino SA, Doerries C, Manes C, Speer T, Dessy C, Lobysheva I, et al. Nebivolol exerts beneficial effects on endothelial function, early endothelial progenitor cells, myocardial neovascularization, and left ventricular dysfunction early after myocardial infarction beyond conventional β 1-blockade. *J Am Coll Cardiol* 2011;57:601–11.
- [28] Aird W. Phenotypic heterogeneity of the endothelium. *Circ Res* 2007;100:174–90.
- [29] Cybulsky MI, Gimbrone Jr MA. Endothelial expression of a mononuclear leukocyte adhesion molecule during atherogenesis. *Science* 1991;251:788–91.
- [30] Sucosky P, Balachandran K, Elhammali A, Jo H, Yoganathan AP. Altered shear stress stimulates upregulation of endothelial VCAM-1 and ICAM-1 in a BMP-4- and TGF- β 1-dependent pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2009;29:254–60.
- [31] O'Brien KD, McDonald TO, Chait A, Allen MD, Alpers CE. Neovascular expression of E-selectin, intercellular adhesion molecule-1, and vascular cell adhesion molecule-1 in human atherosclerosis and their relation to intimal leukocyte content. *Circulation* 1996;93:672–82.
- [32] Vischer UM, Von Willebrand factor, endothelial dysfunction, and cardiovascular disease. *J Thromb Haemost* 2006;4:1186–93.
- [33] Sánchez-Hernández Y, Laforenza U, Bonetti E, Fontana J, Dragoni S, Russo M, et al. Store-operated Ca²⁺ entry is expressed in human endothelial progenitor cells. *Stem Cells Dev* 2010;19:1967–81.
- [34] Li J, Cubbon RM, Wilson LA, Amer MS, McKeown L, Hou B, et al. Or α 1 and CRAC channel dependence of VEGF-activated Ca²⁺ entry and endothelial tube formation. *Circ Res* 2011;113:1190–8.
- [35] Urbich C, Dimmeler S. Endothelial progenitor cells: characterization and role in vascular biology. *Circ Res* 2004;95:343–53.
- [36] Marti HJ, Bernaudin M, Bellail A, Schoch H, Euler M, Petit E, et al. Hypoxia-induced vascular endothelial growth factor expression precedes neovascularisation after cerebral ischemia. *Am J Pathol* 2000;156:965–97.

