



**Universidad de Buenos Aires**

**Facultad de Farmacia y Bioquímica**



**Laboratorio de Trombosis Experimental**

**Instituto de Medicina Experimental - CONICET**

**Academia Nacional de Medicina**

# **EFECTO DE LA ACIDOSIS EN LA SOBREVIDA Y FUNCIONALIDAD DE PROGENITORES ENDOTELIALES**

**Tesis de doctorado**

**Autora: Bioq. Hebe Agustina Mena**

**Directora: Dra. Soledad Negrotto**

**Consejera de estudios: Dra. Graciela Calabrese**

**2017**



## **AGRADECIMIENTOS:**

A Sole, por elegirme y guiarme todos estos años, sos una gran directora (no podría tener una mejor), y mejor aún, sos una gran persona. Gracias por dejarme formar parte de este grupo de trabajo, con quien tengo el placer de trabajar. Quisiera agradecerte por estar siempre presente cuando lo necesité, aconsejándome, tanto laboralmente como personalmente. Sin tus consejos o direcciones no terminaría esta etapa con todos estos logros y éxitos, que nunca pensé que pudiera alcanzar. Gracias por permitirme pensar que puedo llegar lejos. Por compartir grandes momentos juntas y por la confianza que me diste... GRACIAS totales!!!

A Mirta, por permitirme formar parte de este gran grupo humano. Por tus consejos y por transmitirme ese gran amor a la ciencia que seguramente voy a llevar conmigo siempre. Sos un gran ejemplo a seguir.

A Agos, mi chiquitita, gracias por ser mi AMIGA del lab, sin vos el día a día no hubiera sido igual. Gracias por tantas anécdotas juntas, viajes, salidas, afters, meriendas, recuerdos que nunca voy a olvidar. Y más que nada, por ser mi gran confidente y una persona con la siempre puedo contar. Te quiero y te extraño!

A Leíto, gracias por permitirme ser tu amiga, porque desde el primer momento me integraste y me hiciste sentir una más. Gracias por las horas compartidas en el lab, muchas veces quedándonos hasta tarde. Por todas las charlas de películas, series y chimentos: El lab no es lo mismo sin vos, no sólo se extraña tu risa sino también se te extraña y mucho. Te quiero!

A Antoine, por enseñarme todos los días cosas nuevas y ayudarme siempre. Porque en poco tiempo te convertiste en un amigo y alguien en quien se puede confiar, y mucho mejor... siempre dispuesto a compartir una cerveza.

A Pao, una de las pocas personas con las que comparto tantas cosas en común como el carácter y la forma de ser, gracias por todos los consejos y compartir buenos momentos.

A Juli, gracias por tu simpatía de todos los días y permitirme trabajar con vos.

A Roberto, por todas tus anécdotas, las reuniones serian aburridas sin ellas.

A Tomás, gracias por tus consejos, y ser un gran compañero en este último tiempo.

A Cin y Juanma, por las tardes de teres y los mates, por las largas tardes tan divertidas en el lab juntos.

A Majito, una gran amiga y compañera dentro del laboratorio.

A Nancy y Pau, las últimas incorporaciones, por su gran apoyo en esta última etapa:

A toda la gente del INSERM U1140 de Paris, por abrirme las puertas, enseñarme nuevas técnicas y por brindarme toda la ayuda necesaria por completar mis objetivos.

A Denu, mi gran amiga, gracias por estar siempre presente, escucharme, las salidas! Por sacarme siempre una sonrisa con tus locuras y por brindarme un espacio en tu hogar cuando volví de Francia. Te quiero.

A mis amigas de la vida, Jime, Guada, Flavia, Tefi, Marina y Lina. Gracias por apoyarme y seguir con esta amistad aún en la distancia.

A Thomas, por todo tu apoyo en este último tramo de la tesis y por todo lo que haces por mí. Je t'aime!

A mi familia, a mi papa y mi hermano, por estar siempre presentes y saber que puedo contar con ustedes. Especialmente, a mi MAMU, sin ella no sería lo que soy, siempre a mi lado apoyándome en todas mis decisiones y acompañándome en cada paso, dándome una palabra de aliento o un consejo cuando más lo necesito. Gracias por todo mu. Te amo!

Los datos presentados en esta tesis dieron lugar a las siguientes publicaciones:

**Trabajos originales en revistas internacionales:**

1. Acidic preconditioning improves vasculogenesis under proinflammatory and high glucose conditions and post-ischemic tissue regeneration in diabetic mice. **Mena HA**, Zubiry PR, Dizier B, Schattner M, Boisson-Vidal C, Negrotto S. *Enviado a publicación.*
2. Acidic preconditioning improves the proangiogenic responses of endothelial colony forming cells. **Mena HA**, Lokajczyk A, Dizier B, Strier SE, Voto LS, Boisson-Vidal C, Schattner M, Negrotto S. **Angiogenesis**. 2014;17:867-79. FI: 3.972.

**Presentaciones a congresos:**

1. Acidic preconditioning improves endothelial progenitor cell survival and angiogenesis under proinflammatory conditions and post-ischemic tissue regeneration in a murine model of type II diabetes. S Negrotto, **HA Mena**, C Boisson-Vidal, M Schattner. International Society on Thrombosis and Haemostasis 2017 Congress and 63th Annual SSC Meeting. Berlin, Alemania. Julio 2017.
2. Acidic preconditioning improves endothelial progenitor cell survival and functionality under inflammatory conditions. **HA Mena**, LE Ojeda, M Schattner and S Negrotto. 62nd Annual SSC Meeting. Montpellier, Francia. Mayo 2016.
3. El preacondicionamiento ácido incrementa las respuestas proangiogénicas de los progenitores endoteliales. **HA Mena**, C Fondevila, C Boisson-Vidal, M

Schattner, S Negrotto. LVIII Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica. Mar del Plata, Argentina. Noviembre 2013. Medicina Buenos Aires 2013; 73 (3): 139.

**Premios y distinciones:**

1. Seleccionado para el programa de **ESTADIAS CORTAS DE DOCTORADO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA PARA PROFESIONALES ARGENTINOS EN LA REPÚBLICA FRANCESA 2015**. Programa BecAR, Ministerio de Modernización. HA Mena.
2. **Premio Fundación Réne Barón en Ciencias Médicas 2014**. Investigación Básica o Clínica en Medicina Regenerativa. El preconditionamiento ácido incrementa las respuestas angiogénicas de los progenitores endoteliales” por HA Mena, M Schattner, S Negrotto.
3. **Premio al mejor trabajo en el área de Medicina Regenerativa**: “El preconditionamiento ácido incrementa las respuestas proangiogénicas de los progenitores endoteliales” por HA Mena, C Fondevila, C Boisson-Vidal, M Schattner, S Negrotto. Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica. Mar del Plata. Noviembre 2013.

# Índice

|  |    |
|--|----|
| RESUMEN  | 1  |
| ABREVIATURAS   | 5  |
| INTRODUCCIÓN   | 8  |
| Endotelio vascular y formación de vasos sanguíneos ..... | 9  |
| Progenitores endoteliales .....                          | 13 |
| Reparación de tejidos.....                               | 16 |
| Uso clínico de los progenitores endoteliales .....       | 19 |
| Microambiente inflamatorio .....                         | 21 |
| Acidosis.....  | 22 |
| OBJETIVOS  | 24 |
| Objetivo general .....                                   | 25 |
| Objetivos específicos .....                              | 26 |
| MATERIALES Y MÉTODOS                                     | 28 |
| Obtención de muestras .....                              | 29 |
| Aislamiento y cultivo de progenitores endoteliales ..... | 29 |
| Obtención de células endoteliales maduras .....          | 32 |
| Protocolo de acidificación y diseño experimental .....   | 33 |
| Ensayos de viabilidad y apoptosis.....                   | 33 |
| Ensayos de proliferación .....                           | 35 |
| Ensayo de migración en transwells. ....                  | 36 |
| Ensayo de reparación de heridas <i>in vitro</i> .....    | 36 |
| Ensayo de angiogénesis <i>in vitro</i> .....             | 36 |
| Expresión del antígeno Ki67.....                         | 37 |
| Expresión de los receptores de superficie .....          | 38 |
| Ensayo de adhesión.....                                  | 38 |
| Detección de fosfoproteínas por Western Blot.....        | 40 |
| Modelo murino de isquemia de miembro inferior .....      | 41 |
| Análisis estadístico de los resultados .....             | 42 |

|   |        |
|---|--------|
| RESULTADOS  | 43     |
| Efecto dual de la acidosis sobre las respuestas angiogénicas de las CFCE .....  | 44     |
| El preconditionamiento ácido incrementa las respuestas angiogénicas de las CFCE.....  | 49     |
| Las CFCE derivadas de sangre periférica incrementan su actividad angiogénica luego del preconditionamiento ácido.....               | 54     |
| Vías de señalización intracelular involucradas en el efecto proangiogénico del preconditionamiento ácido .....                      | 56     |
| El preconditionamiento ácido aumenta el potencial regenerativo de las CFCE en un modelo murino de isquemia de miembro inferior..... | 59     |
| Las CFCE preconditionadas son más resistentes al efecto nocivo del microambiente inflamatorio .....                                 | 63     |
| <br>DISCUSIÓN   | <br>67 |
| <br>CONCLUSIÓN  | <br>77 |
| <br>REFERENCIAS   | <br>80 |

# RESUMEN

Los progenitores endoteliales poseen un enorme potencial terapéutico debido a su papel crucial en la formación de vasos sanguíneos *de novo*, a través de un proceso denominado vasculogénesis. Entre ellos, las células formadoras de colonias endoteliales (CFCE) poseen todas las características de un verdadero progenitor endotelial y son capaces de formar nuevos vasos *in vivo*. Aun así, teniendo en cuenta la limitada disponibilidad de progenitores endoteliales en sangre periférica y el hecho de que en pacientes con riesgo cardiovascular el número y/o función de los progenitores endoteliales se encuentran enormemente reducidos, en la actualidad se impulsa el desarrollo de nuevas estrategias para optimizar la expansión y diferenciación de estos progenitores *ex vivo* y por ende los resultados terapéuticos con fines regenerativos.

Una característica común a diversas condiciones patológicas donde la formación de nuevos vasos ocurre activamente, como la isquemia, el daño tisular por traumas, quemaduras u otras heridas, es la presencia de un microambiente inflamatorio ácido. Previamente demostramos que la acidosis induce apoptosis de células progenitoras hematopoyéticas (CD34<sup>+</sup>). Considerando que las CFCE son una subpoblación de las células CD34<sup>+</sup> y que tienen un papel clave en la vasculogénesis, nuestro objetivo fue investigar el efecto de la acidosis en la supervivencia y funcionalidad de estos progenitores.

Las CFCE fueron obtenidas por diferenciación de células CD34<sup>+</sup> humanas de sangre del cordón umbilical o de sangre periférica en un medio de crecimiento endotelial EGM2 durante 14-18 días. El medio de cultivo fue acidificado por adición de un volumen precalculado de HCl isotónico (1N) y el precondicionamiento se logró mediante la exposición de los progenitores a EGM2 ajustado a pH 7.4, 7.0 y 6.6, que luego fue reemplazado por EGM2 fresco ajustado a pH fisiológico (7.4).

Nuestros resultados mostraron que la acidosis no indujo apoptosis de las CFCE y, aunque inicialmente se observó una reducción en sus funciones, una vez que el pH fue restaurado a valores de 7.4, varias respuestas angiogénicas de las CFCE

aumentaron significativamente. Este procedimiento, conocido como preacondicionamiento ácido, ejerció un efecto proangiogénico máximo a las 6 horas de exposición a pH 6.6. *In vitro*, mejoró significativamente la proliferación de las CFCE, su adhesión a células endoteliales activadas y a componentes de la matriz extracelular, la quimiotaxis mediada por SDF1 y la formación de túbulos. *In vivo*, incrementó su capacidad regenerativa en un modelo de isquemia de miembro inferior, disminuyendo el grado de inflamación local y aumentando el número de vasos sanguíneos en el músculo gastrocnemio. El efecto proangiogénico del preacondicionamiento ácido fue similar en progenitores endoteliales tardíos derivados de sangre periférica, sugiriendo que esta estrategia es efectiva en células adultas que pueden ser utilizadas en trasplantes autólogos. Por otro lado, los beneficios del preacondicionamiento ácido no fueron observados en células endoteliales maduras de micro y macrovasculatura.

Los mecanismos involucrados en el efecto proangiogénico de la acidosis incluyeron la activación de las vías de señalización AKT y ERK1/2 y la inhibición de la quinasa p38. Más aun, la supresión farmacológica de ERK1/2 y AKT suprimió el aumento en la proliferación inducido por el pH ácido, mientras que el inhibidor de p38 incrementó la tubulogénesis a pH 7.4 y potenció el incremento observado a pH 6.6. En cuanto a la adhesión celular, la quinasa de adhesión focal (FAK) se encontró activada en las CFCE preacondicionadas.

Además, demostramos que el preacondicionamiento ácido es una estrategia efectiva en condiciones de estrés e inflamación, ya que protegió a los CFCE de la acción citotóxica de moléculas elevadas en el microambiente inflamatorio isquémico como los cristales de urato monosódico, las histonas extracelulares y el TNF $\alpha$ , así como también del efecto antiangiogénico del TNF $\alpha$  en condiciones normales y de alta glucosa.

En conclusión, en el presente trabajo de tesis demostramos que el preacondicionamiento ácido representa una estrategia efectiva para optimizar la expansión *ex vivo* de CFCE, las cuales resultan más resistentes a condiciones

adversas, típicamente presentes en pacientes con enfermedades cardiovasculares como la inflamación y la alta glucosa, y con un mayor potencial terapéutico.

# **ABREVIATURAS**

ADN: ácido desoxirribonucleico

BSA: albúmina sérica bovina, (del inglés: *bovine serum albumin*)

BrEt: bromuro de etidio

CFCE: células formadoras de colonias endoteliales

CMA: células mieloides angigénicas

DAMPs: patrones asociados al daño tisular, (del inglés: *damage associated molecular patterns*)

EBM2: medio básico endotelial 2, (del inglés: *endothelial basic médium*)

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético

EGM2: medio de crecimiento endotelial 2, (del inglés: *endothelial growth médium*)

ERK: quinasa regulada por señales extracelulares, (del inglés: *extracellular signal-regulated kinase*)

FAK: quinasa de adhesión focal, (del inglés: *focal adhesión kinase*)

FGFb: factor de crecimiento de fibroblastos básico, (del inglés: *basic fibroblast growth factor*)

FITC: isotiocianato de fluoresceína, (del inglés: *fluorescein isothiocyanate*)

FVW: factor von Willebrand

HMEC1: células endoteliales de microvasculatura dermal humana 1, (del inglés: *human mammary epithelial cells 1*)

HUVEC: células endoteliales de la vena umbilical humana, (del inglés: *human umbilical vein endothelial cells*)

IL1 $\beta$ : interleuquina-1 beta

IL6: interleuquina-6

IL8: interleuquina-8

INF $\gamma$ : interferón gamma

IP: yoduro de propidio

MCP1: proteína quimioatrante de monocitos 1, (del inglés: *monocyte chemoattractant protein 1*)

MSU: urato monosódico, (del inglés: *monosodium urate*)

NA: naranja de acridina

PBS: buffer fosfato salino, (del inglés: *phosphate saline buffer*)

PDGF: factor de crecimiento derivado de plaquetas, (del inglés: *platelet-derived growth factor*)

PE: ficoeritrina, (del inglés: *phycoerythrin*)

PECAM: molécula de adhesión entre plaquetas y endotelio, (del inglés: *platelet endothelial cell adhesion molecule*)

ERO: especies reactivas del oxígeno

SDF1: Factor de crecimiento derivado del estroma 1, (del inglés: *stromal cell-derived factor 1*)

SFB: suero fetal bovino

TGF $\beta$ : factor de crecimiento transformante beta, (del inglés: *transforming growth factor beta*)

TNF $\alpha$ : factor de necrosis tumoral alfa, (del inglés: *tumor necrosis factor*)

VEGF: factor de crecimiento endotelial vascular, (del inglés: *vascular endothelial growth factor*)

VEGFR2: receptor 2 del factor de crecimiento endotelial vascular

# **INTRODUCCIÓN**

## **Endotelio vascular y formación de vasos sanguíneos**

El endotelio es el tejido que recubre la zona interna de todos los vasos sanguíneos y su principal función es mantener la fluidez de la sangre. Si bien antiguamente se consideraba una simple barrera que contenía al plasma y a las células de la sangre, hoy en día se sabe que permite el intercambio de nutrientes y desechos y desempeña un papel crucial en la regulación de la tonicidad y el mantenimiento de la homeostasis vascular. En condiciones normales, el endotelio presenta un fenotipo antiadherente y antitrombótico, a través de la liberación de óxido nítrico (ON) y prostaciclina (PGI<sub>2</sub>), y anticoagulante y profibrinolítico mediante diversos mecanismos que impiden la generación de trombina <sup>1</sup>. Sin embargo, las perturbaciones que pueden ocurrir en sitios de inflamación o de alto estrés hidrodinámico inducen la activación de las células endoteliales, lo que resulta en la generación de un microambiente protrombótico y antifibrinolítico. En un endotelio sano, existe un equilibrio entre estos dos estados y la pérdida del mismo genera respuestas perjudiciales para el organismo como es la formación de trombos y oclusión vascular, que representan la principal causa de enfermedades cardiovasculares <sup>2</sup>.

Además de su rol en la hemostasia, el endotelio posee funciones reparadoras de tejidos dañados (ej. trauma, quemaduras o isquemia, entre otros) a través de la formación de nuevos vasos sanguíneos, lo cual resulta fundamental para el funcionamiento del tejido u órgano injuriado debido al aporte de nutrientes y oxígeno. El desarrollo vascular comienza en la embriogénesis con la diferenciación de los progenitores mesodérmicos, los cuales proliferan y se adhieren unos a otros para formar una red tubular primaria. Luego se produce el remodelamiento, donde el tamaño de los vasos se modifica de acuerdo con el flujo y aparecen nuevas ramificaciones con el fin de asegurar que todas las células reciban concentraciones fisiológicas de oxígeno. Un aspecto crítico de la remodelación de la red primaria de células endoteliales en una vasculatura sana es el reclutamiento de pericitos, que

brindan señales de sobrevivencia, y células del músculo liso, que permiten la regulación del tono de los vasos y, de este modo, del flujo sanguíneo <sup>3</sup>.

En el adulto, las células endoteliales se encuentran en estado de reposo (G0) y tienen una vida promedio de 1200 días. La capacidad de formar nuevos vasos se mantiene en forma fisiológica para situaciones puntuales como por ejemplo, el embarazo o la renovación del endometrio en cada ciclo menstrual. Más allá de lo fisiológico, esta capacidad de formar nuevos vasos sanguíneos puede volverse muy activa en situaciones de inflamación aguda y crónica, isquemia tisular y cáncer, entre otros <sup>4</sup>.

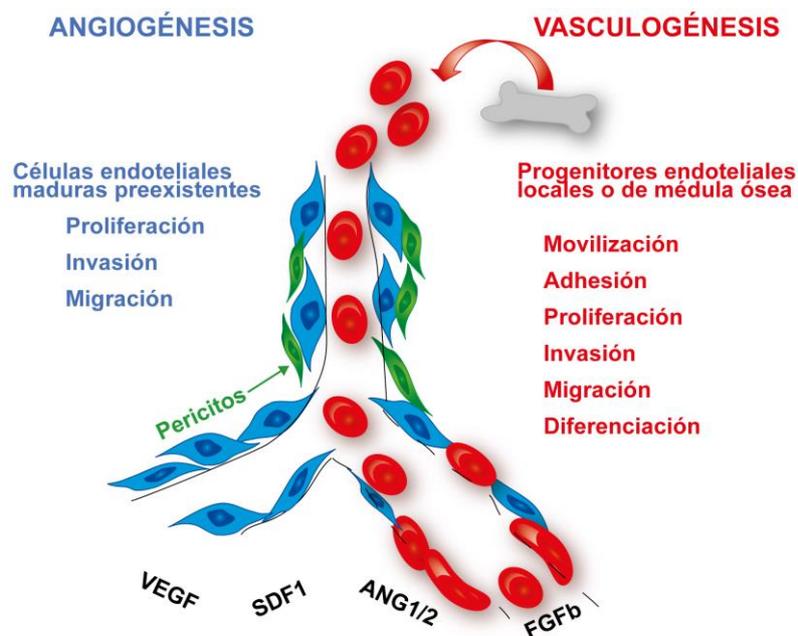
La regulación de la generación de nuevos vasos se realiza mediante un complejo balance entre factores que promueven este proceso (proangiogénicos) y aquellos que lo inhiben (antiangiogénicos). Los principales factores solubles se encuentran detallados en la Tabla 1. El factor proangiogénico de mayor relevancia es el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) ya que, a partir de la interacción con su receptor tirosina-kinasa 2 (VEGFR-2, flk1 o KDR), promueve el crecimiento y maduración del linaje endotelial desde los progenitores hasta las células maduras. Sin embargo, otras moléculas como el factor derivado del estroma 1 (SDF1), el factor de crecimiento de fibroblastos básico (FGFb) y las metaloproteasas tisulares también contribuyen significativamente en las distintas etapas de la formación de vasos <sup>5</sup>.

**Tabla 1. Factores reguladores de la formación de vasos sanguíneos**

| Factores proangiogénicos                            | Factores antiangiogénicos                       |
|---|---|
| Factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF)    | Factor derivado del epitelio pigmentario (PEDF) |
| Factor de crecimiento fibroblástico básico (FGFb)   | Angiostatina                                    |
| Metaloproteasas (MMP)                               | Endostatina                                     |
| Factor de crecimiento transformante beta (TGFβ)     | Trombospondina                                  |
| Angiopoyetinas 1 y 2 (ANG1 y 2)                     | Arresten  |
| Factor de crecimiento derivado del estroma 1 (SDF1) | Antitrombina III                                |
| Interleuquina 8 (IL8)                               | Factor plaquetario 4 (PF4)                      |

El desarrollo de nuevos vasos sanguíneos requieren de la contribución de dos procesos: 1) la angiogénesis, la cual implica la migración y proliferación de células endoteliales maduras desde vasos preexistentes cercanos, y 2) la vasculogénesis, mediada por progenitores inmaduros que residen en médula ósea o localmente en el tejido vascular y que tienen el potencial de diferenciarse a células endoteliales maduras <sup>6</sup>. Existen diferentes poblaciones que han sido denominadas progenitores endoteliales y que contribuyen a la vasculogénesis de diversas maneras, aunque sólo las células formadoras de colonias endoteliales (CFCE), también conocidas como progenitores endoteliales de crecimiento tardío, poseen todas las características de un verdadero progenitor endotelial, ya que son las únicas capaces de formar vasos sanguíneos *de novo* tanto *in vitro* como *in vivo* (profundizado en el apartado “Progenitores endoteliales”) <sup>7,8</sup>.

La angiogénesis es un proceso íntegramente local comprendido por diversas etapas secuenciales que comienzan con la dilatación del vaso preexistente y la proliferación de las células endoteliales cercanas, que luego degradan e invaden el tejido conectivo para permitir la migración y organización de estas células en estructuras tridimensionales. Finalmente, las células de soporte como células de músculo liso y pericitos son reclutadas, dando lugar a un nuevo vaso funcional (Figura 1) <sup>5,9</sup>. En el caso de la vasculogénesis, además de desarrollarse localmente, incluye la participación de la médula ósea, la cual funciona como un reservorio de progenitores endoteliales que migran al sitio de injuria en respuesta a un gradiente de quimioquinas, principalmente el SDF1 <sup>5</sup>. Una vez en el sitio de isquemia, los progenitores se adhieren a las células endoteliales activadas o, en caso de denudación, a la matriz extracelular, se insertan, y a partir de aquí el proceso es similar al de la angiogénesis, excepto que, antes de la maduración del vaso en formación, estos progenitores se diferencian a células endoteliales y, junto con otras células presentes en el tejido, liberan citoquinas, proteasas y quimioquinas que van a amplificar la respuesta angiogénica (Figura 1).



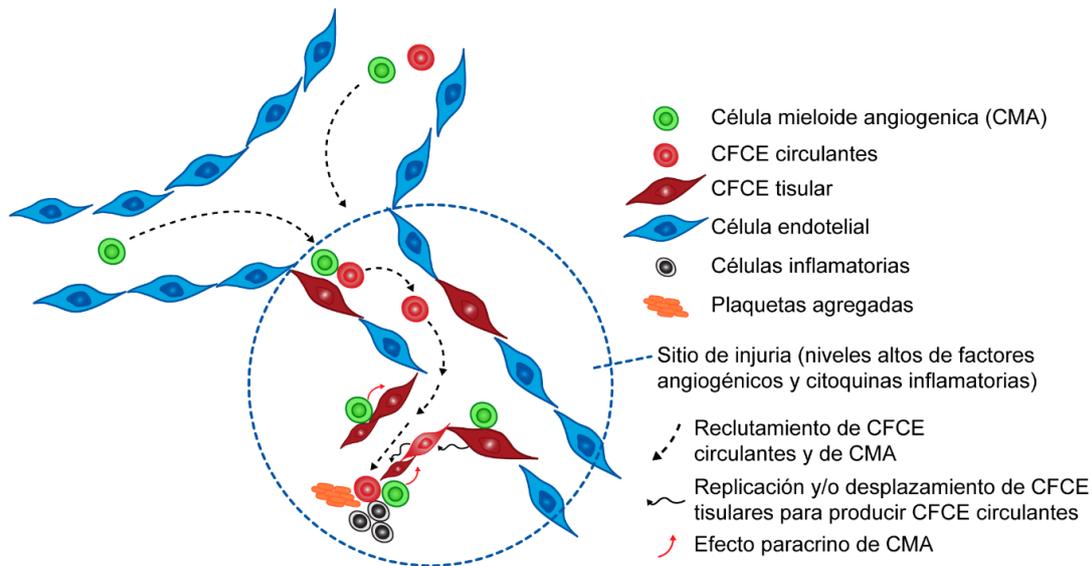
**Figura 1.** Representación esquemática de las distintas etapas de la formación de nuevos vasos sanguíneos, a través de la angiogénesis y vasculogénesis.

## Progenitores endoteliales

En 1997, Asahara y *col.* aislaron por primera vez una población de células que compartían propiedades tanto de células endoteliales como de precursores inmaduros<sup>10</sup>. Los progenitores endoteliales han sido típicamente definidos como células que son capaces de diferenciarse a células endoteliales y contribuir a la formación de nuevos vasos sanguíneos. Estos progenitores son considerados una población heterogénea ya que se han reportado diversas poblaciones que difieren tanto en su fenotipo como en su funcionalidad, es decir en la manera en la que contribuyen a la vasculogénesis. Originalmente se describieron dos tipos de progenitores endoteliales que fueron llamados de crecimiento temprano y de crecimiento tardío, con relación a su tiempo de aparición en cultivo<sup>11</sup>. Aunque los fenotipos de estas dos poblaciones son muy diferentes, uno hematopoyético y otro endotelial respectivamente<sup>12</sup>, ambos cooperan en el proceso de revascularización durante la reparación de heridas<sup>13</sup>.

Los progenitores endoteliales de crecimiento temprano, también conocidos como células angiogénicas circulantes o células hematopoyéticas proangiogénicas, actualmente se denominan células mieloides angiogénicas (CMA)<sup>10,14</sup>. Estas células se pueden cultivar a partir de células mononucleares de sangre periférica en placas cubiertas con fibronectina y en condiciones de crecimiento endotelial. Luego de 4 a 9 días aparecen en el cultivo, su capacidad de expansión es prácticamente nula y desaparecen alrededor de los 10 días. Se caracterizan por un fenotipo inmunológico positivo para marcadores hematopoyéticos (CD45, CD14, CD15) y endoteliales (CD31, factor von Willebrand (FVW), VEGFR2) y negativo para marcadores de progenitores (CD34, CD133 y Tie2)<sup>15,16</sup>. Fieles a su origen hematopoyético, las CMA no dan origen a células endoteliales, es decir que no cambian su linaje y no se incorporan al endotelio remodelado<sup>17,18</sup>. Su función principal es contribuir a la vasculogénesis de manera paracrina<sup>18,19</sup> ya que secretan abundantes cantidades de factores de crecimiento y quimioquinas<sup>8,20,21</sup> (Figura 2).

Los progenitores endoteliales que inicialmente se conocieron como de crecimiento tardío, hoy en día se denominan células formadoras de colonias endoteliales (CFCE) <sup>7</sup>. Pueden aislarse a partir de células mononucleares de sangre periférica, médula ósea o de sangre de cordón umbilical cultivadas sobre placas recubiertas con colágeno tipo I o gelatina, en un medio de cultivo rico en citoquinas específicas para el crecimiento endotelial. Estas células aparecen en forma de colonias luego de 14 a 21 días, se pueden expandir rápidamente *in vitro* y persisten más allá de los 100 días en cultivo. Presentan la típica morfología de empedrado y expresan en su superficie todos los marcadores del linaje endotelial como CD31, VE-caderina (CD144), FVW, CD146, KDR; y son negativas para cualquier marcador mieloide, incluyendo CD45 y CD14 <sup>22-24</sup>. También expresan los marcadores de precursores inmaduros CD34 y CD133, aunque los niveles de expresión decaen durante la expansión *in vitro*. Funcionalmente, las CFCE poseen gran capacidad proliferativa, que las distingue de las células endoteliales maduras, y una potente capacidad angiogénica intrínseca, razón por la cual esta población celular se conoce como “verdaderos progenitores endoteliales”. Son capaces de contribuir a la reparación del endotelio dañado como así también a la formación de nuevos vasos sanguíneos <sup>25</sup>, no sólo incorporándose a vasos preformados sino también formándolos totalmente *de novo* (Figura 2). De una u otra manera, las CFCE pueden diferenciarse *in situ*, adquiriendo todas las características de una célula endotelial madura. Esta propiedad vasculogénica es potenciada por mediadores tróficos a través de la liberación paracrina de factores de crecimiento <sup>26</sup>.

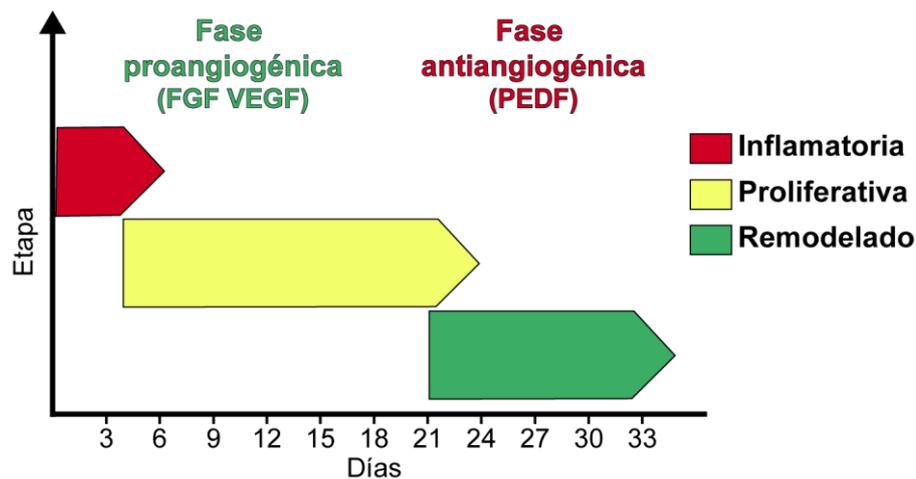


**Figura 2.** Representación esquemática de la participación de los distintos tipos celulares en la reparación de heridas.

La medula ósea es considerada la fuente clásica de progenitores endoteliales, aunque debido a la dificultad en la obtención de muestras, las CFCE derivadas de sangre periférica (CFCE adultas) y de cordón umbilical (CFCE de cordón) son las más estudiadas. Las principales diferencias entre las CFCE adultas y las de cordón incluyen una mayor frecuencia de progenitores en la sangre de cordón, los cuales a su vez exhiben una mayor tasa de crecimiento y capacidad angiogénica así como también menos signos de senescencia a lo largo de los pasajes *in vitro*<sup>22</sup>. Teniendo en cuenta que las CFCE adultas pueden utilizarse de manera autóloga como terapia celular, las estrategias para optimizar su expansión y actividad angiogénica sigue siendo un desafío para la medicina regenerativa. Por otro lado, existen nuevas evidencias de células progenitoras vasculares residentes en varios órganos<sup>27</sup> y tejidos incluyendo el cordón umbilical, aorta<sup>28</sup>, placenta<sup>29</sup> y tejido adiposo blanco<sup>30</sup>. Además, las zonas vasculogénicas de las paredes de los vasos sanguíneos también contienen precursores endoteliales y células madres mesodérmicas multipotentes<sup>31</sup>.

## Reparación de tejidos

La reparación de heridas en humanos es un proceso dinámico y fisiológico que tiene como objetivo reconstruir tejidos dañados. Este proceso comprende tres etapas secuenciales y solapadas: 1) etapa inflamatoria (primeras horas-6 días); 2) proliferativa (4-24 días); y 3) remodelado o maduración (21 días – años) (Figura 3).



**Figura 3.** Representación esquemática de las etapas de la reparación de heridas, y de la participación de factores pro y antiangiogénicos

La primera etapa de la reparación de heridas, la etapa inflamatoria, ocurre inmediatamente luego del daño al tejido y comienza con la formación de un coágulo, seguido por la consolidación de una matriz de fibrina que se convierte en una estructura de anclaje para las células infiltrantes. Durante los primeros 2 a 3 días, el tejido desvitalizado es removido a través del reclutamiento de neutrófilos y monocitos. Estos últimos se diferencian a macrófagos con un fenotipo proinflamatorio M1, capaces de fagocitar residuos del tejido dañado y de prevenir posibles infecciones mediante la fagocitosis de bacterias que ingresan a través de las heridas<sup>32,33</sup>. Luego de los 3 días posteriores a la injuria, se produce un cambio de la fase inflamatoria a la fase resolutoria, la cual se caracteriza por la reducción del reclutamiento de neutrófilos, el cambio del fenotipo

de los macrófagos de M1 a M2, perfil antiinflamatorio y reparador, y una disminución de la liberación de citoquinas proinflamatorias<sup>32-34</sup>. La resolución de la inflamación se solapa con el inicio de la segunda fase de la regeneración de heridas, el cual incluye la formación de nuevo tejido.

La etapa proliferativa ocurre entre los 4 días y las 3 semanas post injuria, e involucra principalmente la migración y proliferación de diferentes tipos celulares. Uno de los procesos más importantes de esta etapa es la formación de nuevos vasos sanguíneos (ver sección Endotelio vascular y formación de vasos sanguíneos). Simultáneamente, el crecimiento, migración y activación de fibroblastos permite la formación de una nueva matriz extracelular provisoria denominada cicatriz inicial o tejido de granulación<sup>32,33</sup>, compuesto de colágeno tipo III, elastina, proteoglicanos y ácido hialurónico, el cual forma una estructura provisional para el desarrollo de nuevos vasos sanguíneos.

La tercera etapa, etapa de remodelación o maduración, comienza en la segunda a tercera semana después de la injuria y puede durar años, dependiendo de las características de la herida. En esta fase también ocurre la reparación/regeneración de los tejidos dependiendo de la capacidad regenerativa intrínseca de cada tipo tisular<sup>32,33</sup>. La formación de nuevos vasos en el tejido de granulación ya no es necesaria y se caracteriza por la contracción de la cicatriz. Debido a la acción de metaloproteasas secretadas por fibroblastos, macrófagos y células endoteliales, el colágeno tipo III es reemplazado por colágeno tipo I, el cual tiene una estructura más estable y conforma la matriz extracelular<sup>33</sup>.

La triada que involucra al sistema inmune, la remodelación de la matriz extracelular y las células madre mesenquimales orchestra el proceso de regeneración/reparación tisular que, como mencionamos anteriormente, es absolutamente dependiente de la capacidad regenerativa de cada tejido. En este sentido, si la herida fue ocasionada en un tejido de reparación continua (mucosas y epitelios), se logrará una completa regeneración de los componentes celulares dañados a través de la diferenciación y proliferación de células madre y progenitores residentes y/o reclutadas desde la médula ósea o la

circulación<sup>35</sup>. Dependiendo de las características de la lesión, la diferenciación de células madre también tendrá lugar en tejidos con menor tasa regenerativa como son los de origen mesenquimal (huesos, cartílagos, tendones y músculo). Por el contrario, si la lesión fue ocasionada en tejidos con baja tasa regenerativa (músculo cardíaco o el sistema nervioso central), el tejido será reparado pero no regenerado, dejando una cicatriz en la zona de la herida<sup>35</sup>.

Existen diversos aspectos que pueden afectar la curación de heridas incluyendo factores locales (presencia de cuerpos extraños en el sitio de la herida, la maceración de tejidos, isquemia o infección) y factores intrínsecos al individuo (edad, diabetes, enfermedades renales, medicamentos y desnutrición, entre otros). Estos factores impactan directamente en los mecanismos fisiológicos de regeneración tisular ocasionando diversas complicaciones clínicas: cicatrización anormal (hipertrófica, queloides, atróficas); dolor; prurito; malignización tisular (síndrome de Marjolin); hemorragia; úlcera; infección y amputación. En conjunto estos factores afectan las tasas de morbilidad y mortalidad, siendo uno de los grandes desafíos médicos actuales mejorar el tratamiento de heridas crónicas, la prevención de la cicatrización, formación de queloides o contracturas y la curación cosméticamente aceptable<sup>33</sup>. Debido al avance en el conocimiento de la ciencia básica, la innovación técnica y la reciente participación de las empresas farmacéuticas, actualmente existen diversos recursos para promover la reparación de heridas incluyendo matrices sintéticas, reemplazo de tejidos biológicos, factores de crecimiento recombinantes y terapia con células madre<sup>36,37</sup>. También existen métodos locales para favorecer la circulación sanguínea en pacientes con heridas crónicas vinculadas a neuropatías y vasculopatías. Estos últimos incluyen métodos mecánico/físicos (terapia de presión negativa en heridas y compresión neumática intermitente) y métodos iónicos (tratamiento hiperbárico con ozono)<sup>36,38</sup>.

## Uso clínico de los progenitores endoteliales

Inicialmente, el interés por estos progenitores radicaba en su potencial utilidad clínica como marcadores de desarrollo y progresión de enfermedades cardiovasculares. Rápidamente desde su descubrimiento surgieron decenas de trabajos que estudiaban por citometría de flujo la frecuencia de estos progenitores en sangre periférica de pacientes con enfermedades metabólicas, inflamatorias y diversos tipos de cáncer. La población de progenitores endoteliales circulantes era definida por la expresión simultánea de CD34 y el receptor KDR, aunque también se han incluido otros marcadores como CD133, FVW y CD31. Diversas investigaciones demostraron que el número de progenitores endoteliales circulantes se encontraba reducido en pacientes con enfermedades cardiovasculares <sup>39</sup> y que por el contrario, su cantidad aumentaba cuando se introducían medidas cardioprotectoras como la práctica de ejercicio físico o la administración de drogas hipolipemiantes (estatinas) <sup>40,41</sup>. Basado en estos estudios, la determinación del número de progenitores endoteliales circulantes hoy en día se propone como biomarcador de salud vascular.

Debido a sus propiedades angiogénicas y regenerativas, los progenitores endoteliales también han despertado gran interés en medicina regenerativa, donde se prevé su uso como terapia celular para la reparación de órganos y tejidos dañados por eventos isquémicos, quemaduras, inflamación crónica, entre otros. Utilizando modelos animales, se ha comprobado que la infusión de estas células en el corazón favorece la revascularización del miocardio tras un infarto y reduce la formación de la placa de ateroma, una de las principales causas del accidente coronario <sup>42</sup>. Estudios preclínicos han demostrado una vasculogénesis efectiva inducida luego del trasplante de progenitores endoteliales en miembros inferiores isquémicos, miocardio <sup>43-45</sup> como así también modelos de injuria cerebral por traumatismo o infarto cerebral. En este último, las CFCE trasplantadas fueron detectadas en el cerebro dañado, donde aumentaron la densidad de vasos, contribuyendo a la restauración funcional del órgano <sup>46,47</sup>. Por otro

lado, las CFCE favorecen el desarrollo de la retina en un modelo murino de retinopatías <sup>48</sup>. Ensayos clínicos realizados en etapas iniciales de enfermedad arterial coronaria aguda y crónica y en desórdenes renales crónicos han demostrado la seguridad y factibilidad de esta terapia celular <sup>49</sup>. Otra aplicación de estas células es el uso de stents recubiertos con anticuerpos anti CD34 para capturar progenitores circulantes en los sitios de injuria y aumentar la reendotelización en pacientes sometidos a intervención percutánea coronaria <sup>50,51</sup>.

La capacidad angiogénica y reparadora de los progenitores endoteliales puede potenciarse a través de su combinación con otras células o agentes. En ese sentido, ha sido reportado que el tratamiento combinado de estos progenitores con células madres mesenquimales <sup>52-56</sup>, células estromales derivadas del tejido adiposo <sup>57</sup> o células mieloides <sup>52,58</sup> mejora sinérgicamente la neovascularización en comparación con el uso de cualquier población celular sola <sup>56</sup>. Asimismo, el tratamiento previo con eritropoyetina <sup>59,60</sup>, fucoidan <sup>61,62</sup>, CD146 soluble <sup>63</sup>, TNF $\alpha$  transmembrana <sup>64</sup> o lisado de plaquetas <sup>65</sup> también mejora la eficacia terapéutica de los progenitores endoteliales *in vivo*.

Uno de los aspectos más interesantes y novedosos acerca del uso clínico de estos progenitores se basa en la posibilidad de utilizarlos como *delivery* de fármacos, aprovechando su capacidad de migrar e incorporarse a la vasculatura del huésped. En ese sentido, el grupo de Melero Martin ha abordado numerosas estrategias de terapia génica que resultaron en la obtención de CFCE que expresan y liberan eritropoyetina y que, una vez trasplantadas en ratones anémicos, fueron capaces de revertir la enfermedad <sup>66</sup>. Más recientemente, se han considerado a las CFCE una población *target* para la terapia anti cáncer, ya que pueden ser cargadas con agentes antitumorales y depositarlos directamente en el tumor gracias a su capacidad de incorporarse a la microvasculatura del mismo <sup>67-69</sup>.

## Microambiente inflamatorio

La inflamación es una respuesta inmediata del cuerpo frente al daño celular y tisular causado por patógenos, productos químicos o injuria física. Esta respuesta está caracterizada por cuatro signos cardinales: calor, rubor, dolor e hinchazón. La respuesta inflamatoria ocurre sólo en tejidos conectivos vascularizados y surge con el fin defensivo de aislar y destruir al agente dañino, así como de reparar el tejido u órgano dañado. La inflamación aguda es un proceso de corta duración que provoca alteraciones en la permeabilidad vascular, modificaciones leucocitarias y el aumento de mediadores inflamatorios. En parte, la inflamación se resuelve simplemente porque los mediadores se producen en estallidos rápidos (solamente mientras persiste el estímulo), tienen vidas medias cortas y son degradados tras su liberación. De manera opuesta, la inflamación crónica es una respuesta prolongada y desregulada que involucra la inflamación activa, la destrucción tisular y atenta contra la reparación tisular <sup>70</sup>.

El microambiente tisular, el cual se supone que proporciona contactos celulares, factores de crecimiento solubles y otras señales químicas para una apropiada vasculogénesis, en condiciones de inflamación exacerbada y/o daño tisular severo puede resultar nocivo y conducir al estrés y la muerte de las células encargadas de la reparación, por lo que tanto las CFCE trasplantadas como así también las endógenas pueden verse afectadas negativamente por estas condiciones. Este microambiente presenta diversos patrones asociados al daño tisular (DAMPs), son moléculas que, en condiciones fisiológicas, permanecen secuestradas intracelularmente y, por ende, no son reconocidas por el sistema inmune. Sin embargo, bajo condiciones de estrés celular o lesión de los tejidos, estas moléculas son secretadas activamente por las células inmunes estresadas (por ejemplo, son expuestas como neo-antígenos) o pasivamente liberadas al medio extracelular por las células muertas o por la matriz extracelular dañada <sup>71-74</sup>. Los principales DAMPs dentro del microambiente isquémico son:

- las histonas extracelulares, las cuales son liberadas como resultado de la muerte de células <sup>75</sup> y también durante la formación de las trampas extracelulares de neutrófilos (NETs).
- los cristales de urato monosódico (MSU), que son considerados uno de los DAMPs más abundantes debido a que la isquemia favorece, a través de la conversión de la xantina oxidasa, la producción de ácido úrico intracelular, el cual es liberado después de la muerte celular, formando cristales de MSU <sup>76,77</sup>.
- Las especies reactivas del oxígeno (ROS), liberadas por neutrófilos y macrófagos en el sitio de isquemia con el fin de eliminar patógenos <sup>78</sup>.
- Un microambiente ácido (ver sección Acidosis).

En el microambiente inflamatorio isquémico también se pueden encontrar altos niveles de citoquinas proinflamatorias como TNF $\alpha$ , IL6, IL1, IL18 e INF $\gamma$  <sup>79,80</sup> que pueden afectar la supervivencia de las CFCE. Además, las células inflamatorias liberan quimioquinas como SDF1, IL8 y MCP1 <sup>81</sup>, que atraen a otras células inmunes y progenitoras, como así también factores de crecimiento que promueven la angiogénesis como PDGF, TGF $\beta$ , FGF, and VEGF <sup>82</sup>.

## Acidosis

La acidosis es un término clínico que indica un trastorno hidroelectrolítico que puede conducir a la acidemia, definida por un pH sanguíneo menor a 7.35. La acidosis puede ser metabólica o respiratoria. La primera puede ser causada por el aumento en la generación de H<sup>+</sup> de origen endógeno (por ej: cetonas) o ácidos exógenos (por ej: salicilatos, etilenglicol, metanol); incapacidad de los riñones para excretar el hidrógeno producido por la ingesta de proteínas de la dieta (acidosis tubular renal tipo I, IV); o por la pérdida de bicarbonato (HCO<sup>-</sup>) debido a la excesiva eliminación a través riñón (acidosis tubular renal tipo II) o del tracto gastrointestinal (diarrea). La acidosis respiratoria se debe al aumento del ácido carbónico circulante al no producirse una

eliminación normal del CO<sub>2</sub> por vía respiratoria como resultado de una hipoventilación alveolar por insuficiencia respiratoria: cuando el CO<sub>2</sub> se une con el agua se convierte en ácido carbónico, un ácido débil que se disocia parcialmente en bicarbonato y H<sup>+</sup>; estos iones de hidrógeno son los causantes del incremento de la acidez plasmática, lo que resulta en una acidosis sistémica <sup>83</sup>.

El rango fisiológico de valores de pH se mantiene entre 7.36 y 7.44. Sin embargo, el pH puede caer a valores de 6.5-6.0 en una variedad de condiciones patológicas. Por ejemplo, durante la isquemia cerebral, el pH del fluido extracelular decrece de 7,3 a 6,8-6,4 <sup>84</sup> y en condiciones de hiperglucemia estos valores pueden disminuir hasta 6,1 <sup>85,86</sup>. De hecho, una característica común en diversas situaciones donde la formación de vasos sanguíneos ocurre activamente, como la injuria vascular, isquemia tisular, reparación de heridas, trauma, quemaduras y el desarrollo de tumores, es la presencia de un microambiente inflamatorio ácido <sup>87-89</sup>. La acidosis representa un desafío para la supervivencia celular porque una disminución en el pH extracelular puede causar acidificación intracelular. Teniendo en cuenta que la mayoría de los procesos celulares básicos dependen del pH, la exposición a un microambiente ácido es capaz de gatillar activación, expresión de moléculas de adhesión, producción de citoquinas inflamatorias, maduración o inducción de muerte celular programada <sup>90-92</sup>. De hecho, una variación de 0.1 en el pH intracelular (pHi) puede alterar funciones biológicas básicas como, producción de ATP, síntesis de proteínas, proliferación celular, proliferación y apoptosis.

# **OBJETIVOS**

## Objetivo general

Las enfermedades isquémicas son una de las principales causas de muerte en el mundo y la posibilidad de regeneración tisular mediante la terapia con células madre y progenitores ha despertado gran interés en la medicina actual. Los progenitores endoteliales poseen un gran potencial terapéutico debido a su papel crucial en la formación de vasos sanguíneos *de novo*. En este sentido, numerosas evidencias clínicas y preclínicas indican que la terapia celular con progenitores endoteliales puede promover exitosamente la neovascularización de tejidos isquémico como el miocardio, el cerebro y los músculos de miembros inferiores y que la administración de estos progenitores, solos o en combinación con terapias tradicionales, es prometedora para el tratamiento de enfermedades cardiovasculares como la aterosclerosis y diabetes . Aun así, teniendo en cuenta la limitada disponibilidad de progenitores endoteliales en sangre periférica y médula ósea y el hecho de que en pacientes con riesgo cardiovascular el número y/o función de los progenitores endoteliales se encuentran enormemente reducidos, en la actualidad se impulsa el desarrollo de nuevas estrategias para optimizar la expansión y diferenciación de los progenitores endoteliales *ex vivo* y por ende los resultados terapéuticos con fines regenerativos.

La escasa viabilidad de los progenitores, tanto endógenos como trasplantados, que llegan al tejido lesionado es una limitación adicional para una apropiada revascularización. El microambiente tisular, el cual se supone que proporciona contactos celulares, factores de crecimiento solubles y otras señales químicas para una apropiada vasculogénesis, en condiciones de inflamación exacerbada y/o daño tisular severo puede resultar nocivo y conducir al estrés y la muerte celular. Entre sus componentes encontramos especies reactivas del oxígeno, diversas citoquinas proinflamatorias, patrones moleculares asociados al daño tisular y condiciones de hipoxia y acidosis, entre otros.

La acidosis, una característica típica del microambiente inflamatorio, representa un desafío para la supervivencia celular ya que una disminución en el pH extracelular puede causar acidificación intracelular y la subsecuente activación de varias respuestas celulares, incluyendo la muerte celular. El rango fisiológico de valores de pH se mantiene entre 7.36 y 7.44. Sin embargo, estos niveles pueden caer a valores de 6.5-6.0 en una variedad de condiciones patológicas donde la formación de nuevos vasos sanguíneo ocurre activamente como en la isquemia, el crecimiento tumoral y la injuria tisular . En este contexto, previamente demostramos que la exposición de progenitores hematopoyéticos (células CD34<sup>+</sup>) a un medio ácido, incluso por periodos tan breves como 30 segundos, induce arresto del ciclo celular y apoptosis <sup>93</sup>. Considerando que las CFCE son una subpoblación de las células CD34<sup>+</sup> y que tiene un papel fundamental en la vasculogénesis, **nuestro objetivo fue investigar el efecto de la acidosis en la sobrevida y funcionalidad de estos progenitores endoteliales.**

### Objetivos específicos

1. Estudiar el efecto de la acidosis en las siguientes respuestas angiogénicas de las CFCE *in vitro*:
  - a. sobrevida.
  - b. proliferación y ciclo celular.
  - c. quimiotaxis inducida por VEGF o SDF1.
  - d. reparación de heridas.
  - e. adhesión a células endoteliales activadas y a componentes de la matriz.
  - f. formación de pseudotúbulos.
  
2. Elucidar los mecanismos involucrados en el efecto de la acidosis, estudiando:
  - a. la expresión de los receptores de VEGF1 (KDR) y SDF1 (CXCR4).

- b. la activación de señales intracelulares clásicas que regulan la función endotelial (ERK, AKT, p38).
3. Estudiar el efecto del pH sobre la capacidad regenerativa de las CFCE *in vivo*, analizando distintos parámetros de la reparación tisular en un modelo murino de isquemia de miembro inferior:
  - a. recuperación del flujo sanguíneo en miembros inferiores.
  - b. densidad vascular en el músculo gastrocnemio.
  - c. signos de necrosis e inflamación tisular.
4. Determinar si el preacondicionamiento ácido es capaz de proteger la acción de moléculas que afectan la supervivencia y funcionalidad de las CFCE. Se analizarán la viabilidad y las principales respuestas angiogénicas (proliferación, reparación de heridas, migración y tubulogénesis) en:
  - a. presencia de DAMPs (cristales de MSU e histonas extracelulares).
  - b. presencia de moléculas proinflamatorias (TNF $\alpha$ ).
  - c. condiciones de alta glucosa.
5. Comparar el efecto de la acidosis sobre los progenitores endoteliales de crecimiento tardío de cordón umbilical con otros progenitores o células maduras del linaje que participan en la reparación tisular, analizando las principales respuestas angiogénicas en:
  - a. progenitores de crecimiento tardío de sangre periférica.
  - b. células endoteliales de macrovasculatura (HUVEC).
  - c. células endoteliales de microvasculatura (HMEC1).

# **MATERIALES Y MÉTODOS**

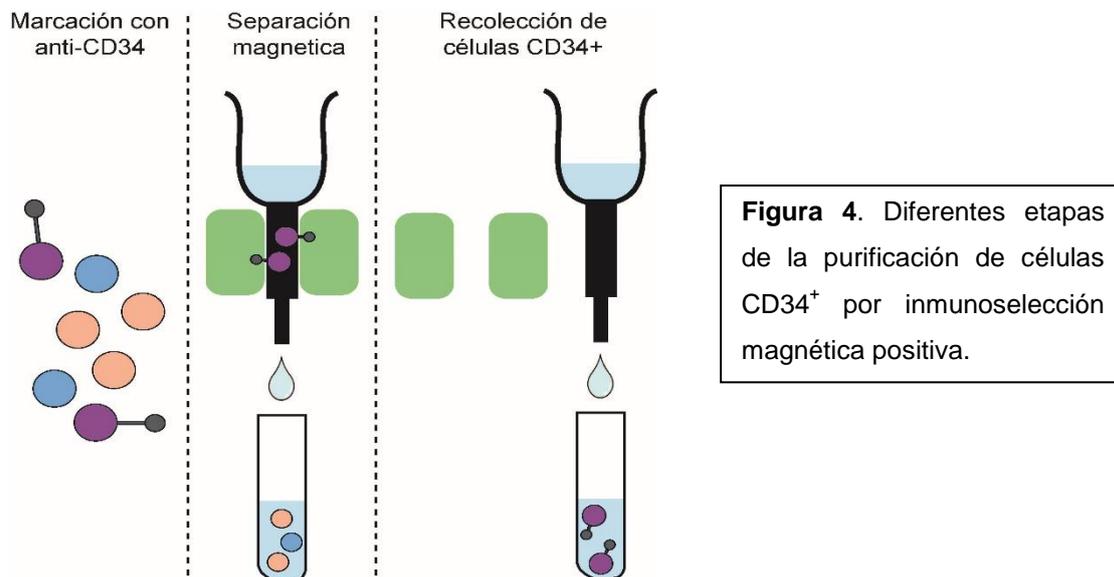
## **Obtención de muestras**

Las muestras de sangre de cordón umbilical y de cordón umbilical fueron obtenidas en el Servicio de Obstetricia del Hospital Bernardino Rivadavia y las de sangre periférica fueron obtenidas del Hospital Fernández. Las madres dieron su consentimiento escrito, autorizando la recolección de las muestras y el uso de las mismas con fines de investigación. La identidad fue mantenida en anonimato y reserva de confidencialidad según normas del Ministerio de Salud de la Nación en su guía para investigaciones clínicas. Este plan de trabajo y los consentimientos informados fueron aprobados por los Comités de Ética, Docencia y Bioseguridad de la Academia Nacional de Medicina.

## **Aislamiento y cultivo de progenitores endoteliales**

La obtención de las CFCE humanas, se realizó a partir de células CD34<sup>+</sup> de sangre de cordón umbilical o de sangre periférica humana de donantes sanos. Las muestras de sangre de cordón umbilical fueron recolectadas inmediatamente luego de partos normales o cesáreas en bolsas de recolección estériles conteniendo heparina como anticoagulante. Cada muestra se diluyó con solución fisiológica (1:2 v/v) y centrifugó a 180 xg durante 15 minutos. Luego de descartar el plasma rico en plaquetas, se recompuso el volumen inicial con solución fisiológica y se aislaron las células mononucleares por centrifugación sobre un gradiente de Ficoll-Hypaque 1.077 g/cm<sup>3</sup> (GE, Buckinghamshire, UK) a 200 xg durante 25 minutos. Luego de dos lavados con solución fisiológica y posterior lisis de glóbulos rojos residuales con una solución de NH<sub>4</sub>Cl (0.17 M), las células mononucleares se recuperaron por centrifugación en solución fisiológica. Las células CD34<sup>+</sup> fueron purificadas por inmunoselección magnética positiva empleando un kit comercial (Miltenyi Biotec, Bergish Gladbach, Alemania), siguiendo instrucciones del fabricante. Brevemente, las células mononucleares fueron resuspendidas en *buffer* de marcado conformado por *buffer*

fosfato salino (PBS) suplementado con EDTA (2 mM) y albumina sérica bovina (BSA, 0.5%) e incubadas durante 30 minutos con IgG humana, para bloquear los sitios de unión inespecífica, y con un anticuerpo monoclonal anti-CD34 conjugado con microesferas magnéticas. Tras eliminar el exceso de anticuerpo con un lavado, las células se resuspendieron en *buffer* de marcado y atravesaron una columna adosada a un imán. De esta manera, las células positivas para este marcador quedaron retenidas en la columna. Luego de 3 lavados para eluir las células negativas, la columna fue separada del imán y las células CD34<sup>+</sup> fueron recolectadas (Figura 4). La pureza de la población fue determinada por marcación de las células con un anticuerpo anti CD34 dirigido contra otro epitope (BD Biosciences, San Jose, CA) y analizado por citometría de flujo (FACSCalibur, BD Biosciences), utilizando el *software* FCS Express V3 (De Novo Software, Glendale, CA). La pureza fue siempre mayor al 97%.



Las células CD34<sup>+</sup> ( $5 \times 10^5$ /pocillo) fueron sembradas en placas de 24 pocillos previamente recubiertas con gelatina (2%) (Sigma, St Louis, MO) en 1 ml de medio de crecimiento endotelial EGM2 (del inglés: *Endothelial Growth Medium 2*) (Lonza,

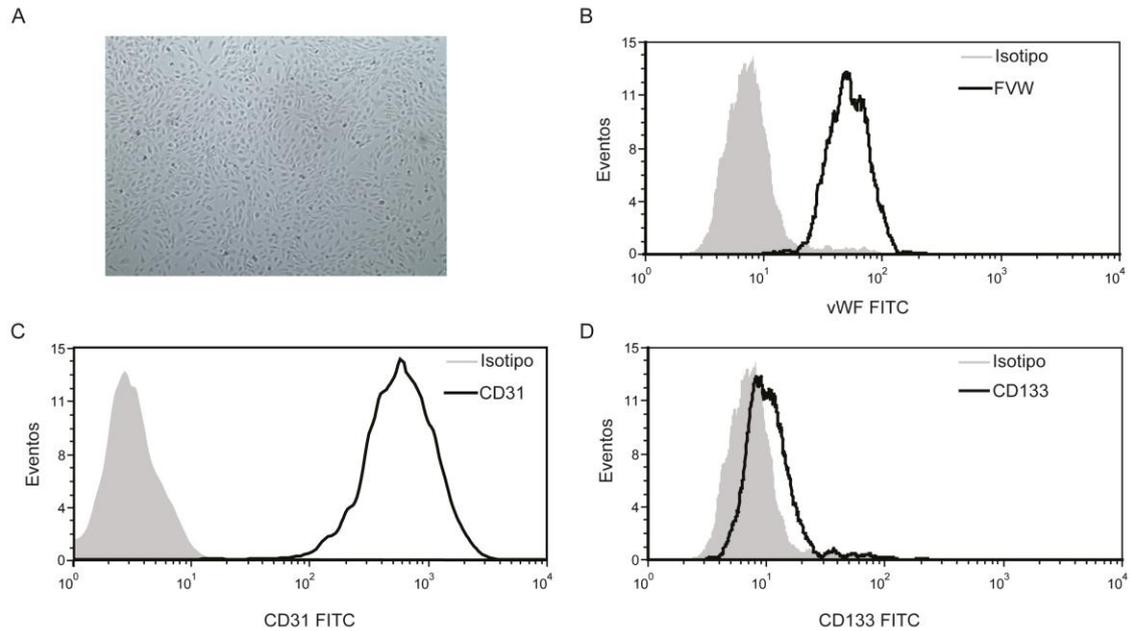
Walkersville, MD) que contiene suero fetal bovino (SFB), hidrocortisona, factor de crecimiento fibroblástico humano (hFGF), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor de crecimiento de tipo insulina de cadena larga R3 humano (R3-IGF-1), ácido ascórbico, factor de crecimiento epidérmico humano (hEGF), gentamicina, anfotericina-B y heparina. Las células no adherentes fueron descartadas a los 4 días de cultivo y las colonias endoteliales fueron visualizadas después de 14 a 21 días. Cada colonia fue tratada con tripsina (0,05% p/v) y cultivadas en EGM2 para su expansión. Una vez expandidas, las CFCE fueron utilizadas dentro de los 45 días de cultivo, momento en el cual aún conservan sus características de progenitores intactas. En algunos casos, los progenitores fueron congelados en nitrógeno líquido hasta su uso.

Procedimientos similares fueron utilizados para aislamiento de CFCE de sangre periférica. Brevemente, se utilizaron 30 mL de sangre periférica fresca y las células mononucleares fueron obtenidas por centrifugación sobre un gradiente de Ficoll-Hypaque, luego resuspendidas en EGM2 y sembradas ( $5 \times 10^6$ ) en placas de 6 pocillos previamente recubiertas con fibronectina (10  $\mu\text{g/ml}$ , Sigma, St Louise, MO). El medio de cultivo fue reemplazado cada 3 días hasta el día 14-21, momento en el cual se observaron las primeras colonias.

La caracterización de los CFCE se llevó a cabo según se ha descrito previamente<sup>94,95</sup>, utilizando distintas estrategias que confirman su naturaleza:

- 1) La clásica morfología de empedrado (tipo *cobblestone*) de la monocapa confluyente fue observada por microscopía óptica (Figura 5A).
- 2) La expresión de marcadores endoteliales como el FVW y CD31 (PECAM) (BD Biosciences, San Jose, CA), combinada con la presencia del marcador de progenitores CD133 (BD Biosciences, San Jose, CA) (Figura 5) y la ausencia de marcadores mieloides como el CD14 y CD45 (datos no mostrados) fueron confirmadas por citometría de flujo.

3) La tasa de crecimiento de los progenitores, la cual fue significativamente mayor a la de células endoteliales maduras derivadas de la vena de cordón umbilical ( $1.9 \pm 0.3$  veces por día vs  $0.5 \pm 0.2$ ,  $p < 0.05$ ,  $n = 10$ ).



**Figura 5.** Caracterización de las CFCE. A) Morfología bajo microscopio óptico y análisis de la expresión de diferentes marcadores por citometría de flujo como B) FvW, C) CD31 y D) CD133.

### Obtención de células endoteliales maduras de macro y microvasculatura

Las células primarias de macrovasculatura (HUVEC) fueron aisladas de la vena umbilical humana por digestión con colagenasa tipo I (0.3 mg/ml) (Sigma, St Louis, MO) y caracterizadas siguiendo procedimientos descriptos anteriormente<sup>96,97</sup>. Estas células fueron utilizadas hasta el pasaje número 4. La línea transformada de células endoteliales de microvasculatura humana (HMEC1) fueron cedidas generosamente por el Center for Disease Control and Prevention (Atlanta, GA). Ambos tipos celulares fueron cultivados en el medio de crecimiento endotelial EGM2 en condiciones similares a los progenitores endoteliales.

## Protocolo de acidificación y diseño experimental

El medio de cultivo fue acidificado mediante de la adición de un volumen precalculado de HCl isotónico (1 N). El pH del medio se midió usando un electrodo a 37°C y se obtuvo un promedio de  $7.39 \pm 0.04$ ,  $7.03 \pm 0.03$ ,  $6.62 \pm 0.03$  (n=3).

Se realizaron dos protocolos de acidificación: 1) los ensayos de angiogénesis se realizaron con CFCE expuestas a EGM2 a pH 7.4, 7 o 6.6 durante todo el ensayo y, 2) los progenitores endoteliales fueron expuestos a EGM2 ajustado a los distintos valores de pH durante el periodo de tiempo indicado y luego el medio fue reemplazado por EGM2 fresco ajustado a pH fisiológico (7.4), estrategia conocida como preacondicionamiento ácido. En algunos ensayos, la acidificación se llevó a cabo en medio básico EBM2 (del inglés *endothelial basic medium*) que no contiene citoquinas. Posteriormente, las distintas respuestas angiogénicas fueron evaluadas.

Los inhibidores de p38 (SB203580), ERK1/2 (U0126) y AKT (LY294002) (Enzo Life Sciences International, Inc., San Diego, CA) fueron incubados 30 minutos antes del preacondicionamiento ácido.

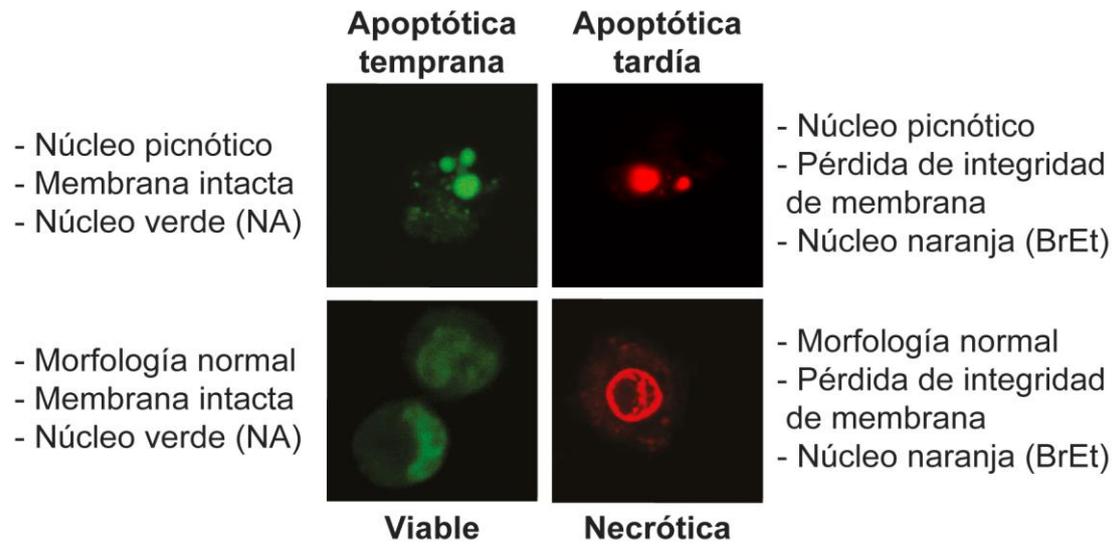
Los cristales de urato monosódico (MSU) (InvivoGen, San Diego, CA), las histonas recombinantes humanas (New England Biolabs, Ipswich, MA), la D-(+)-glucose (Sigma, St Louis, MO) y/o el TNF $\alpha$  recombinante humano (Cell Signaling Technology, Danvers, MA) fueron añadidos después del preacondicionamiento ácido y estuvieron presentes durante todo el ensayo. El manitol (Sigma, St Louis, MO) (control osmótico) y una concentración normal de glucosa (5 mM) fueron utilizados en paralelo y en ambos casos, los resultados no mostraron diferencias significativas con las células no tratadas (datos no mostrados).

## Ensayos de viabilidad y apoptosis

La muerte celular se evaluó luego de 24 horas mediante dos técnicas diferentes de uso corriente en nuestro laboratorio <sup>98,99</sup>.

1) Morfología nuclear: Se utilizó una mezcla de colorantes fluorescentes que se intercalan en el ADN como el naranja de acridina (100 µg/ml) (Sigma, St Louise, MO), que difunde libremente y permite diferenciar morfológicamente los núcleos normales de los apoptóticos, y el bromuro de etidio (100 µg/ml) (Sigma, St Louise, MO) que no penetra en células cuya membrana plasmática esté íntegra y permite diferenciar entre células viables e inviables. De esta manera, la combinación entre la morfología y el color de los núcleos permite distinguir entre células viables, apoptóticas tempranas, apoptóticas tardías y necróticas (Figura 6). Luego de 5 minutos, las suspensiones celulares fueron montadas en un portaobjetos y analizadas bajo un microscopio de fluorescencia directa (Nikon). Al menos 300 células fueron evaluadas en cada experimento.

2) Exposición de fosfatidilserina: La fosfatidilserina, la cual se expresa en la membrana plasmática cuando comienza el proceso apoptótico, fue detectada utilizando un kit comercial de Anexina V conjugada con isotiocianato de fluoresceína (FITC) e ioduro de propidio (IP) (BD Biosciences). La Anexina V posee alta afinidad por la fosfatidilserina y el ioduro de propidio penetra en células que han perdido la integridad de la membrana plasmática. Las células fueron marcadas con Anexina V durante 30 minutos en la oscuridad y finalmente, una solución de ioduro de propidio (0.5 µg/ml) fue agregada inmediatamente antes de la adquisición. Las muestras fueron adquiridas y analizadas por citometría de flujo.



**Figura 6.** Estudio de la morfología nuclear por tinción con naranja de acridina (NA) y bromuro de etidio (BrEt) y posterior análisis por microscopia de fluorescencia. Se pueden distinguir células viables, apoptóticas tempranas, apoptóticas tardías y necróticas.

### Ensayos de proliferación

Los progenitores ( $1,5 \times 10^4$ /pocillo) fueron sembrados en placa de 96 y tratados con los diferentes niveles de pH a distintos tiempos. La proliferación fue analizada mediante el recuento celular en cámara de Neubauer y por determinación de la actividad de la fosfatasa ácida, enzima constitutivamente expresada en las células. En este último ensayo, los progenitores fueron incubados con el sustrato cromogénico de la fosfatasa ácida, denominado pNPP (3 mg/ml) (Sigma, St Louis, MO), durante 1 hora a 37°C, la reacción fue detenida con NaOH (2 N) y leída por espectrofotometría a 405 nm<sup>94,99</sup>. El número de células endoteliales fue extrapolado utilizando una curva de calibración de absorbancia en función del número de células.

### **Ensayo de migración en transwells.**

La migración en respuesta a citoquinas (quimiotaxis) fue analizada en un sistema de transwells (Sigma, St Louis, MO) con membrana de 8 µm de diámetro de poro recubierta con gelatina. Las células ( $1,5 \times 10^4$ ) resuspendidas en EBM2 con SFB (5%) (Gibco, Grand Island, NY) fueron colocadas en la parte superior de la cámara, mientras que los estímulos quimioattractantes como el EGM2, el VEGF o el SDF1 (Abcys, Paris, France) fueron colocados en la parte inferior<sup>97</sup>. Luego de 6 o 24 horas, las células remanentes en la parte superior de la canasta fueron removidas mecánicamente y las membranas fueron fijadas, teñidas con Giemsa y fotografiadas bajo el microscopio óptico (magnificación original 40x). El número de células migradas fue determinado analizando las imágenes con el *software* Image J (NIH, Bethesda, MD).

### **Ensayo de reparación de heridas *in vitro***

La monocapa confluyente de CFCE fue dañada mecánicamente con la ayuda de un tip, generando una brecha vertical. En estas condiciones, los progenitores migran desde ambos lados de la brecha hacia el centro de la herida con el objetivo de cerrarla. El área dañada fue registrada fotográficamente inmediatamente después del daño (tiempo 0) y luego a diferentes tiempos (magnificación original 40x). El área de la herida fue medida mediante el análisis de las imágenes con el *software* ImageJ y el porcentaje de cierre de herida fue calculado según la siguiente fórmula [(área dañada a las 0 horas – área dañada a X horas) / área dañada a las 0 horas] \*100<sup>99</sup>.

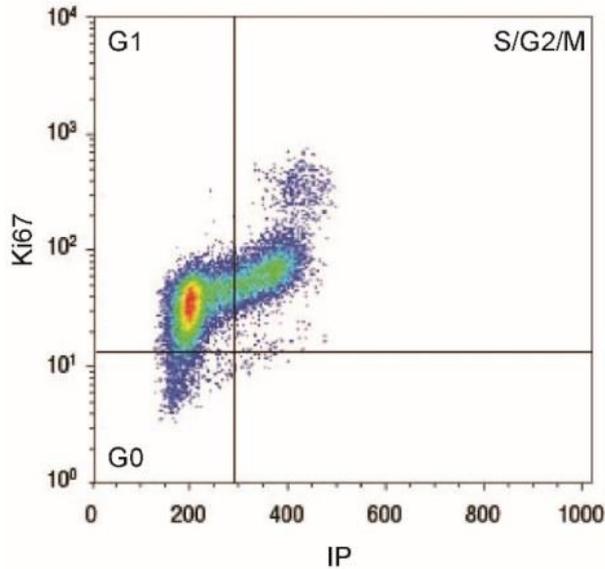
### **Ensayo de angiogénesis *in vitro***

Las células ( $1,5 \times 10^4$ /pocillo) fueron sembradas en placa de 96 pocillos sobre una matriz proteica de consistencia semisólida conocida como Geltrex<sup>TM</sup> (Gibco, Grand

Island, NY) la cual permite la diferenciación de las células endoteliales a estructuras tubulares. Luego de 18 horas, tiempo óptimo para la formación de dichos pseudotúbulos, se registraron imágenes fotográficas bajo un microscopio de contraste de fases. El número total de puntos de ramificación fue cuantificado en las imágenes (magnificación original 40x) utilizando el *software* ImageJ<sup>94,99</sup>.

### **Expresión del antígeno Ki67**

El ciclo celular de los progenitores fue sincronizado por incubación con EBM2 con 1% de SFB durante toda la noche antes de la acidificación. La progresión del ciclo celular fue determinada por citometría de flujo analizando simultáneamente la expresión del antígeno nuclear asociado a la proliferación celular Ki67 y el contenido de ADN (ioduro de propidio)<sup>93</sup>. Brevemente, las células fueron fijadas en etanol 70% frío, lavadas, e incubadas con el anticuerpo anti Ki67 conjugado con FITC (BD Biosciences, San Jose, CA) durante 30 minutos. Posteriormente, una solución de ioduro de propidio (0.5 µg/ml) fue agregada inmediatamente antes de la adquisición. El análisis fue realizado sobre la población de células viables. El antígeno Ki67 es una proteína nuclear que se expresa en todos los estadios del ciclo celular (G1, S, G2, M) y está ausente cuando la célula está en estado quiescente (G0), mientras que la fluorescencia del ioduro de propidio se incrementa en células que poseen mayor contenido de ADN (como ocurre en las fases S, G2 y M). De esta manera, el porcentaje de células en cada estadio fue determinado de acuerdo a la combinación de positividad para Ki67 y para ioduro de propidio (Figura 7). La línea de corte en cada canal de fluorescencia fue establecida utilizando la misma población celular sin marcar.



**Figura 7.** Gráfico de *dot plot* representativo de la doble marcación de Ki67 e ioduro de

### Expresión de los receptores de superficie CXCR4, KDR y PECAM

La expresión de las moléculas CXCR4, KDR y PECAM fue analizada por citometría de flujo. Las células fueron incubadas con anticuerpos monoclonales específicos CXCR4, KDR y PECAM (BD Biosciences) conjugados con FITC o con ficoeritrina (PE) durante 20 minutos a 4°C. Como control negativo, se utilizaron los isotipos correspondientes conjugados con los mismos fluorocromos. Las muestras fueron adquiridas y analizadas por citometría de flujo, utilizando el *software* FCS Express V3.

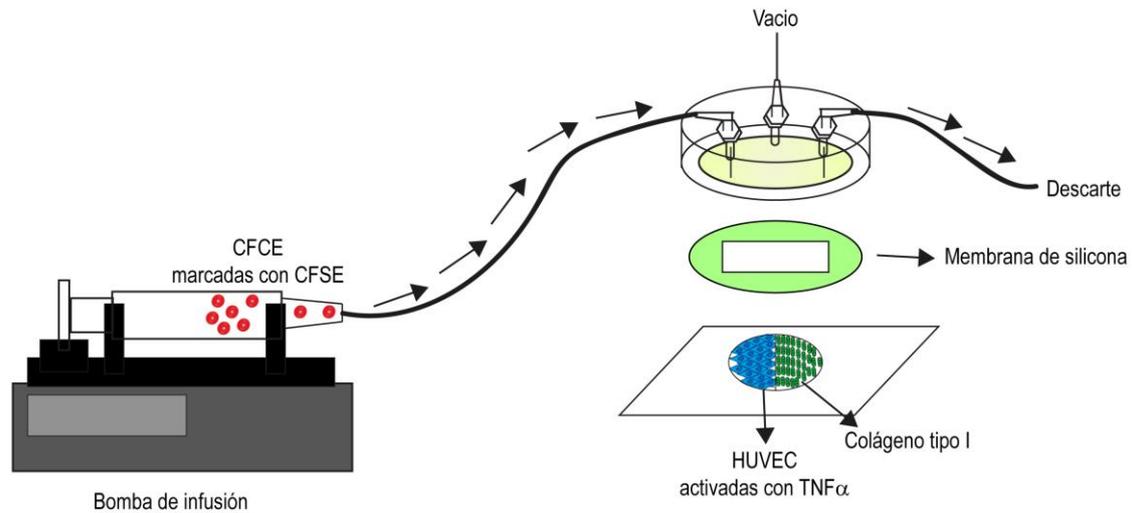
### Ensayo de adhesión

La adhesión de las CFCE fue estudiada bajo dos condiciones:

1) Adhesión estática: Las CFCE ( $2 \times 10^4$ /pocillo) fueron sembradas en placa de 48 pocillos previamente recubiertas con fibronectina recombinante bovina (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) (Sigma, St Louise, MO) o con colágeno tipo I de cola de rata (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) (BD Biosciences). Por otro lado, las CFCE ( $5 \times 10^4$ /pocillo) fueron teñidas con éster de succinimidilo de carboxifluoresceína (eBioscience, San Diego, CA) y sembradas sobre una monocapa de HUVEC activadas previamente durante 4 horas con  $\text{TNF}\alpha$  (20

ng/ml). Luego de 30 minutos o 2 horas, los pocillos fueron lavados con PBS 3 veces y las células adherentes fueron registradas fotográficamente bajo un microscopio de contraste de fases (magnificación 40x) o utilizando un microscopio confocal (Olympus FV-1000, Tokio, Japón). El número de células adheridas fue determinado utilizando el *software* ImageJ.

2) Adhesión en un modelo dinámico: Las CFCE (50/segundo) fueron teñidas con éster de succinimidilo de carboxifluoresceína (eBioscience, San Diego, CA) y perfundidas a través de la cámara de flujo. Esta cámara es un dispositivo de acrílico que posee orificios de entrada y salida para el líquido de perfusión y, entre la cámara y el vidrio previamente recubierto con colágeno tipo I o con una monocapa de HUVEC activadas con TNF $\alpha$ , se encuentra una membrana de silicona con una ranura que permite el paso de las CFCE. Según el tamaño de la ranura y la velocidad de perfusión, se define la fuerza de cizallamiento aplicada. Las CFCE fueron perfundidas sobre el colágeno tipo I y HUVEC activadas a una velocidad de 10  $\mu$ l/min (fuerza de cizallamiento: 1 dyn/cm<sup>2</sup>) durante 15 minutos (Figura 8). Luego, la cámara fue desmontada y las células adherentes fueron fijadas con PFA (1%) y fotografiadas utilizando un microscopio confocal (Olympus FV-1000, Tokio, Japón). El número de células adheridas fue determinado utilizando el *software* ImageJ.



**Figura 8.** Esquema de la cámara de flujo. Las CFCE marcadas con éster de succinimidilo de carboxifluoresceína (CFSE) son perfundidas sobre las HUVEC activadas con  $TNF\alpha$  o sobre colágeno tipo I adheridos a un vidrio conectado a una cámara de flujo.

### Detección de fosfoproteínas por Western Blot

Las CFCE preacondicionadas o no fueron incubadas con EGM2 o EBM2 durante 30 minutos y lisadas con *loading buffer* (62.5 mM, tris-HCl pH 6.8, 25% glicerol, 2% SDS, 0.01% azul de bromofenol y 5% 2-mercaptoetanol) en presencia de un cóctel de inhibidores de proteasas. Cantidades equivalentes de proteínas de cada muestra (30  $\mu$ g/calle) fueron corridas por electroforesis en gel de acrilamida al 10% por SDS-PAGE y electrotransferidos a membranas de nitrocelulosa (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK). Luego de 30 minutos de bloqueo con BSA (3%), las membranas fueron incubadas con anticuerpos primarios (antifosfo ERK1/2 (Tyr 204) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), antifosfo p38 (Tyr 182) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), antifosfo AKT (Tyr 473) (Abcam, Cambridge, UK), anti FAK (fosfo Y397) (Abcam, Cambridge, UK) y anti  $\beta$ -actina (BD Biosciences, San Jose, CA) durante toda la noche a 4°C. Una vez lavadas, las mismas fueron incubadas con un anticuerpo secundario conjugado con HRP durante 1 hora a temperatura ambiente.

Las bandas de las proteínas fueron visualizadas utilizando la reacción de electroquimioluminiscencia (ECL). Los resultados del Western Blot fueron cuantificados calculando la densidad óptica (DO) relativa de las bandas previamente escaneadas utilizando el *software* Gel-Pro Analyzer 3.1 (Rockville, MD) y los valores fueron normalizados respecto a los valores de  $\beta$ -actina.

### **Modelo murino de isquemia de miembro inferior**

Estos ensayos fueron realizados en el INSERM U1140, Universidad Paris Descartes, Francia. Se utilizaron ratones atímicos inmunodeprimidos (conocidos como *nude*), los cuales fueron criados en un ambiente controlado con libre acceso a agua y a una dieta estándar. El cuidado de los animales se ajustó a las normas francesas (*Services Vétérinaires de la Santé et de la Production Animale*, Paris, Francia), y los experimentos se realizaron de acuerdo con las pautas del Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de la Universidad Paris Descartes (C75.06.02). Los ratones fueron sometidos a una cirugía para inducir isquemia en el miembro inferior<sup>62,100</sup>. Los animales fueron anestesiados por inhalación de isoflurano 20%. Luego, se realizó una pequeña incisión en el miembro izquierdo, por la cual se puede observar el paquete vasculonervioso, del cual se separó la arteria femoral. Esta arteria fue ligada con un hilo de seda no reabsorbible a 0.5 cm de la bifurcación de las arterias safena y poplítea y, por último, la herida fue cerrada con un *clamp* quirúrgico. Las CFCE ( $1 \times 10^5$ ) fueron inyectadas en el plexo retroorbital o directamente en el músculo isquémico en solución fisiológica 5 horas después de la cirugía y la solución fisiológica sola fue utilizada como control negativo. El índice de perfusión del flujo sanguíneo en el miembro isquémico vs. miembro normal fue determinado luego de 14 días utilizando un sistema de imágenes de perfusión de láser Doppler y su *software* asociado (PeriScan Pim3, Perimed, Crappone, France). Los músculos gastrocnemios fueron iaremovidos, fijados, incluidos en parafina y finalmente teñidos con hematoxilina-

eosina (H&E) o con la tinción tricrómica de Masson. La densidad vascular fue determinada contando el número de vasos sanguíneos en los preparados con la tinción tricrómica de Masson. El grado de inflamación fue calculado analizando la presencia vacuolas, núcleos centralizados e hipertróficos y el infiltrado leucocitario en los cortes teñidos con H&E.

### **Análisis estadístico de los resultados**

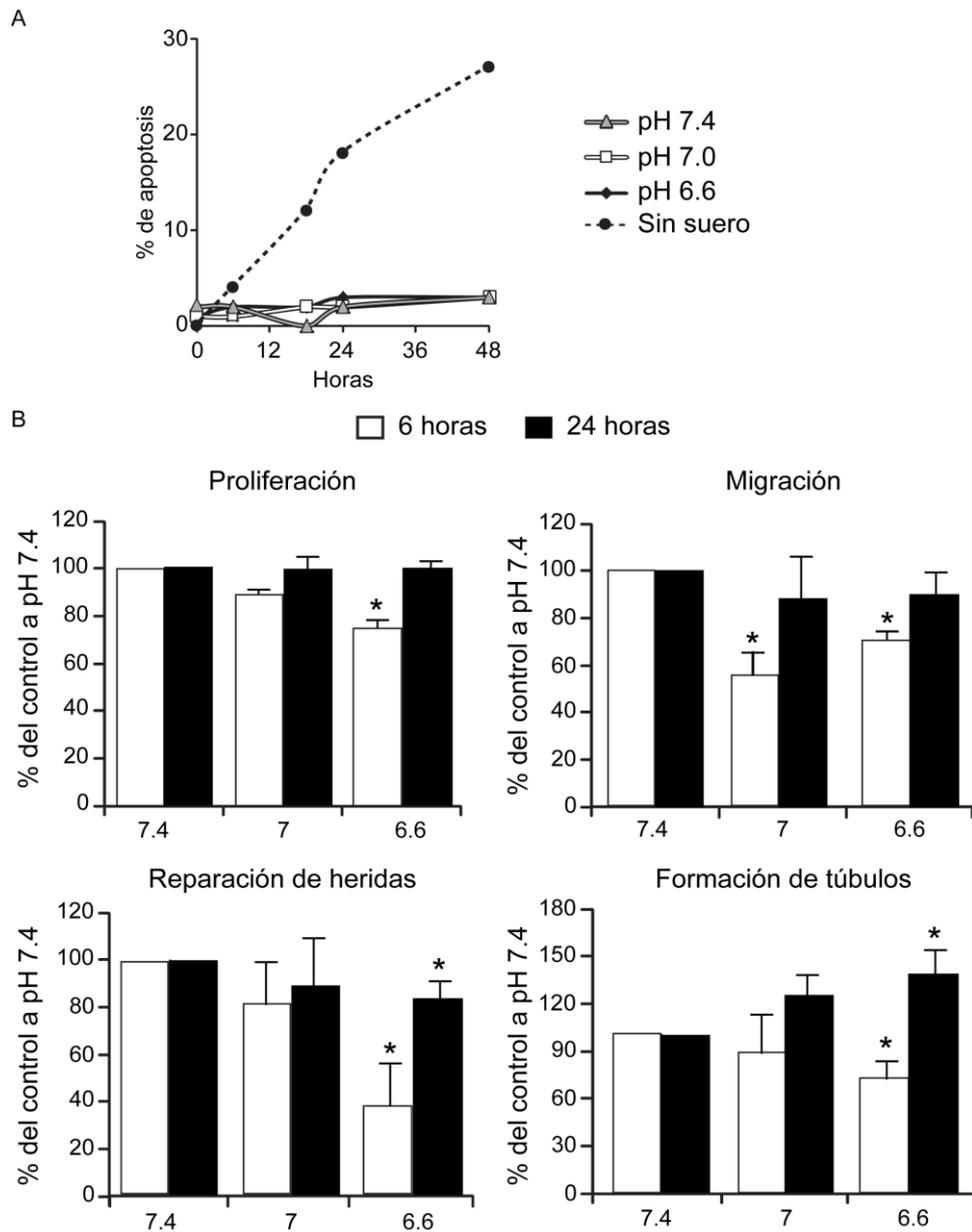
Los resultados fueron expresados como promedio  $\pm$  error estándar de la media. Para determinar diferencias significativas entre grupos, los datos fueron analizados mediante la prueba T de Student o ANOVA seguido por el test de análisis de múltiples comparaciones Newman-Keuls de acuerdo al diseño experimental, utilizando el *software* GraphPad Prism (Versión 5.0, San Diego, CA). Un valor de  $p < 0.05$  fue considerado estadísticamente significativo.

# **RESULTADOS**

## Efecto dual de la acidosis sobre las respuestas angiogénicas de las CFCE

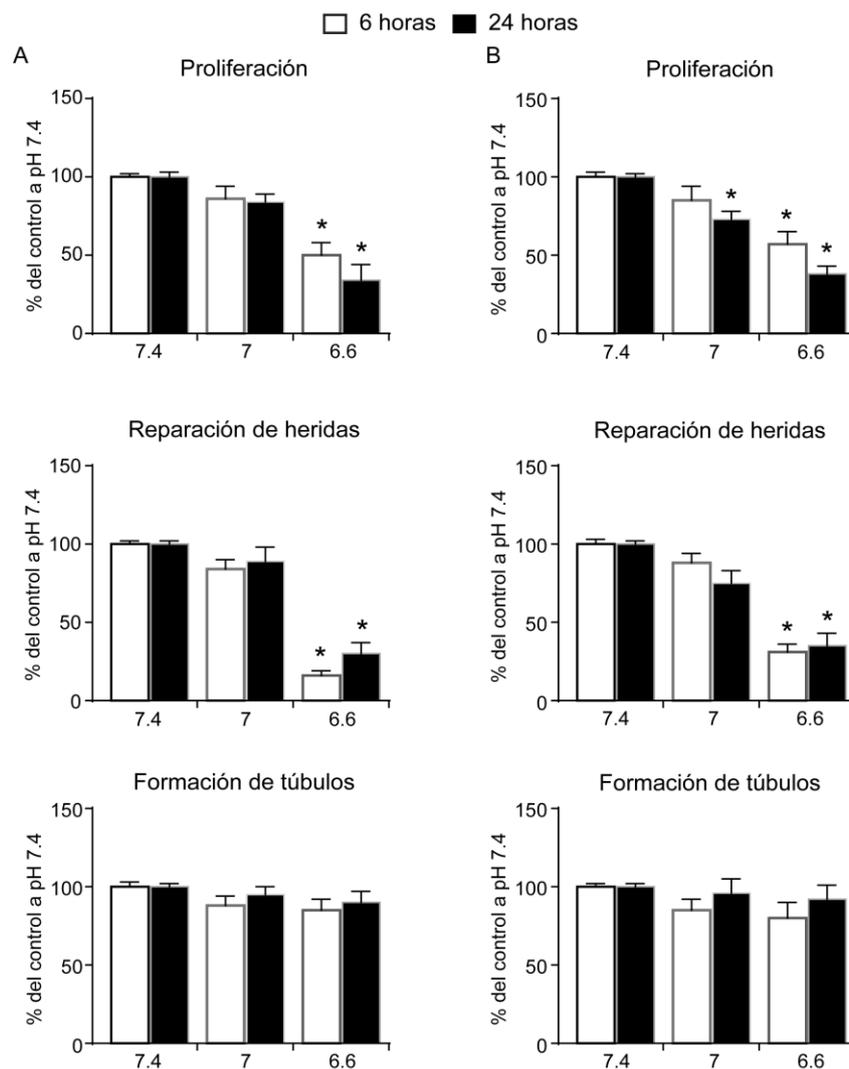
Basándonos en nuestro estudio previo en el que demostramos que la acidosis induce apoptosis en las células CD34<sup>+</sup> <sup>93</sup>, en los primeros ensayos analizamos si el medio ácido afecta la supervivencia de las CFCE. Para ello, incubamos las células en medio de crecimiento EGM2 ajustado a pH 7.4, 7.0 y 6.6 y la apoptosis fue determinada a distintos tiempos por citometría de flujo luego de la doble marcación con anexina V e ioduro de propidio. A diferencia de lo observado en las células CD34<sup>+</sup>, mientras que la privación de suero indujo apoptosis de las CFCE, la acidosis no tuvo efecto (Figura 9A).

A continuación, estudiamos *in vitro* el efecto de la acidosis en numerosas respuestas angiogénicas de estos progenitores como la proliferación, la quimiotaxis, la capacidad de reparar heridas y la formación de pseudotúbulos. Encontramos que todas las respuestas estudiadas disminuyeron de manera dependiente del pH luego de 6 horas de incubación a pH ácido. Sin embargo, cuando las mismas respuestas fueron analizadas luego de 24 horas a pH ácido, el efecto inhibitorio de la acidosis sobre la reparación de heridas, la proliferación y la quimiotaxis ya no fue observado y, sorprendentemente, la formación de túbulos se encontró notablemente aumentada en estos progenitores (Figura 9B).



**Figura 9. Efecto de la acidosis en la sobrevida y funcionalidad de las CFCE.** Las células fueron incubadas en EBM2 (sin suero) o en EGM2 ajustado a pH 7.4, 7.0 o 6.6. A) La apoptosis fue medida en los periodos de tiempo indicados mediante la doble marcación con anexina V e yoduro de propidio y el posterior análisis por citometría de flujo (n=4). B) Las respuestas angiogénicas fueron determinadas luego de 6 y 24 horas (n=6). \*p<0.05 vs pH 7.4.

En los siguientes experimentos, analizamos el efecto de la acidosis en las respuestas angiogénicas de células endoteliales de macro (HUVEC) y microvasculatura (HMEC1). Cuando estudiamos la proliferación y la reparación de heridas observamos que las mismas disminuyeron de manera dependiente de pH tanto a las 6 como a las 24 horas (Figura 10), mientras que la formación de pseudotúbulos no se encontró afectada a ningún tiempo estudiado (Figura 10).



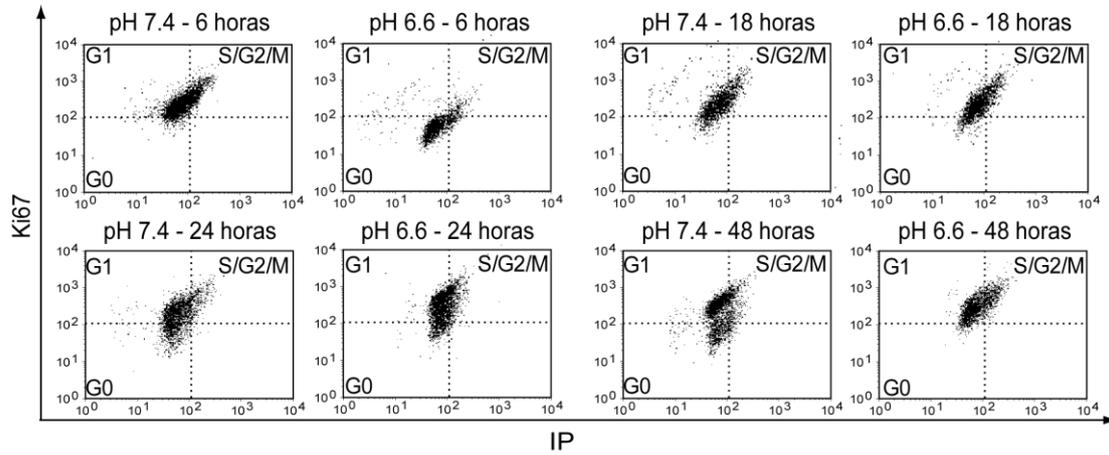
**Figura 10. Efecto de la acidosis en la funcionalidad de las células endoteliales maduras.** Las células endoteliales HMEC1 (A) y HUVEC (B) fueron incubadas en EGM2 ajustado a pH 7.4, 7.0 o 6.6 y las respuestas angiogénicas fueron determinadas luego de 6 y 24 horas (n=3). \*p<0.05 vs pH 7.4.

El análisis por citometría de flujo de la expresión del antígeno Ki67 indicó que el efecto inhibitorio temprano de la acidosis sobre la proliferación de CFCE estuvo asociado a un arresto del ciclo celular. Mientras que el ciclo celular se encontró marcadamente inhibido luego de 6 horas a pH 6.6 (incremento del porcentaje de las CFCE en G0 y disminución del porcentaje de estas en las fases proliferativas S/G2/M), el arresto fue menor a las 18 horas y desapareció completamente a las 24 horas, donde ya no se observaron diferencias significativas entre los distintos valores de pH (Figura 11A). Más aún, a las 48 horas la proliferación a pH 6.6 (porcentaje de las CFCE en las fases S/G2/M) fue mayor que a pH 7.4 (Figura 11A). Consistentemente con estas observaciones, hallamos un aumento en el número total de células a pH ácido luego de 48 horas (Figura 11B). Teniendo en cuenta que el total de células fue ligeramente mayor cuando las CFCE fueron expuestas a pH 6.6 vs pH 7.0, los próximos experimentos fueron realizados a pH 6.6.

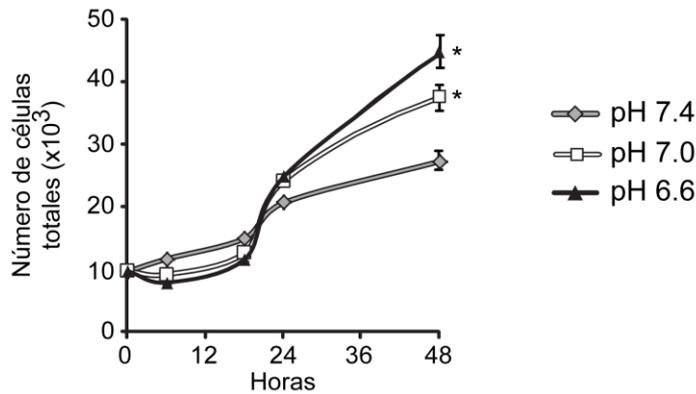
A

Marcación de Ki67 e ioduro de propidio (% de células positivas)

| %      | 6 horas |         | 18 horas |         | 24 horas |        | 48 horas |         |
|--------|---------|---------|----------|---------|----------|--------|----------|---------|
|        | pH 7.4  | pH 6.6  | pH 7.4   | pH 6.6  | pH 7.4   | pH 6.6 | pH 7.4   | pH 6.6  |
| G0     | 18 ± 1  | 77 ± 4* | 19 ± 2   | 26 ± 3* | 22 ± 3   | 21 ± 3 | 23 ± 1   | 5 ± 1*  |
| G1     | 63 ± 4  | 15 ± 3* | 59 ± 3   | 55 ± 5  | 51 ± 6   | 46 ± 6 | 55 ± 5   | 63 ± 7  |
| S/G2/M | 18 ± 2  | 8 ± 2*  | 21 ± 2   | 18 ± 3  | 27 ± 4   | 33 ± 3 | 22 ± 2   | 33 ± 4* |



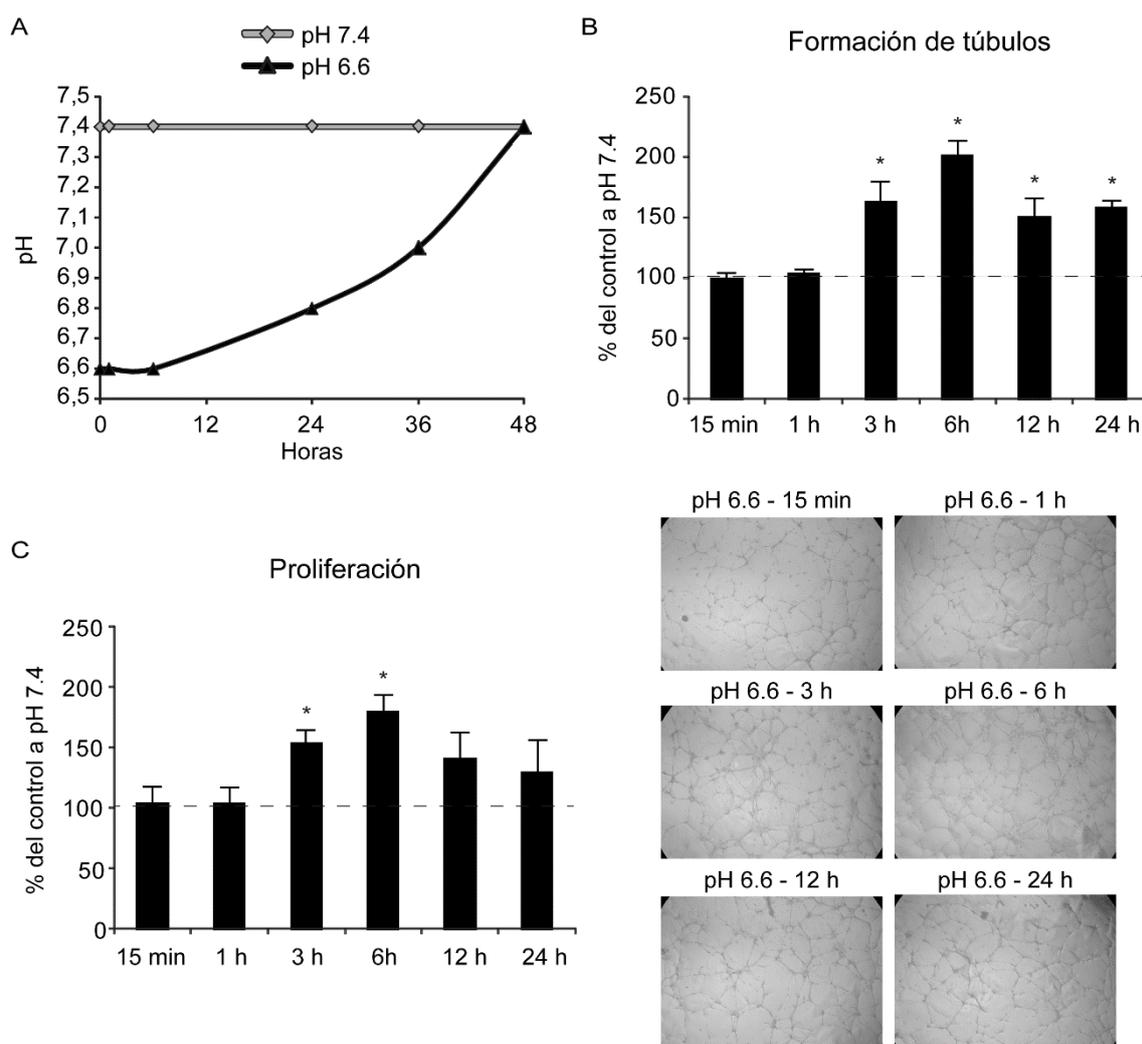
B



**Figura 11. Efecto de la acidosis en la progresión del ciclo celular y la proliferación de las CFCE.** Las células fueron incubadas en EGM2 ajustado a pH 7.4, 7.0 o 6.6. A) La progresión del ciclo celular fue analizada luego del tiempo indicado mediante la doble marcación con el antígeno Ki67 e ioduro de propidio y el análisis fue realizado por citometría de flujo (n=4). B) El recuento celular se realizó utilizando una cámara de Neubauer en los periodos de tiempo indicados (n=5). \*p<0.05 vs pH 7.4.

## **El precondicionamiento ácido incrementa las respuestas angiogénicas de las CFCE**

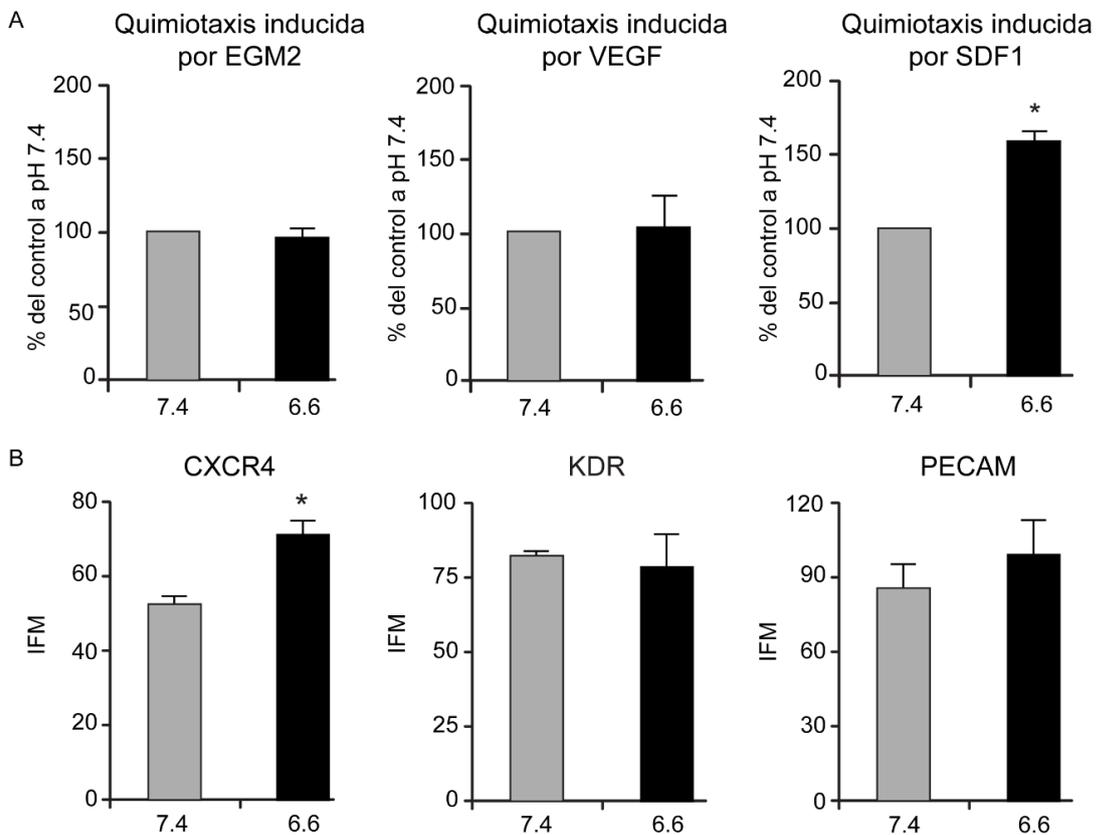
Con el propósito de explicar el efecto dual de la acidosis, los niveles de pH en el medio de cultivo fueron medidos a diferentes tiempos después de la acidificación. Encontramos que el pH del medio permanece estable en valores de 6.6 durante las primeras 6-8 horas y luego se basifica lentamente hasta aproximarse al valor normal de 7.4 a las 48 horas (Figura 12A). Estos resultados sugieren que, aunque la acidosis inicialmente induce un arresto del ciclo celular, una vez que el pH se balancea, los progenitores endoteliales expuestos a medio ácido exhiben un incremento en sus respuestas proangiogénicas. Para probar esta hipótesis, realizamos un precondicionamiento ácido que consistió en incubar a los progenitores a pH 7.4 o 6.6 por un determinado periodo de tiempo y luego reemplazar el medio acidificado por medio fresco a pH 7.4. Inicialmente realizamos un estudio cinético de la formación de túbulos para determinar el tiempo mínimo de exposición al medio ácido que era necesario para observar el efecto proangiogénico máximo. Observamos que la exposición a pH 6.6 durante tiempos cortos como 15 minutos o 1 hora no fue suficiente para modificar la funcionalidad de las CFCE (Figura 12B) y, aunque a las 3 horas notamos un incremento significativo en el número de ramificaciones, el efecto proangiogénico máximo fue detectado luego de 6 horas (Figura 12B). Estos resultados fueron similares cuando analizamos la proliferación celular (Figura 12C).



**Figura 12. El preconditionamiento ácido incrementa la proliferación y la capacidad de formación de túbulos de las CFCE.** A) Las células fueron incubadas en EGM2 ajustado a pH 7.4, 7.0 o 6.6 y los niveles de pH fueron medidos a diferentes tiempos utilizando un pHmetro (n=3). B) Las células fueron incubadas en EGM2 normal o acidificado por el tiempo indicado y luego sembrados sobre Geltrex en EGM2 fresco a pH 7.4. Luego de 18 horas, el número de ramificaciones fue medido analizando las imágenes con el *software* ImageJ (n=6). C) Las células fueron cultivadas en EGM2 ácido por el periodo de tiempo indicado y luego el medio fue reemplazado por EGM2 fresco a pH 7.4. Luego de 48 horas, la proliferación celular fue determinada por el ensayo colorimétrico de pNPP (n=3). \*p<0.05 vs pH 7.4.

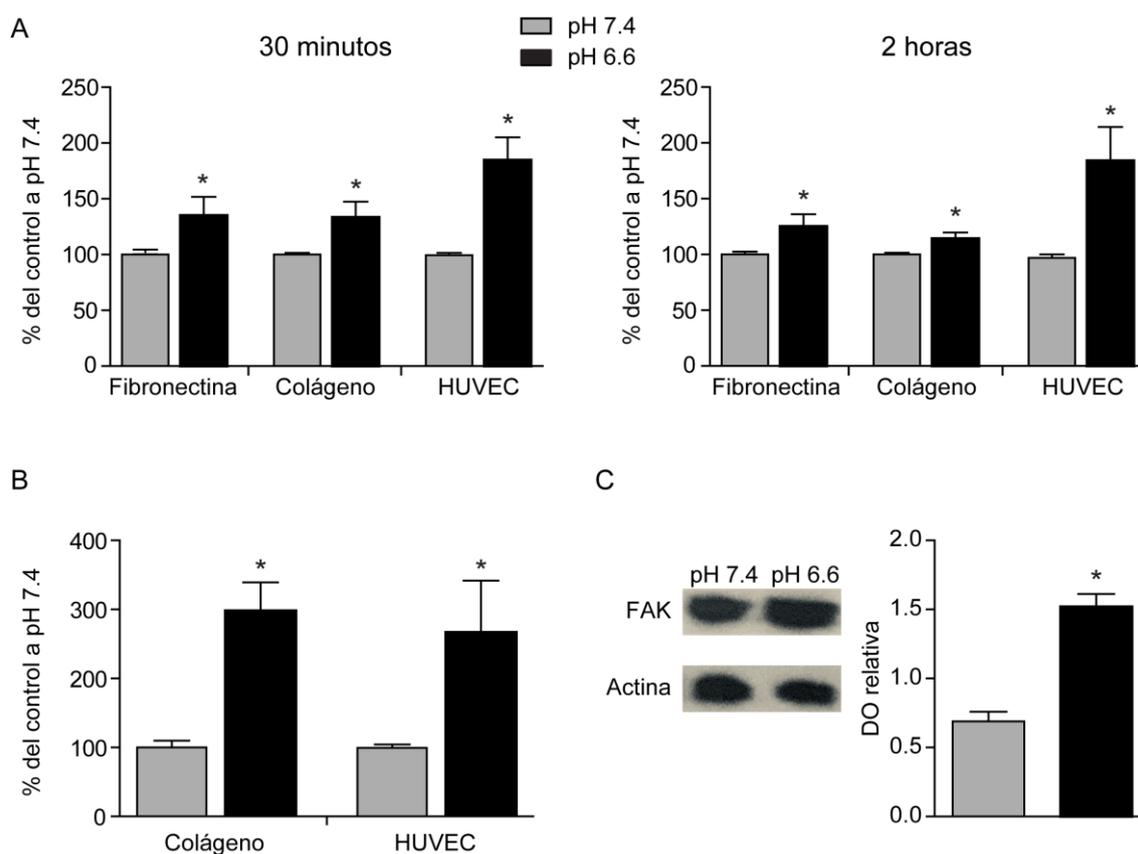
Habiendo determinado el tiempo óptimo de preconditionamiento capaz de inducir un aumento la proliferación y tubulogénesis, en los siguientes experimentos evaluamos otras respuestas angiogénicas de las CFCE bajo estas condiciones. Una de las primeras etapas de la vasculogénesis es la migración de las CFCE al sitio de injuria en respuesta a un gradiente de citoquinas y quimioquinas, proceso denominado quimiotaxis. Al estudiar esta función observamos que el preconditionamiento ácido

no fue capaz de modular la migración de CFCE inducida por EGM2 o por VEGF solo (Figura 13A). Considerando que el ligando SDF1 y su receptor CXCR4 juegan un papel fundamental en la migración de estas células, examinamos el efecto de la acidosis en la quimiotaxis mediada por SDF1 y observamos que la misma aumentó significativamente a pH ácido (Figura 13A). Interesantemente, este incremento fue acompañado por una elevada expresión del receptor de SDF1, el CXCR4, mientras que los niveles de expresión del receptor de VEGF (KDR) o de la molécula de adhesión PECAM no fueron alterados (Figura 13B).



**Figura 13. La quimiotaxis inducida por SDF1 y la expresión de CXCR4 se encontraron incrementadas en las CFCE precondicionadas.** Las células fueron incubadas en EGM2 ajustado a pH 7.4 o 6.6 durante 6 horas y luego el medio fue reemplazado por EGM2 fresco a pH 7.4. A) La migración en respuesta a EGM2, SDF1 (20 ng/ml) y VEGF (20 ng/ml) fue evaluada sembrando las células en transwells. Después de 24 horas, el recuento de células migradas fue realizado bajo un microscopio óptico (n=4-5). B) La expresión de CXCR4, KDR y PECAM fue determinada luego de 24 horas por citometría de flujo (n=4). Los resultados son expresados en intensidad de fluorescencia media (IFM). \*p<0.05 vs pH 7.4.

Además de la migración, la adhesión de las CFCE al endotelio activado o a proteínas de la matriz extracelular son pasos fundamentales para un *engraftment* exitoso en el sitio dañado. Cuando analizamos la adhesión en condiciones estáticas, las CFCE preacondicionadas mostraron un incremento tanto en la adhesión intermedia (30 minutos) como en la focal (2horas) a fibronectina, colágeno tipo I y a células endoteliales maduras (HUVEC) activadas (Figura 14A). Resultados similares fueron observados en condiciones dinámicas, donde la acidosis temporal indujo un incremento en la adhesión de las CFCE a colágeno tipo I y a HUVEC activadas cuando las mismas fueron sometidas a una fuerza de cizallamiento fisiológica (Figura 14B). Luego de la interacción con la matriz extracelular, las integrinas inician la transducción de señales mediante el reclutamiento de diversas proteínas de señalización y adaptadores a través de sus dominios citoplásmicos como la quinasa de adhesión focal (FAK, del inglés *focal adhesion kinase*), la cual desempeña un papel principal en la señalización de integrinas y la migración celular<sup>101</sup>. Nuestros resultados demuestran que los niveles de fosforilación de FAK en Tyr576 fueron mayores en las CFCE preacondicionadas con respecto a las que no lo fueron (Figura 14C).

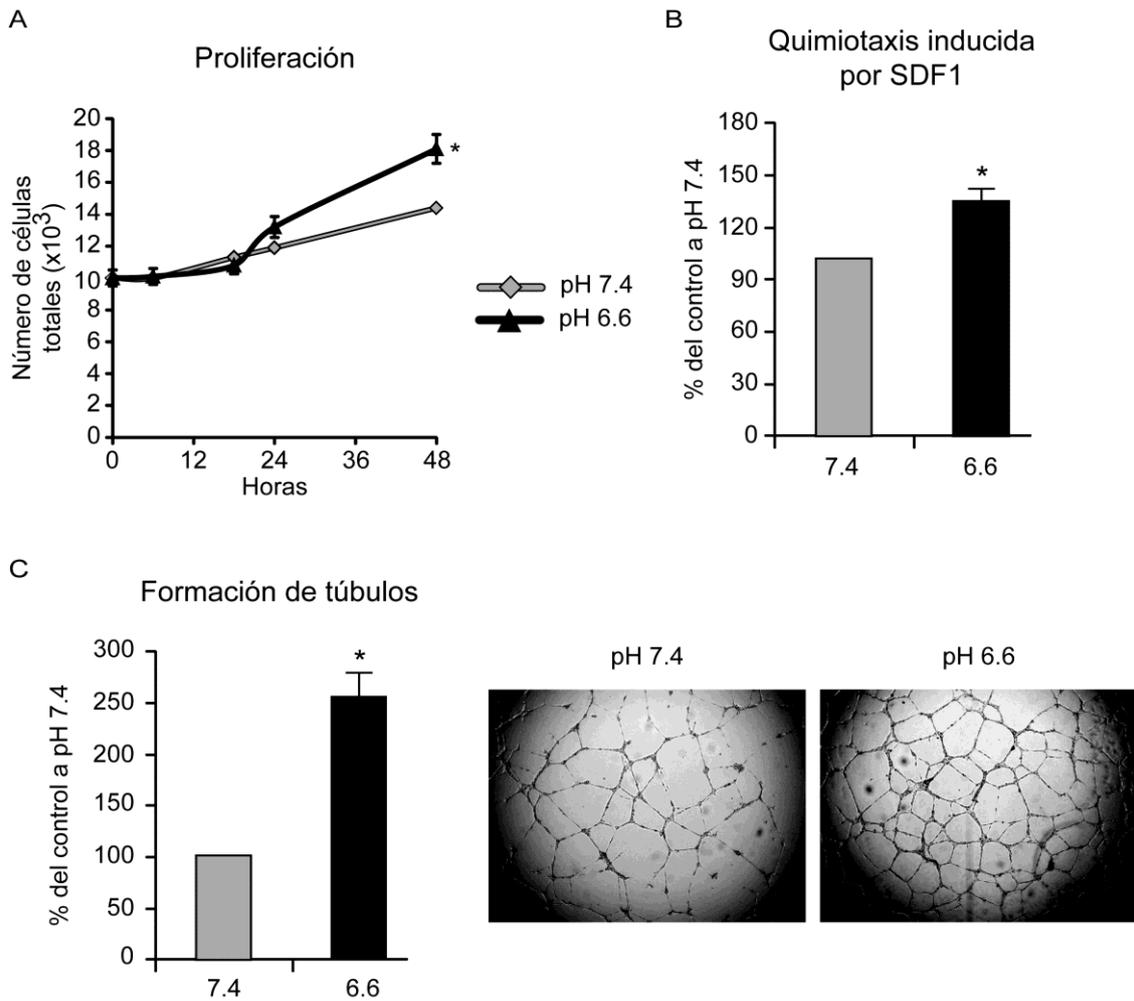


**Figura 14. La adhesión tanto estática como dinámica se encuentran incrementadas las CFCE precondicionadas.** Las células fueron incubadas en EGM2 ajustado a pH 7.4 o 6.6 durante 6 horas y luego el medio fue reemplazado por EGM2 fresco a pH 7.4. Luego las CFCE fueron teñidas o no con el colorante éster de succinimidilo de carboxifluoresceína. A) La adhesión a fibronectina, colágeno tipo I y HUVEC activadas fue estudiada luego de 30 minutos o 2 horas. Las células adheridas fueron fotografiadas y contadas con el *software* Image J (n=5). B) Las CFCE fueron perfundidas sobre colágeno tipo I y HUVEC activadas durante 15 minutos a una fuerza de cizallamiento de  $1 \text{ dyn/cm}^2$  (n=4). C) Las CFCE fueron sembradas sobre fibronectina durante 30 minutos y los niveles de fosforilación de FAK fue determinada por Western blot. Cada membrana fue reincubada con un anticuerpo anti actina para calcular la densidad óptica (DO) relativa de las bandas utilizando el *software* Gel-Pro (n=4). \* $p < 0.05$  vs pH 7.4.

En conjunto, estos resultados demuestran que el precondicionamiento ácido incrementa las respuestas angiogénicas de las CFCE como la proliferación, la tubulogénesis, la migración y la adhesión.

## **Las CFCE derivadas de sangre periférica incrementan su actividad angiogénica luego del preconditionamiento ácido**

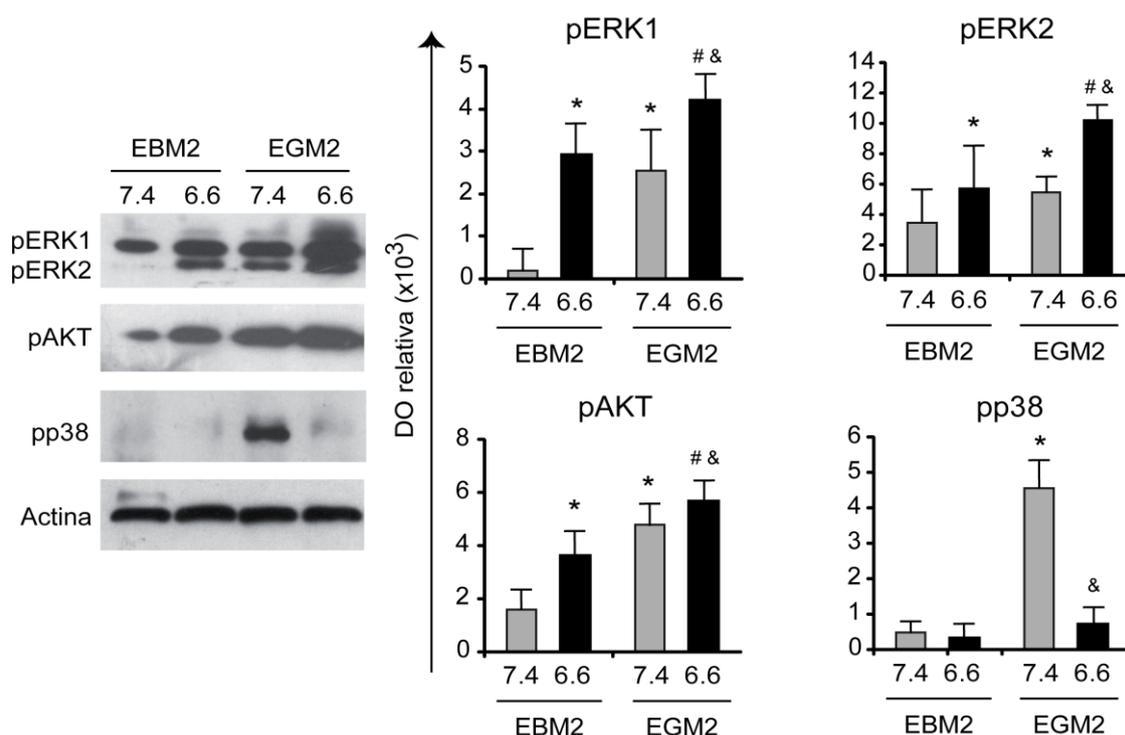
Aunque existe un consenso general de que las CFCE derivadas de sangre del cordón poseen un mayor grado de proliferación y forman vasos sanguíneos más estables y funcionales *in vivo* que las CFCE de sangre periférica<sup>102,103</sup>, la posibilidad de producir una buena cantidad de progenitores endoteliales adultos que puedan ser utilizados de manera autóloga sigue siendo un reto. Para dilucidar si el efecto proangiogénico de la acidosis también era eficaz en las CFCE aisladas de sangre periférica, repetimos los experimentos utilizando esta fuente de progenitores. Aunque la tasa de proliferación de estas células fue más baja que las derivadas de sangre del cordón umbilical, el preconditionamiento ácido indujo un ligero pero significativo incremento en el número total de células luego de 48 horas (Figura 15A). Más aún, la quimiotaxis mediada por SDF1 y la tubulogénesis también aumentaron robustamente luego del preconditionamiento de las CFCE de sangre periférica (Figura 15B y C).



**Figura 15. El preconditionamiento ácido incrementó la actividad angiogénica de las CFCE derivadas de sangre periférica.** Las células fueron incubadas en EGM2 ajustado a pH 7.4 o 6.6 durante 6 horas y luego el medio fue reemplazado por EGM2 fresco a pH 7.4. A) El recuento celular fue determinado utilizando una cámara de Neubauer en los tiempos indicados (n=4). B) La migración en respuesta a SDF1 (20 ng/ml) fue determinada sembrando las células en transwells. Después de 24 horas, el recuento de células migradas fue realizado bajo un microscopio óptico (n=3). C) Las células fueron sembradas sobre Geltrex y el número de ramificaciones fue medido luego de 18 horas analizando las imágenes con el software ImageJ. \*p<0.05 vs pH 7.4.

## **Vías de señalización intracelular involucradas en el efecto proangiogénico del preconditionamiento ácido**

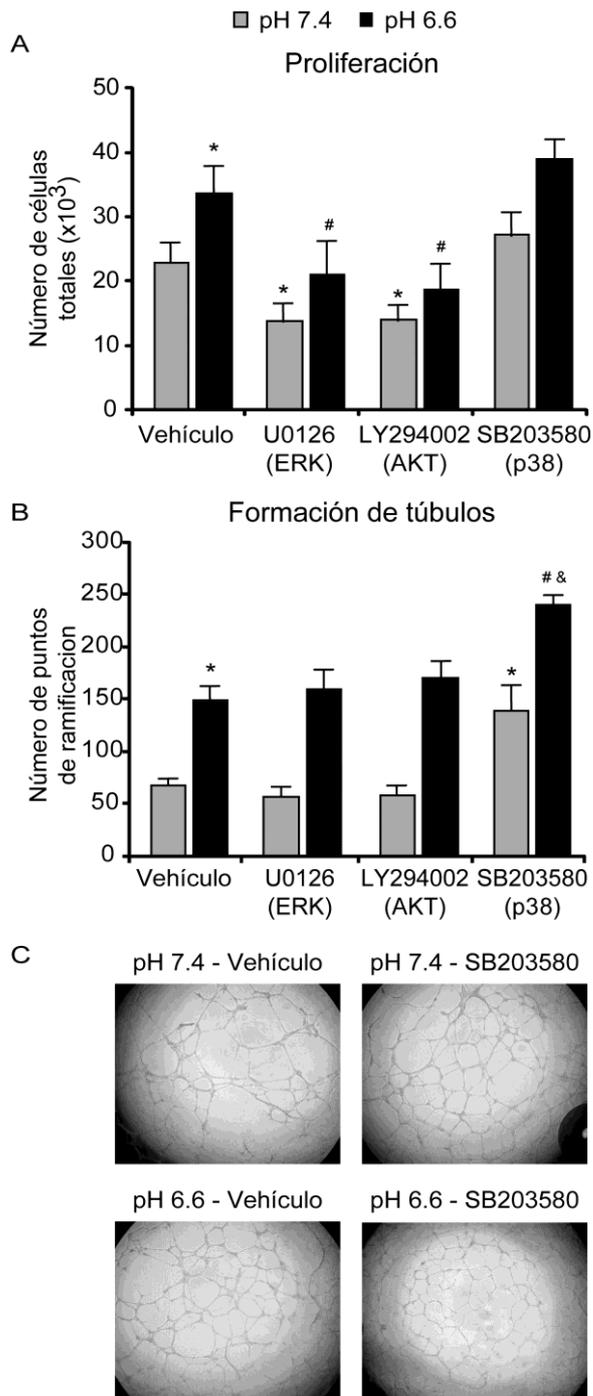
Con el propósito de elucidar los mecanismos involucrados en los efectos proangiogénicos del preconditionamiento ácido, estudiamos las vías de señalización clásicas que regulan la funcionalidad de progenitores y células endoteliales como ERK1/2, AKT y p38<sup>104-106</sup>. Los ensayos de Western blot mostraron que el preconditionamiento ácido induce una mayor activación basal de ERK1/2 y AKT cuando las CFCE se encuentran en un medio de cultivo sin citoquinas como el EBM2 y además potencia la fosforilación de estas vías inducida por un medio rico en citoquinas como el EGM2 (Figura 16). Con respecto a p38, si bien no se detectó una activación basal (en EBM2), la fosforilación de esta vía inducida por EGM2 se encontró completamente inhibida en progenitores preconditionados (Figura 16). Estos resultados sugieren que los efectos proangiogénicos observados en el preconditionamiento están mediados por la activación de pERK1/2 y pAKT y la inhibición de p38.



**Figura 16. El preconditionamiento ácido activa ERK 1/2 y AKT e inhibe p38.** Las células fueron previamente incubadas en EGM2 o EBM2 ajustado a pH 7.4 o 6.6 durante 6 horas y luego el medio fue reemplazado por medio fresco a pH 7.4. Los niveles de fosforilación de ERK1/2, AKT o p38 fueron detectados luego de 2 minutos por Western blot. Cada membrana fue reincubada con un anticuerpo anti actina para calcular la densidad óptica (DO) relativa de las bandas utilizando el *software* Gel-Pro (n=3-5). \*p<0.05 vs EBM2 a pH 7.4, #p<0.05 vs EBM2 a pH 6.6 y &p<0.05 vs EGM2 a pH 7.4.

Para probar esta hipótesis, en los siguientes experimentos el preconditionamiento ácido fue realizado en presencia y ausencia de inhibidores farmacológicos de AKT (LY294002), ERK1/2 (U0126) o p38 (SB203580) y, luego de 6 horas, las monocapa de células fue lavada y el medio de cultivo fue reemplazado por EGM2 fresco, con el objetivo de remover los inhibidores y restaurar el pH a 7.4. Las concentraciones utilizadas de estos compuestos suprimieron efectivamente la fosforilación de las quinasas correspondientes y las variaciones en el pH del medio no alteraron su actividad inhibitoria (datos no mostrados). Nuestros resultados mostraron que la supresión de las vías ERK1/2 y AKT inhibió completamente el aumento en la proliferación inducido por el pH ácido, mientras que el inhibidor de p38 no tuvo efecto (Figura 17A). Por el contrario, la tubulogénesis no fue alterada por los inhibidores de

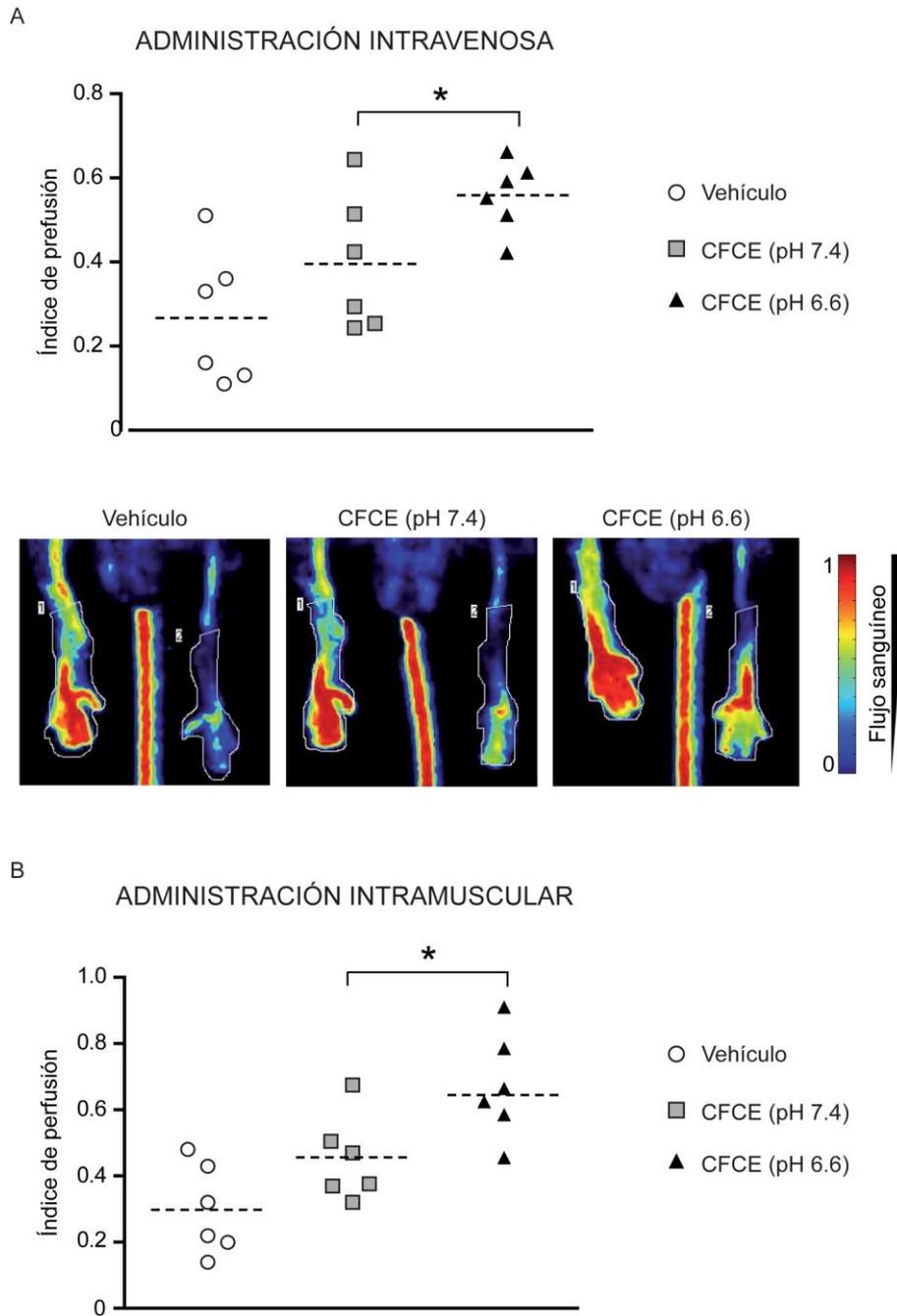
AKT y ERK, no obstante se encontró significativamente aumentada en presencia del inhibidor de p38 (Figura 17B y C). De hecho, el bloqueo de p38 a pH 7.4 mimetiza el aumento observado a pH 6.6 y además este inhibidor fue capaz de potenciar el incremento en la formación de túbulos observado en progenitores preacondicionados (Figura 17B y C).



**Figura 17. Vías de señalización involucradas en los efectos proangiogénicos de la acidosis.** Las células fueron incubadas en EGM2 ajustado a pH 7.4 o 6.6 durante 6 horas en presencia o ausencia de U0126 (20  $\mu$ M), LY294002 (5  $\mu$ M) o SB203580 (25  $\mu$ M). A) La proliferación y (B y C) la formación de túbulos fueron determinadas luego de 48 y 18 horas respectivamente (n=4-6). \* $p < 0.05$  vs vehículo a pH 7.4, # $p < 0.05$  vs el mismo inhibidor a pH 7.4 y & $p < 0.05$  vs vehículo a pH 6.6.

## **El preconditionamiento ácido aumenta el potencial regenerativo de las CFCE en un modelo murino de isquemia de miembro inferior**

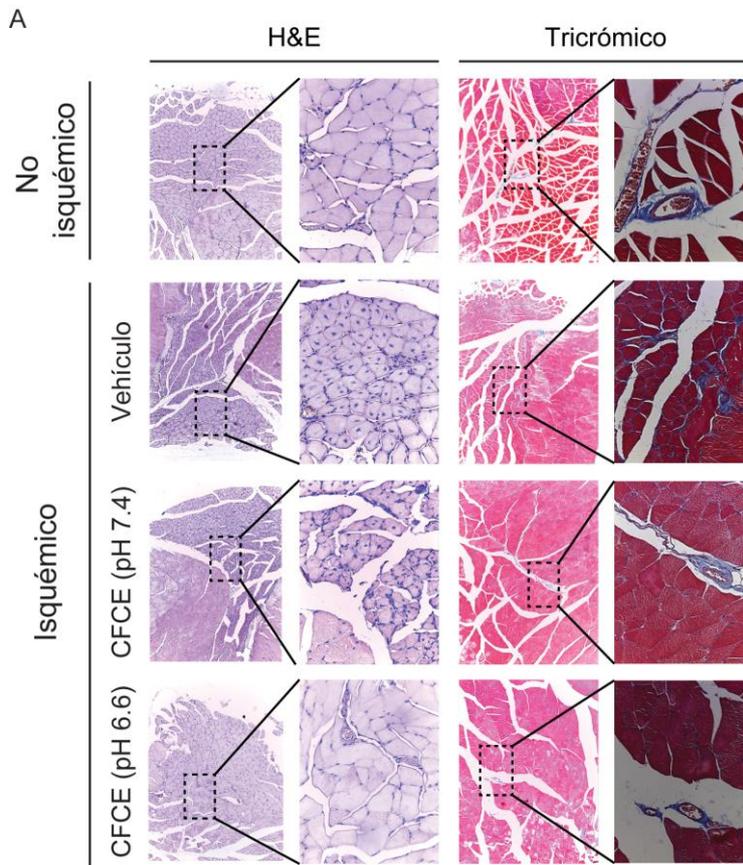
Zemani F. *et al*<sup>107</sup> demostraron que las CFCE derivadas de cordón umbilical son capaces de mejorar y acelerar la vascularización y regeneración tisular en un modelo murino de isquemia de miembro inferior. Considerando los resultados obtenidos *in vitro*, nos propusimos evaluar el efecto del preconditionamiento ácido en el potencial regenerativo de los progenitores endoteliales *in vivo* en dicho modelo. Las CFCE fueron expuestas a pH 7.4 o 6.6 durante 6 horas, luego trasplantados de manera endovenosa (intravenosa) o intramuscular en ratones inmunodeficientes y la recuperación del flujo sanguíneo fue determinada luego de 14 días. El análisis por Doppler determinó que la recuperación del flujo sanguíneo en el miembro isquémico fue muy baja en los animales no trasplantados (grupo control) (perfusión relativa:  $27.5 \pm 4.5\%$ ) y aunque la administración intravenosa de CFCE cultivadas a pH 7.4 mejoró la reperfusión ( $37.2 \pm 6.5\%$ ), los animales que recibieron CFCE preconditionadas mostraron una recuperación del flujo sanguíneo en el miembro isquémico significativamente mayor ( $55.5 \pm 4.1\%$ ,  $P < 0.05$  vs. control,  $P < 0.05$  vs. CFCE no preconditionadas) (Figura 18A). Interesantemente, la administración intramuscular de las CFCE no arrojó diferencias con respecto a la inyección intravenosa (CFCE a pH 7.4:  $45.1 \pm 4.2\%$ , CFCE a pH 6.6:  $64.7 \pm 7.2\%$   $P < 0.05$ ) (Figura 18B), sugiriendo que las CFCE preconditionadas poseen una mayor actividad proangiogénica que contribuye directamente con la formación de nuevos vasos, independientemente de su capacidad de migrar hacia el sitio isquémico.



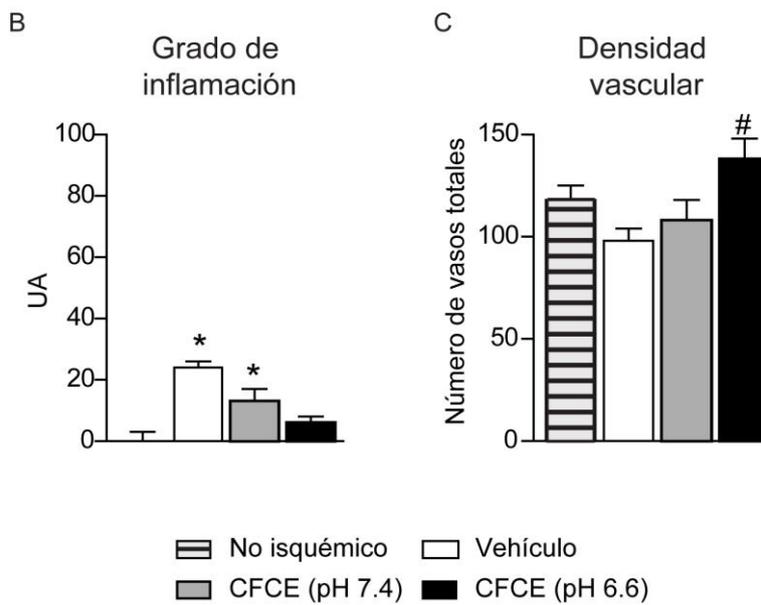
**Figura 18. El preconditionamiento ácido mejora la neovascularización en un modelo de isquemia de miembro inferior.** Las células fueron incubadas en EGM2 ajustado a pH 7.4 o 6.6 durante 6 horas y antes del trasplante, fueron tripsinizadas, lavadas y resuspendidas en solución salina. La solución fisiológica (vehículo), las CFCE preincubadas a pH 7.4, o las CFCE preincubadas a pH 6.6 fueron administradas de manera intravenosa (A) o intramuscular (B) y el análisis por Doppler fue realizado luego de 14 días. (n=6 por grupo). \*p<0.05 vs CFCE (pH 7.4).

El análisis histológico de los músculos gastrocnemios fue realizado en preparados teñidos con hematoxilina/eosina o tricrómico de Masson (Figura 19A). En dichos cortes observamos que las CFCE a pH 7.4 redujeron los signos de inflamación en el tejido (Figura 19B) aunque no afectaron la densidad vascular (Figura 19C) comparado con los animales que sólo recibieron solución fisiológica. Sin embargo, las CFCE preacondicionadas suprimieron completamente los signos de inflamación, a valores similares a los observados en el músculo no isquémico (Figura 19 A, B), y aumentaron significativamente la densidad vascular en comparación con todos los grupos de animales (Figura 19 A,C).

**Estos resultados demuestran que las CFCE preacondicionadas tienen un mayor potencial regenerativo *in vivo* ya que no sólo disminuyen la inflamación local sino que también aumentan la vascularización en el músculo isquémico.**



**Figura 19. El preacondicionamiento ácido mejora la neovascularización en un modelo de isquemia de miembro inferior.** La administración del vehículo, CFCE a pH 7.4 y CFCE a pH 6.6 fue realizada luego de 5 horas post cirugía. A) A los 14 días post isquemia, los músculos gastrocnemios fueron removidos y teñidos con hematoxilina y eosina (H&E) y con tricrómico de Masson. Magnificación 100x y 400x. B) El grado de inflamación fue calculado en los cortes teñidos con H&E. C) La densidad vascular fue medida en los cortes teñidos con tricrómico. \* $p < 0.05$  vs musculo no isquémico. # $p < 0.05$  vs. todos los grupos.

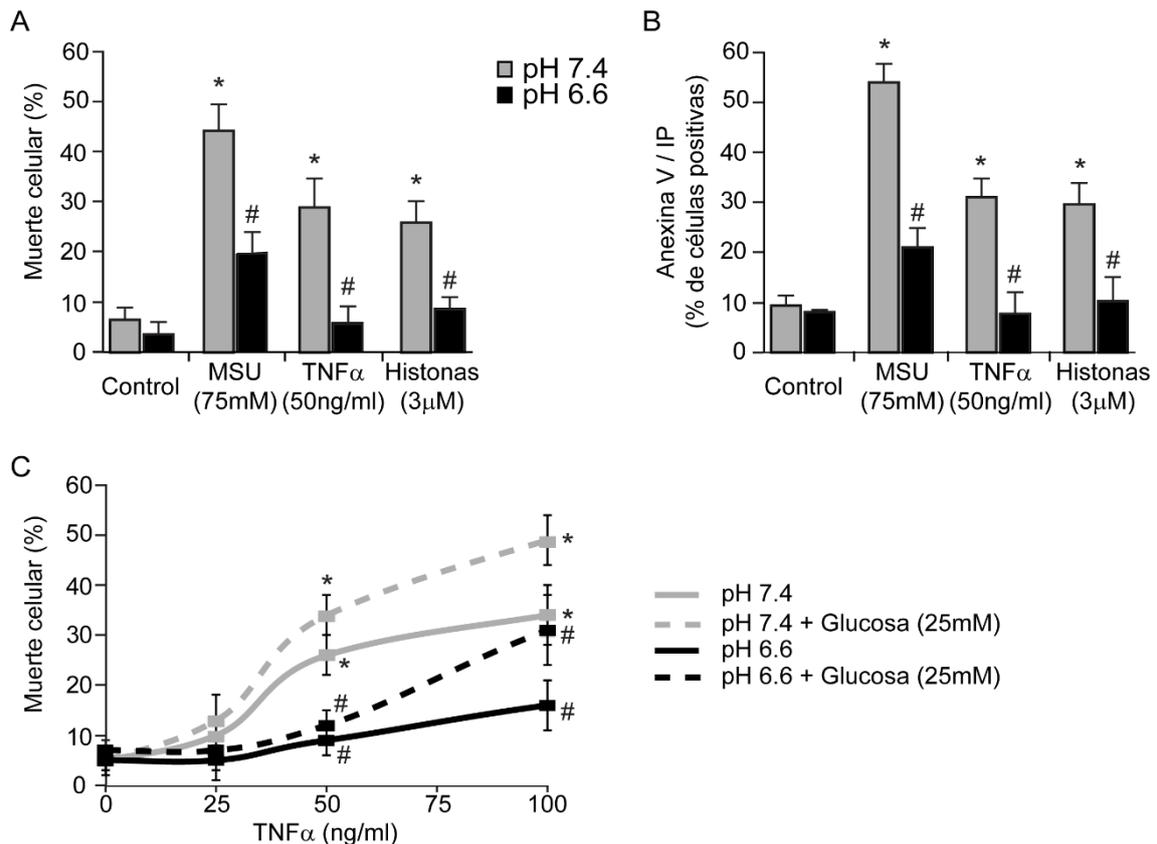


## **Las CFCE preconditionadas son más resistentes al efecto nocivo del microambiente inflamatorio**

Tanto las CFCE endógenas como las trasplantadas con fines regenerativos se enfrentan a la hostilidad del microambiente inflamatorio, el cual presenta señales de estrés y daño que pueden afectar la supervivencia y funcionalidad de estos progenitores. Dado que la isquemia es un sitio favorable para la formación intracelular de ácido úrico, el cual es liberado luego de la muerte celular y forma cristales de urato monosódico (MSU) en los fluidos extracelulares <sup>77</sup>, este compuesto es considerado uno de los más abundantes DAMPs en los tejidos isquémicos y es capaz de inducir la necrosis de los progenitores endoteliales (datos no publicados de nuestro laboratorio). Por otro lado, hemos demostrado que las histonas extracelulares, otro DAMPs que pueden llegar al espacio extracelular como consecuencia de muerte celular o durante la formación de trampas extracelulares de neutrófilos, tienen un efecto citotóxico sobre las CFCE ya que inducen principalmente la piroptosis <sup>97</sup>. Una de las principales citoquinas proinflamatorias del microambiente isquémico es el TNF $\alpha$ , el cual es un conocido agente proapoptótico de las CFCE <sup>108</sup>. Con estos antecedentes, decidimos estudiar si el preconditionamiento ácido era capaz de proteger a las CFCE de estos tres estímulos presentes en el microambiente isquémico e inflamatorio, los cuales inducen tres tipos diferentes de muerte celular. Interesantemente, la muerte mediada por los cristales de MSU, las histonas y el TNF $\alpha$  fue significativamente reducida en las CFCE expuestas a pH ácido comparada con las células a pH 7.4 (Figura 20A). Resultados similares fueron observados luego de la tinción con Anexina V e ioduro de propidio (Figura 20B).

Aunque ha sido reportado que en pacientes diabéticos que la presencia de factores de riesgo cardiovasculares es perjudicial para la neoangiogénesis y la reparación tisular, el efecto en la supervivencia de las CFCE en condiciones de alta glucosa es controversial <sup>109</sup>. Nuestros resultados muestran que aunque la alta glucosa

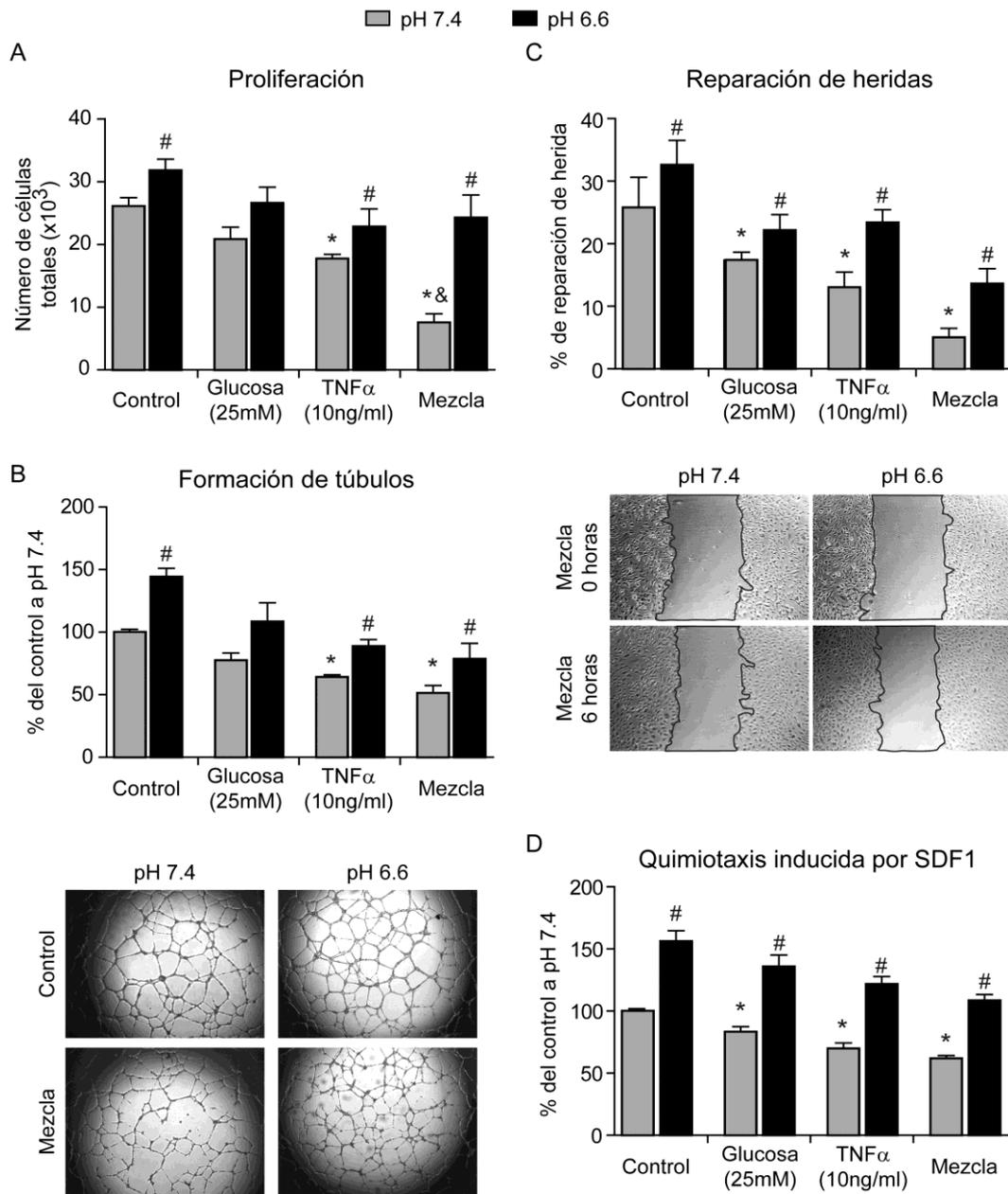
sola no induce la muerte celular de estos progenitores, ésta potencia significativamente el efecto proapoptótico del TNF $\alpha$ . Este efecto fue observado en las tanto en las CFCE a pH 7.4 como a pH 6.6, aunque en las células precondicionadas el efecto nocivo fue menor (Figura 20C).



**Figura 20. El precondicionamiento ácido protege a las CFCE de los efectos nocivos del microambiente inflamatorio.** Las células fueron incubadas en EGM2 ajustado a pH 7.4 o 6.6 durante 6 horas y luego el medio fue reemplazado por EGM2 ajustado a pH 7.4. Luego las CFCE fueron incubadas con cristales de MSU, TNF $\alpha$  e histonas extracelulares y la muerte fue determinada luego de 24 horas por análisis de la morfología nuclear por microscopía de fluorescencia (A) y por doble marcación de Anexina V e ioduro de propidio (B) y citometría de flujo (n=6). C) Las CFCE fueron incubadas con TNF $\alpha$  a las concentraciones indicadas en presencia o ausencia de glucosa y la apoptosis fue medida por análisis de la morfología nuclear por microscopía de fluorescencia luego de 24 horas (n=6). \*p<0.05 vs pH 7.4. #p<0.05 vs el mismo tratamiento a pH 7.4.

Además de este efecto citoprotector, el preconditionamiento ácido incrementó las respuestas angiogénicas de las CFCE que fueron expuestas a concentraciones no citotóxicas de TNF $\alpha$  en presencia y ausencia de alta glucosa. Tanto la proliferación como la tubulogénesis y la migración fueron significativamente inhibidas por el TNF $\alpha$  y, más aún, en condiciones de alta glucosa. Sin embargo, el efecto inhibitorio observado en cada una de estas respuestas angiogénicas fue significativamente revertido por el preconditionamiento ácido (Figura 21).

**Estos resultados demuestran que el preconditionamiento ácido no sólo ejerce un efecto citoprotector sobre las CFCE sino también mejora sus propiedades angiogénicas en condiciones proinflamatorias y de alta glucosa.**



**Figura 21. El preconditionamiento ácido incrementó las respuestas angiogénicas de las CFCE en presencia de TNF $\alpha$  y condiciones de alta glucosa.** Las CFCE fueron incubadas en EGM2 ajustado a pH 7.4 o 6.6 durante 6 horas y luego el medio fue reemplazado por EGM2 ajustado a pH 7.4. A continuación, las células fueron incubadas con TNF $\alpha$ , glucosa o la mezcla de ambos. A) El recuento celular fue determinado utilizando una cámara de Neubauer luego de 48 horas (n=4). B) Las células fueron sembradas sobre Geltrex y la formación de túbulos fue medido luego 18 horas (n=6). C) La reparación de heridas fue determinada a las 6 horas después del daño a la monocapa confluyente (n=5). D) La quimiotaxis inducida por SDF1 (20 ng/ml) fue determinada sembrando las células en transwells y el número de células migradas fue analizado luego de 6 horas (n=4). \*p<0.05 vs pH 7.4. #p<0.05 vs el mismo tratamiento a pH 7.4. &p<0.05 vs TNF $\alpha$  a pH 7.4.

# DISCUSIÓN

El presente trabajo de tesis muestra que la exposición de las CFCE a un medio ácido tiene un doble efecto sobre la función de estas células. Mientras que la incubación de CFCE en condiciones de pH bajo inicialmente induce una reducción en la proliferación, quimiotaxis, reparación de heridas y formación de pseudotúbulos, una exposición limitada de las CFCE a un medio ácido, seguida por la restauración de los valores de pH a 7.4 (procedimiento conocido como preacondicionamiento ácido), resulta en una expansión *ex vivo* más eficiente y en una mayor actividad angiogénica incluyendo la proliferación, la respuesta quimiotáctica al SDF1, la adhesión, la tubulogénesis y su potencial regenerativo *in vivo*, tal como se demostró en un modelo murino de isquemia de miembro inferior. Además, el preacondicionamiento ácido protege de la muerte y aumenta las respuestas angiogénicas de las CFCE en condiciones inflamatorias y de alta glucosa.

Nuestros hallazgos indican que varias respuestas angiogénicas disminuyeron durante las primeras horas de incubación a pH bajo, incluyendo la migración inducida por EGM2, la reparación de heridas, la formación de pseudotúbulos y la proliferación, que fue evidenciada por una reducción en la actividad de la fosfatasa ácida y un arresto del ciclo celular. Un efecto citostático similar ha sido reportado por D'Arcangelo D. et al en células endoteliales de aorta bovina. Las mismas fueron expuestas a pH 7,0 durante 20 minutos y mostraron una severa disminución de sus funciones angiogénicas<sup>110</sup>. Estos resultados también coinciden con nuestras observaciones en células endoteliales maduras de micro y macrovasculatura, en las cuales la exposición al medio ácido redujo de manera significativa e irreversible su capacidad proliferativa y de reparación de heridas. Por el contrario, el deterioro funcional de los CFCE observado inicialmente durante la incubación en medio ácido fue totalmente reversible, ya que una vez que el pH del medio se equilibró y se aproximó a valores normales, no sólo la proliferación sino también otras respuestas angiogénicas de las CFCE aumentaron significativamente.

El preconditionamiento celular es un mecanismo de protección endógena donde los tejidos pueden detectar y adaptarse al entorno cambiando su fenotipo y la función celular. Esto se logra a través de la exposición de las células a un estrés particular, tal como la hipoxia, anoxia, acidosis, cambios de temperatura, citoquinas y tratamientos farmacológicos, antes de la inyección de las mismas en el tejido dañado<sup>111</sup>. Se ha adoptado como una estrategia para mejorar el potencial terapéutico de todo tipo de células progenitoras, incluyendo las CFCE<sup>112</sup>. Ha sido demostrado que la exposición a la acidosis durante breves episodios es capaz de limitar la lesión por isquemia y reperfusión en corazón<sup>113</sup> y en pulmón<sup>114</sup> *in vivo*, y ejerce efectos antiapoptóticos en las células endoteliales<sup>115,116</sup> y neuronas<sup>117</sup> *in vitro*, sin embargo el efecto del preconditionamiento ácido en células madre y progenitores son pocos y controversiales. De acuerdo con nuestros resultados, Cencioni C. *et al* demostraron en progenitores hematopoyéticos murinos (células cKit+) que aunque la exposición larga (3-5 días) a un medio extracelular ácido indujo apoptosis de los mismos, un período más corto de acidosis (24 horas) aumentó la quimiotaxis, la migración transendotelial, la diferenciación hacia el linaje endotelial *in vitro* y la recuperación del flujo sanguíneo en un modelo murino de isquemia de extremidades posteriores<sup>118</sup>. En contraste, nosotros demostramos anteriormente que la exposición de progenitores hematopoyéticos humanos (células CD34<sup>+</sup>) a la acidosis durante un periodo tan breve como 30 segundos fue suficiente para desencadenar la apoptosis de estas células, y la restauración del pH al valor fisiológico de 7.4 no evitó el efecto citotóxico ni tuvo efectos beneficiosos sobre sus funciones<sup>93</sup>. Estos resultados son opuestos no solo a lo observado por Cencioni C. *et al* en progenitores murinos sino también con nuestros datos actuales que muestran que la acidosis no induce apoptosis de las CFCE y además mejora sus propiedades proangiogénicas. Aunque las CFCE son una subpoblación de células CD34<sup>+</sup>, el mayor grado de diferenciación hacia el linaje endotelial probablemente les confiere una mayor resistencia a los efectos citotóxicos de la acidosis.

En el presente trabajo observamos que el preacondicionamiento ácido no fue capaz de modular la migración de CFCE en respuesta a EGM2 o VEGF, así como tampoco alteró los niveles de expresión del receptor 2 de VEGF (KDR). Estos resultados son consistentes con los publicados por Goerges AL. *et al*<sup>119</sup> que muestra que la expresión en la superficie de los receptores de VEGF 1 y 2 en células endoteliales de la aorta bovina no son modificados por modificaciones del pH extracelular. Por otra parte, hemos demostrado que el preacondicionamiento ácido favorece la migración de estos progenitores en respuesta a la quimioquina SDF1, efecto que estuvo asociado a una mayor expresión de su receptor, el CXCR4, en la superficie celular. En ese sentido, ha sido reportado que la exposición de células progenitoras hematopoyéticas murinas (cKit+) derivadas de la médula ósea a un medio extracelular ácido incrementa su actividad angiogénica y su potencial terapéutico a través de un aumento en la expresión de SDF1 y CXCR4<sup>118</sup>. Aunque el papel preponderante de SDF1/CXCR4 en el preacondicionamiento hipóxico de células madre y progenitores ha sido reportado en varios trabajos<sup>111</sup>, en el presente estudio demostramos por primera vez que esta vía de señalización está implicada en el efecto proangiogénico del preacondicionamiento ácido sobre los “verdaderos” progenitores endoteliales humanos.

El reclutamiento de las CFCE a los sitios de neoangiogénesis involucra la migración y la adhesión al endotelio activado como así también la interacción con los componentes de la matriz extracelular, los cuales son etapas claves para un *engraftment* exitoso. Nuestros resultados demuestran que las CFCE preacondicionadas mejoran la adhesión a fibronectina, colágeno tipo I y HUVEC activadas con TNF $\alpha$  tanto en un modelo estático como en un modelo dinámico, con una fuerza de cizallamiento fisiológico. Más aun, mayores niveles de activación de FAK fueron encontrados en las CFCE cultivadas a pH 6.6, reforzando la idea que la adhesión focal se encuentra aumentada en la acidosis. FAK es una proteína fosforilada dependiente de integrinas que se localiza en sitios de adhesión focal que,

más allá de su clásico rol en la adhesión y en la migración, también regula varios procesos biológicos incluyendo motilidad, diferenciación, angiogénesis y sobrevida a través de la cascada FAK/Src/Paxilina<sup>120</sup>. Nuestros hallazgos sobre la adhesión de las CFCE y la activación de FAK después de la exposición a un medio ácido junto con el aumento en la proliferación, la migración y la formación de pseudotúbulos sugieren que las integrinas endoteliales podrían estar involucradas en el efecto proangiogénico del preacondicionamiento ácido.

Si bien se ha descrito ampliamente que el preacondicionamiento ácido protege eficazmente a órganos y células contra los efectos nocivos de la isquemia<sup>113-116</sup>, los mecanismos moleculares implicados en este efecto protector no se conocen con exactitud. Nuestros resultados mostraron que el preacondicionamiento ácido aumentó la fosforilación de ERK1/2 y AKT en las CFCE y que ambas vías fueron responsables de su mayor actividad proliferativa, ya que la inhibición farmacológica de estas moléculas dio lugar a una completa supresión del efecto mitogénico observado a pH bajos. Curiosamente, la activación de ambas vías de señalización a causa de la acidosis ha sido descrita previamente en células endoteliales coronarias, aunque la misma estuvo ligada al efecto antiapoptótico de la acidosis<sup>115,116</sup>. Más aun, la activación de ERK1/2 y PI3K/AKT por ligandos inductores de la proliferación celular ha sido ampliamente reportada en varios tipos celulares incluyendo diversas poblaciones de progenitores endoteliales<sup>104,121,122</sup>. Por otra parte, hemos observado que la activación de p38 por EGM2 fue completamente bloqueada a pH 6.6; sin embargo, el tratamiento previo de las CFCE con el inhibidor de p38 (SB203580) no tuvo efecto sobre la proliferación. En este sentido, aunque el papel de p38 en la proliferación de progenitores endoteliales es todavía controvertido, la mayor parte de los estudios que utilizaron el SB203580, tanto *in vitro* como *in vivo*, han descrito un efecto negativo de este compuesto no sólo en el crecimiento y la sobrevida celular sino también en la tubulogénesis<sup>123-126</sup>. Interesantemente, también demostramos que el bloqueo de p38 aumentó la tubulogénesis *in vitro* a pH 7.4, lo que sugiere que la vía de p38 es un

regulador negativo de la formación de túbulos en las CFCE y el hecho de que esta quinasa se encuentra completamente inhibida en progenitores preacondicionados explicaría, al menos en parte, la regulación positiva del preacondicionamiento ácido sobre la tubulogénesis.

La relevancia de nuestros hallazgos *in vitro* fue confirmada por los ensayos *in vivo*. Mientras que la infusión de CFCE favorece significativamente la reperusión sanguínea en un modelo experimental de isquemia de miembro inferior, el preacondicionamiento ácido de estas células beneficia aún más la revascularización tisular. En este contexto, nuestros datos mostraron que la tasa de perfusión sanguínea en el tejido isquémico luego de la administración de CFCE por vía sistémica (intravenosa) fue similar a la observada luego de la administración local (intramuscular), sugiriendo así que las CFCE preacondicionadas poseen una mayor actividad proangiogénica que contribuye directamente con la formación de nuevos vasos, independientemente de su capacidad de migrar hacia el sitio isquémico. El análisis histológico del músculo gastrocnemio indicó que el número de vasos sanguíneos (densidad vascular) fue mayor en los animales que recibieron CFCE preacondicionadas. Además de este efecto proangiogénico, estos progenitores ejercieron un efecto antiinflamatorio local, reflejado en el bajo número de núcleos centralizados e hipertróficos y escaso infiltrado de leucocitos. Dicho efecto fue aún más marcado y significativo cuando las CFCE fueron preacondicionadas. A pesar de estos datos, nuestras investigaciones *in vivo* no fueron suficientes para elucidar la participación exacta de las CFCE en la revascularización del músculo isquémico, ya que no resulta claro si contribuyen de manera estructural o a través de un efecto parácrino. Las CFCE pueden contribuir a la formación de nuevos vasos *in vivo* a través de tres mecanismos <sup>127</sup>. 1) forman nuevos vasos por sí mismas, 2) se insertan en la vasculatura del ratón, o 3) ejercen un efecto parácrino. Dado que se ha demostrado previamente en el mismo modelo de isquemia que estas células progenitoras se intercalan en los nuevos vasos murinos <sup>128</sup>, es concebible que las CFCE

preacondicionadas desarrollen un comportamiento similar y contribuyan estructuralmente a este proceso. Con respecto al efecto antiinflamatorio de las CFCE, especulamos que el mismo puede estar relacionado a una acción parácrina de estos progenitores quienes, una vez en el lugar, podrían aumentar los niveles locales de citoquinas antiinflamatorias. En este sentido, fue demostrado previamente que los progenitores endoteliales mejoran las funciones neurológicas en ratas con hemorragia cerebral, reduciendo los niveles locales de citoquinas proinflamatorias como el IFN- $\gamma$ , IL6, y TNF $\alpha$ , y aumentando citoquinas antiinflamatorias como TGF- $\beta$ 1 y IL10<sup>129</sup>. Más aún, Moubarik *et al.* sugirieron que los progenitores endoteliales podrían ser clave en la atenuación de la injuria neurológica luego de una oclusión de la arteria cerebral media, regulando positivamente citoquinas de protección neuronal como IGF-1, y regulando negativamente al proBDNF, el cual es un factor proinflamatorio<sup>130</sup>.

A pesar del potencial terapéutico de las CFCE, una de las principales limitaciones para el uso de estas células como terapia es la baja frecuencia de estos progenitores en sangre periférica y médula ósea, dificultando enormemente el trasplante de células autólogas. Más aún, el número y la funcionalidad de los mismos se encuentra severamente reducido en sangre periférica de pacientes con diversas enfermedades cardiovasculares<sup>51,109</sup>, quienes representan las poblaciones de elección para la terapia celular con fines regenerativos. Por estos motivos, se ha impulsado el desarrollo de nuevas estrategias que permitan optimizar los resultados terapéuticos, incluyendo la expansión *ex vivo* y la diferenciación de estas células. En este sentido, nuestros datos mostraron que la acidosis regula positivamente la funcionalidad de CFCE derivadas no sólo de sangre del cordón sino también de sangre periférica, señalando al preacondicionamiento ácido como un procedimiento útil para mejorar el número y la actividad angiogénica de las CFCE adultos, que pueden ser utilizadas en trasplantes autólogos.

Una limitación adicional es la baja viabilidad de las células trasplantadas en el sitio de injuria, probablemente debido a los altos niveles de señales dañinas presentes

en el microambiente inflamatorio e isquémico, conocidas como DAMP, como así también la presencia de citoquinas proinflamatorias y factores de riesgo cardiovascular. Más aún, no sólo las CFCE trasplantadas también los progenitores endógenos o *in situ* pueden ser afectados negativamente por estas condiciones de estrés. Uno de los DAMP más abundantes en tejidos isquémicos es el MSU. La isquemia promueve la conversión de la xantina deshidrogenasa a oxidasa, que produce, además de radicales libres, una gran cantidad de ácido úrico intracelular, el cual es liberado al espacio extracelular luego de la muerte celular, formando cristales de MSU (8 9). Estos cristales inducen necrosis de las CFCE, un efecto que también ha sido reportado en otros tipos celulares <sup>131</sup>. Por otro lado, previamente demostramos que las histonas extracelulares, otro DAMP liberado de células necróticas y durante la formación de trampas extracelulares de neutrófilos, inducen principalmente la piroptosis de las CFCE <sup>97</sup>, mientras que el TNF $\alpha$  es una citoquina proapoptótica conocida <sup>108</sup>. Interesantemente, encontramos que el preconditionamiento ácido protege con gran eficacia a las CFCE de los efectos nocivos de los cristales de MSU, TNF $\alpha$  e histonas extracelulares, estímulos que inducen diferentes tipos de muerte celular como la necrosis, apoptosis y piroptosis, respectivamente.

Los efectos citotóxicos de los componentes del microambiente inflamatorio isquémico se vuelven aún peores en presencia de factores de riesgo cardiovascular como hipertensión, obesidad, alta glucosa o colesterol. En diabetes, la isquemia es una complicación frecuente y la regeneración tisular en estos pacientes es deficiente con respecto a los normales debido a las características y factores de riesgo asociados a la enfermedad, por lo que estos pacientes son una población de elección para la aplicación de la terapia celular con fines regenerativos. A pesar de ello, los efectos de la alta glucosa en la supervivencia y funcionalidad de las CFCE han sido escasamente estudiados y son aún hoy controversiales. Mientras algunos estudios describen un efecto citotóxico directo de la alta glucosa <sup>125,132</sup>, otros están de acuerdo con nuestros hallazgos que muestran que la alta glucosa sola no es capaz de inducir

apoptosis, aunque efectivamente ejerce un efecto inhibitorio en la actividad angiogénica de las CFCE <sup>123</sup>. También observamos que la apoptosis inducida por el TNF $\alpha$  se encuentra potenciada en condiciones de alta glucosa, efecto que fue significativamente prevenido por el precondicionamiento ácido.

La citoquina proinflamatoria TNF $\alpha$  se encuentra aumentada en el plasma y en los tejidos de pacientes con enfermedades cardiovasculares e inflamatorias y es considerado un factor de riesgo por desarrollar en estas condiciones clínicas <sup>133</sup>. Varios trabajos que estudiaron los efectos de esta molécula en los progenitores endoteliales concuerdan en que altas concentraciones de TNF $\alpha$  (>20 ng/ml) inducen apoptosis y bajas concentraciones de esta citoquina (~10 ng/mL) reducen las respuestas angiogénicas como la proliferación y la formación de pseudotúbulos <sup>108</sup>. De acuerdo con estas observaciones, encontramos que el TNF $\alpha$  tiene un significativo efecto proapoptótico a una concentración de 50 ng/ml y, a niveles no citotóxicos (10 ng/ml), inhiben la proliferación, la migración y la tubulogénesis.

Con respecto a los mecanismos involucrados en los efectos antiangiogénicos del TNF $\alpha$  y la alta glucosa, ha sido demostrado previamente que el TNF $\alpha$  reduce la actividad angiogénica de las CFCE a través de la fosforilación y activación de la vía de señalización de p38 y, al mismo tiempo, una supresión de la vía de AKT/PI3K <sup>123,134</sup>. Similarmente, la vía de p38 es activada en condiciones de alta glucosa y resulta clave en la inhibición de la proliferación y la diferenciación de las CFCE en estas condiciones <sup>123,125</sup>. Dado que en el presente trabajo también demostramos que el precondicionamiento ácido aumenta la formación de pseudotúbulos mediante la inhibición de p38 y aumenta la proliferación por activación de AKT/PI3K, es posible pensar que estas vías de señalización son responsables, al menos en parte, de la protección que les confiere el precondicionamiento ácido a las CFCE contra el efecto antiangiogénico inducido por el TNF $\alpha$  y/o la alta glucosa.

En conclusión, nuestros resultados muestran que una exposición limitada de las CFCE a un medio extracelular ácido incrementa la actividad angiogénica de estas

células a través de la activación de ERK1/2, AKT y FAK y de la inhibición de p38. Además de explicar un posible mecanismo fisiopatológico de compensación que se produce bajo condiciones inflamatorias, nuestros hallazgos podrían ofrecer una nueva estrategia para la medicina regenerativa. En este contexto, la terapia celular es una herramienta prometedora para el tratamiento de enfermedades isquémicas, sin embargo, todavía hay mucho trabajo por hacer para superar las limitaciones asociadas a este procedimiento. Hoy en día sabemos que el número y la función de los progenitores endoteliales se encuentran reducidos en pacientes con enfermedades cardiovasculares y por el entorno hostil que rodea a los tejidos isquémicos. Múltiples estrategias (ej. diversos protocolos de preconditionamiento, modificaciones genéticas, la administración de drogas) se centran actualmente en aumentar el número de progenitores, la supervivencia y sus propiedades angiogénicas. En el presente trabajo revelamos que el preconditionamiento ácido representa una estrategia simple, de bajo costo y aplicable clínicamente para optimizar la expansión *ex vivo* de CFCE, las cuales resultan más resistentes a condiciones adversas típicamente presentes en pacientes con enfermedades cardiovasculares como la inflamación y la alta glucosa, y con un mayor potencial terapéutico. Asimismo, nuestros hallazgos señalan el posible uso de drogas farmacológicas dirigidas a bloquear la quinasa p38 como candidatos potenciales para mejorar la neovascularización.

# CONCLUSIÓN

## CONCLUSIONES

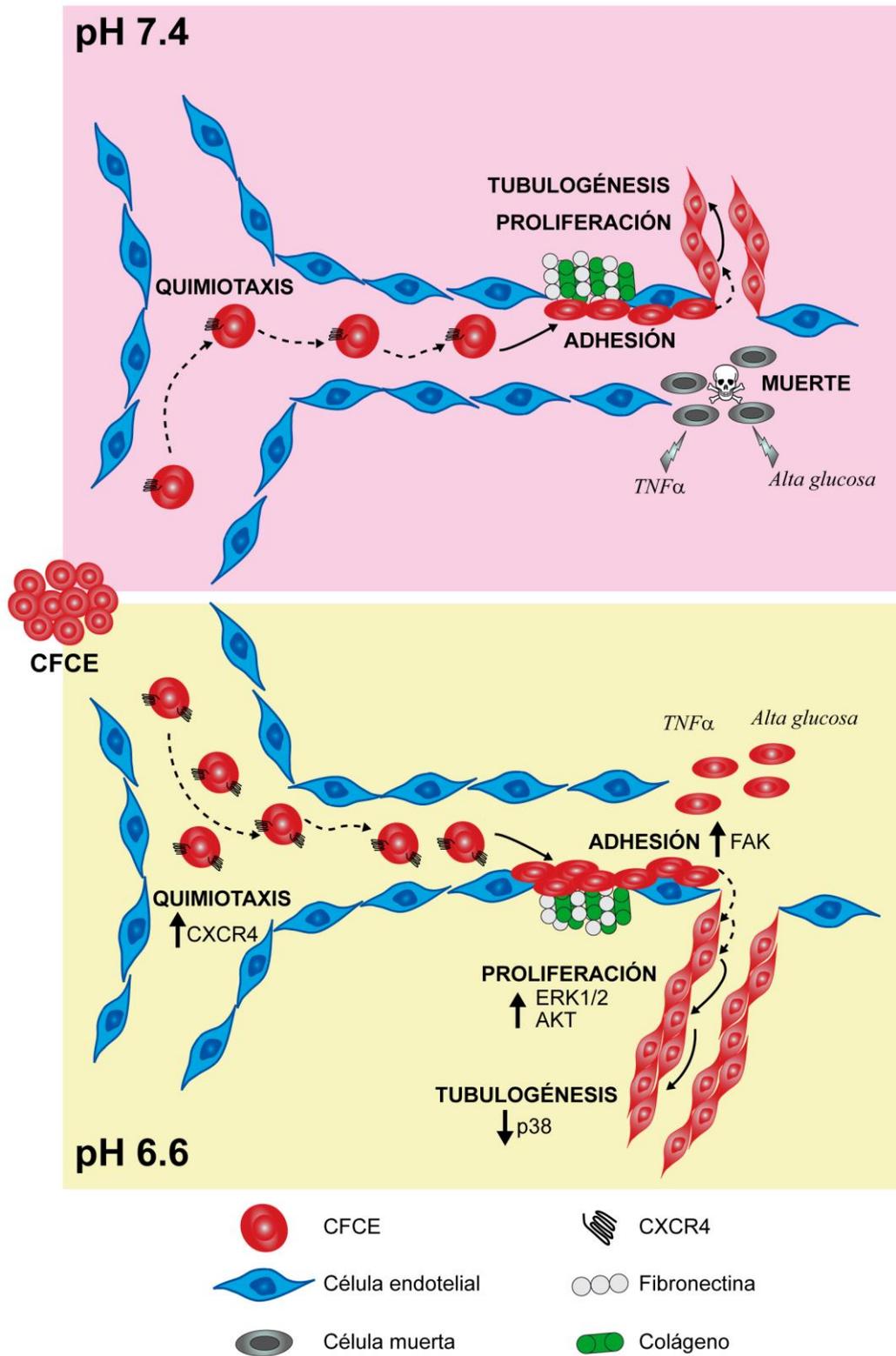
Nuestros resultados demuestran que el preconditionamiento ácido ejerce un efecto proangiogénico sobre las CFCE, ya que promueve:

- 1) la proliferación, mediante la activación de las vías de ERK1/2 y AKT,
- 2) la formación de túbulos, a través de la inhibición de la activación de p38,
- 3) la quimiotaxis inducida por SDF1, junto con el aumento de la expresión de su receptor CXCR4,
- 4) la adhesión a células endoteliales activadas y a componentes de la matriz extracelular, así como también la fosforilación de la quinasa de adhesión focal FAK, y
- 5) la regeneración tisular en un modelo murino de isquemia de miembro inferior, reduciendo la inflamación y aumentando la densidad vascular post isquemia en el músculo gastrocnemio.

También demostramos que el preconditionamiento ácido es una estrategia efectiva en condiciones de estrés e inflamación, ya que protege a los progenitores endoteliales de:

- 1) la acción citotóxica de DAMPs como el MSU y las histonas extracelulares y de la citoquina proinflamatoria  $TNF\alpha$ , principales componentes del microambiente isquémico.
- 2) el efecto antiangiogénico del  $TNF\alpha$  en condiciones normales y de alta glucosa.

De esta manera, en el presente trabajo revelamos que el preconditionamiento ácido representa una estrategia simple, de bajo costo y aplicable clínicamente para optimizar la expansión *ex vivo* de CFCE con un mayor potencial terapéutico para ser utilizados con fines regenerativos.



Representación esquemática del efecto del preconditionamiento ácido sobre la vasculogénesis.

# REFERENCIAS

1. Cines, D. B. *et al.* Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. *Blood* **91**, 3527–61 (1998).
2. Loscalzo, J. Oxidative stress in endothelial cell dysfunction and thrombosis. *Pathophysiol. Haemost. Thromb.* **32**, 359–360 (2002).
3. Djonov, V., Baum, O. & Burri, P. H. Vascular remodeling by intussusceptive angiogenesis. *Cell Tissue Res.* **314**, 107–117 (2003).
4. Azizi, G., Boghozian, R. & Mirshafiey, A. The potential role of angiogenic factors in rheumatoid arthritis. *Int. J. Rheum. Dis.* **17**, 369–383 (2014).
5. Castillo-Melendez, M., Yawno, T., Jenkin, G. & Miller, S. L. Stem cell therapy to protect and repair the developing brain: A review of mechanisms of action of cord blood and amnion epithelial derived cells. *Front. Neurosci.* **7**, 194 (2013).
6. Jujo, K., Li, M. & Losordo, D. W. Endothelial progenitor cells in neovascularization of infarcted myocardium. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **45**, 530–44 (2008).
7. Medina, R. J. *et al.* Endothelial Progenitors: A Consensus Statement on Nomenclature. *Stem Cells Transl. Med.* **6**, 1316–1320 (2017).
8. Critser, P. J. & Yoder, M. C. Endothelial colony-forming cell role in neoangiogenesis and tissue repair. *Curr. Opin. Organ Transplant.* **15**, 68–72 (2010).
9. Hristov, M., Erl, W. & Weber, P. C. Endothelial progenitor cells: Mobilization, differentiation, and homing. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **23**, 1185–1189 (2003).
10. Asahara, T. *et al.* Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* **275**, 964–7 (1997).
11. Yoon, C.-H. *et al.* Synergistic neovascularization by mixed transplantation of early endothelial progenitor cells and late outgrowth endothelial cells: the role of angiogenic cytokines and matrix metalloproteinases. *Circulation* **112**, 1618–27 (2005).
12. Medina, R. J. *et al.* Molecular analysis of endothelial progenitor cell (EPC) subtypes reveals two distinct cell populations with different identities. *BMC Med. Genomics* **3**, 18 (2010).
13. Banno, K. & Yoder, M. C. Tissue regeneration using endothelial colony-forming cells: promising cells for vascular repair. *Pediatr. Res.* (2017).

doi:10.1038/pr.2017.231

14. Estes, M. L., Mund, J. A., Ingram, D. A. & Case, J. Identification of endothelial cells and progenitor cell subsets in human peripheral blood. *Curr. Protoc. Cytom.* **Chapter 9**, Unit 9.33.1-11 (2010).
15. Stitt, A. W. *et al.* Vascular stem cells and ischaemic retinopathies. *Prog. Retin. Eye Res.* **30**, 149–66 (2011).
16. O'Neill, C. L. *et al.* Endothelial cell-derived pentraxin 3 limits the vasoreparative therapeutic potential of circulating angiogenic cells. *Cardiovasc. Res.* **112**, 677–688 (2016).
17. Purhonen, S. *et al.* Bone marrow-derived circulating endothelial precursors do not contribute to vascular endothelium and are not needed for tumor growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 6620–5 (2008).
18. Medina, R. J. *et al.* Myeloid angiogenic cells act as alternative M2 macrophages and modulate angiogenesis through interleukin-8. *Mol. Med.* **17**, 1045–55 (2011).
19. Urbich, C. *et al.* Relevance of monocytic features for neovascularization capacity of circulating endothelial progenitor cells. *Circulation* **108**, 2511–6 (2003).
20. Prater, D. N., Case, J., Ingram, D. A. & Yoder, M. C. Working hypothesis to redefine endothelial progenitor cells. *Leukemia* **21**, 1141–1149 (2007).
21. Fadini, G. P., Losordo, D. & Dimmeler, S. Critical reevaluation of endothelial progenitor cell phenotypes for therapeutic and diagnostic use. *Circ. Res.* **110**, 624–637 (2012).
22. Ingram, D. A. *et al.* Identification of a novel hierarchy of endothelial progenitor cells using human peripheral and umbilical cord blood. *Blood* **104**, 2752–2760 (2004).
23. Medina, R. J. *et al.* Ex vivo expansion of human outgrowth endothelial cells leads to IL-8-mediated replicative senescence and impaired vasoreparative function. *Stem Cells* **31**, 1657–68 (2013).
24. Poitevin, S. *et al.* Sphingosine kinase 1 expressed by endothelial colony-forming cells has a critical role in their revascularization activity. *Cardiovasc. Res.* **103**, 121–30 (2014).
25. Tasev, D., Koolwijk, P. & van Hinsbergh, V. W. M. Therapeutic Potential of Human-Derived Endothelial Colony-Forming Cells in Animal Models. *Tissue*

- Eng. Part B Rev.* **22**, 371–382 (2016).
26. Lin, R.-Z. *et al.* Human endothelial colony-forming cells serve as trophic mediators for mesenchymal stem cell engraftment via paracrine signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**, 10137–42 (2014).
  27. Torsney, E. & Xu, Q. Resident vascular progenitor cells. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **50**, 304–311 (2011).
  28. Ingram, D. A. *et al.* Vessel wall-derived endothelial cells rapidly proliferate because they contain a complete hierarchy of endothelial progenitor cells. *Blood* **105**, 2783–2786 (2005).
  29. Patel, J. *et al.* Prospective surface marker-based isolation and expansion of fetal endothelial colony-forming cells from human term placenta. *Stem Cells Transl. Med.* **2**, 839–47 (2013).
  30. Lin, R.-Z. *et al.* Human white adipose tissue vasculature contains endothelial colony-forming cells with robust in vivo vasculogenic potential. *Angiogenesis* **16**, 735–44 (2013).
  31. Zengin, E. *et al.* Vascular wall resident progenitor cells: a source for postnatal vasculogenesis. *Development* **133**, 1543–51 (2006).
  32. Rittié, L. Cellular mechanisms of skin repair in humans and other mammals. *J. Cell Commun. Signal.* **10**, 103–20 (2016).
  33. Xue, M. & Jackson, C. J. Extracellular Matrix Reorganization During Wound Healing and Its Impact on Abnormal Scarring. *Adv. wound care* **4**, 119–136 (2015).
  34. Wu, B., Mottola, G., Schaller, M., Upchurch, G. R. & Conte, M. S. Resolution of vascular injury: Specialized lipid mediators and their evolving therapeutic implications. *Mol. Aspects Med.* **58**, 72–82 (2017).
  35. Forbes, S. J. & Rosenthal, N. Preparing the ground for tissue regeneration: from mechanism to therapy. *Nat. Med.* **20**, 857–69 (2014).
  36. Powers, J. G., Higham, C., Broussard, K. & Phillips, T. J. Wound healing and treating wounds: Chronic wound care and management. *J. Am. Acad. Dermatol.* **74**, 607-25–6 (2016).
  37. Briquez, P. S., Hubbell, J. A. & Martino, M. M. Extracellular Matrix-Inspired Growth Factor Delivery Systems for Skin Wound Healing. *Adv. Wound Care* **4**, 479–489 (2015).

38. Ackermann, P. W. & Hart, D. A. Influence of Comorbidities: Neuropathy, Vasculopathy, and Diabetes on Healing Response Quality. *Adv. wound care* **2**, 410–421 (2013).
39. Deanfield, J. E., Halcox, J. P. & Rabelink, T. J. Endothelial function and dysfunction: testing and clinical relevance. *Circulation* **115**, 1285–95 (2007).
40. Park, A. *et al.* Use of Statins to Augment Progenitor Cell Function in Preclinical and Clinical Studies of Regenerative Therapy: a Systematic Review. *Stem Cell Rev.* **12**, 327–39 (2016).
41. Urbich, C. & Dimmeler, S. Endothelial Progenitor Cells: Characterization and Role in Vascular Biology. *Circ. Res.* **95**, 343–353 (2004).
42. Leor, J. *et al.* Human umbilical cord blood-derived CD133+ cells enhance function and repair of the infarcted myocardium. *Stem Cells* **24**, 772–80 (2006).
43. Chong, M. S. K., Ng, W. K. & Chan, J. K. Y. Concise Review: Endothelia; progenitor cells in regenerative medicine: Applications and challenges. *Stem Cells Transl. Med.* **5**, 530–538 (2016).
44. Schwarz, T. M. *et al.* Vascular incorporation of endothelial colony-forming cells is essential for functional recovery of murine ischemic tissue following cell therapy. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **32**, e13-21 (2012).
45. Kang, K.-T., Coggins, M., Xiao, C., Rosenzweig, A. & Bischoff, J. Human vasculogenic cells form functional blood vessels and mitigate adverse remodeling after ischemia reperfusion injury in rats. *Angiogenesis* **16**, 773–84 (2013).
46. Huang, X.-T. *et al.* Intracerebroventricular transplantation of ex vivo expanded endothelial colony-forming cells restores blood-brain barrier integrity and promotes angiogenesis of mice with traumatic brain injury. *J. Neurotrauma* **30**, 2080–8 (2013).
47. Zhang, Y. *et al.* Transplantation of expanded endothelial colony-forming cells improved outcomes of traumatic brain injury in a mouse model. *J. Surg. Res.* **185**, 441–9 (2013).
48. Medina, R. J., O'Neill, C. L., Humphreys, M. W., Gardiner, T. A. & Stitt, A. W. Outgrowth endothelial cells: characterization and their potential for reversing ischemic retinopathy. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **51**, 5906–13 (2010).
49. Burger, D. *et al.* Human endothelial colony-forming cells protect against acute

- kidney injury: role of exosomes. *Am. J. Pathol.* **185**, 2309–23 (2015).
50. Shantsila, E., Watson, T. & Lip, G. Y. H. Endothelial Progenitor Cells in Cardiovascular Disorders. *J. Am. Coll. Cardiol.* **49**, 741–752 (2007).
  51. Kawamoto, A. & Asahara, T. Role of progenitor endothelial cells in cardiovascular disease and upcoming therapies. *Catheter. Cardiovasc. Interv.* **70**, 477–484 (2007).
  52. Kang, K.-T., Lin, R.-Z., Kuppermann, D., Melero-Martin, J. M. & Bischoff, J. Endothelial colony forming cells and mesenchymal progenitor cells form blood vessels and increase blood flow in ischemic muscle. *Sci. Rep.* **7**, 770 (2017).
  53. Liu, Y. *et al.* Vasculogenic and osteogenesis-enhancing potential of human umbilical cord blood endothelial colony-forming cells. *Stem Cells* **30**, 1911–24 (2012).
  54. Lin, R.-Z., Moreno-Luna, R., Zhou, B., Pu, W. T. & Melero-Martin, J. M. Equal modulation of endothelial cell function by four distinct tissue-specific mesenchymal stem cells. *Angiogenesis* **15**, 443–55 (2012).
  55. Souidi, N. *et al.* Stromal Cells Act as Guardians for Endothelial Progenitors by Reducing Their Immunogenicity After Co-Transplantation. *Stem Cells* **35**, 1233–1245 (2017).
  56. Shafiee, A. *et al.* Priming of endothelial colony-forming cells in a mesenchymal niche improves engraftment and vasculogenic potential by initiating mesenchymal transition orchestrated by NOTCH signaling. *FASEB J.* **31**, 610–624 (2017).
  57. Buno, K. P. *et al.* In Vitro Multitissue Interface Model Supports Rapid Vasculogenesis and Mechanistic Study of Vascularization across Tissue Compartments. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **8**, 21848–60 (2016).
  58. Melero-Martin, J. M. *et al.* Host myeloid cells are necessary for creating bioengineered human vascular networks in vivo. *Tissue Eng. Part A* **16**, 2457–66 (2010).
  59. Garrigue, P. *et al.* Erythropoietin Pretreatment of Transplanted Endothelial Colony-Forming Cells Enhances Recovery in a Cerebral Ischemia Model by Increasing Their Homing Ability: A SPECT/CT Study. *J. Nucl. Med.* **57**, 1798–1804 (2016).
  60. Bennis, Y. *et al.* Priming of late endothelial progenitor cells with erythropoietin

- before transplantation requires the CD131 receptor subunit and enhances their angiogenic potential. *J. Thromb. Haemost.* **10**, 1914–28 (2012).
61. Lee, J. H., Lee, S. H., Choi, S. H., Asahara, T. & Kwon, S.-M. The sulfated polysaccharide fucoidan rescues senescence of endothelial colony-forming cells for ischemic repair. *Stem Cells* **33**, 1939–51 (2015).
  62. Sarlon, G. *et al.* Therapeutic effect of fucoidan-stimulated endothelial colony-forming cells in peripheral ischemia. *J. Thromb. Haemost.* **10**, 38–48 (2012).
  63. Stalin, J. *et al.* Soluble CD146 boosts therapeutic effect of endothelial progenitors through proteolytic processing of short CD146 isoform. *Cardiovasc. Res.* **111**, 240–51 (2016).
  64. Green, L. A. *et al.* Endogenous Transmembrane TNF-Alpha Protects Against Premature Senescence in Endothelial Colony Forming Cells. *Circ. Res.* **118**, 1512–1524 (2016).
  65. Kim, H. *et al.* Human platelet lysate improves human cord blood derived ECFC survival and vasculogenesis in three dimensional (3D) collagen matrices. *Microvasc. Res.* **101**, 72–81 (2015).
  66. Lin, R. Z. *et al.* Induction of erythropoiesis using human vascular networks genetically engineered for controlled erythropoietin release. *Blood* **118**, 5420–5428 (2011).
  67. Bieback, K. *et al.* Recruitment of human cord blood-derived endothelial colony-forming cells to sites of tumor angiogenesis. *Cytotherapy* **15**, 726–39 (2013).
  68. Laurenzana, A. *et al.* Melanoma cell therapy: Endothelial progenitor cells as shuttle of the MMP12 uPAR-degrading enzyme. *Oncotarget* **5**, 3711–27 (2014).
  69. Margheri, G. *et al.* Tumor-tropic endothelial colony forming cells (ECFCs) loaded with near-infrared sensitive Au nanoparticles: A “cellular stove” approach to the photablation of melanoma. *Oncotarget* **7**, 39846–39860 (2016).
  70. Medzhitov, R. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature* **454**, 428–35 (2008).
  71. Land, W. G., Gutmann, T. & Daar, A. S. Emerging science, emerging ethical issues: who should fund innate alloimmunity-suppressing drugs? *Acta Chir. Belg.* **108**, 73–82
  72. Gallo, P. M. & Gallucci, S. The dendritic cell response to classic, emerging, and homeostatic danger signals. Implications for autoimmunity. *Front. Immunol.* **4**,

- 138 (2013).
73. Wenceslau, C. F. *et al.* Mitochondrial damage-associated molecular patterns and vascular function. *Eur. Heart J.* **35**, 1172–7 (2014).
  74. Uchida, K. Natural antibodies as a sensor of electronegative damage-associated molecular patterns (DAMPs). *Free Radic. Biol. Med.* **72**, 156–61 (2014).
  75. Hotchkiss, R. S., Strasser, A., McDunn, J. E. & Swanson, P. E. Cell death. *N. Engl. J. Med.* **361**, 1570–83 (2009).
  76. De Scheerder, I. K. *et al.* Myocardial malondialdehyde and uric acid release after short-lasting coronary occlusions during coronary angioplasty: potential mechanisms for free radical generation. *Am. J. Cardiol.* **68**, 392–5 (1991).
  77. Kanemitsu, H. *et al.* Xanthine and uric acid levels in rat brain following focal ischemia. *J. Neurochem.* **51**, 1882–5 (1988).
  78. Brinkmann, V. *et al.* Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* **303**, 1532–5 (2004).
  79. Hedayat, M., Mahmoudi, M. J., Rose, N. R. & Rezaei, N. Proinflammatory cytokines in heart failure: double-edged swords. *Heart Fail. Rev.* **15**, 543–62 (2010).
  80. Tidball, J. G. Inflammatory processes in muscle injury and repair. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **288**, R345-53 (2005).
  81. Gonzalez, A. C. de O., Costa, T. F., Andrade, Z. de A. & Medrado, A. R. A. P. Wound healing - A literature review. *An. Bras. Dermatol.* **91**, 614–620 (2016).
  82. Mendonça, R. J. de & Coutinho-Netto, J. Cellular aspects of wound healing. *An. Bras. Dermatol.* **84**, 257–62 (2009).
  83. Johnson, R. A. A Quick Reference on Respiratory Acidosis. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.* **47**, 185–189 (2017).
  84. von Hanwehr, R., Smith, M. L. & Siesjö, B. K. Extra- and intracellular pH during near-complete forebrain ischemia in the rat. *J. Neurochem.* **46**, 331–9 (1986).
  85. Smith, M. L., von Hanwehr, R. & Siesjö, B. K. Changes in extra- and intracellular pH in the brain during and following ischemia in hyperglycemic and in moderately hypoglycemic rats. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **6**, 574–83 (1986).
  86. Cronberg, T., Rytter, A., Asztély, F., Söder, A. & Wieloch, T. Glucose but not lactate in combination with acidosis aggravates ischemic neuronal death in vitro.

- Stroke* **35**, 753–7 (2004).
87. Zheng, H. *et al.* SDF-1 $\alpha$ /CXCR4 decreases endothelial progenitor cells apoptosis under serum deprivation by PI3K/Akt/eNOS pathway. *Atherosclerosis* **201**, 36–42 (2008).
  88. Farrow, B. & Evers, B. M. Inflammation and the development of pancreatic cancer. *Surg. Oncol.* **10**, 153–69 (2002).
  89. Wang, Q., Tang, X. N. & Yenari, M. A. The inflammatory response in stroke. *J. Neuroimmunol.* **184**, 53–68 (2007).
  90. Trevani, A. S. *et al.* Extracellular acidification induces human neutrophil activation. *J. Immunol.* **162**, 4849–57 (1999).
  91. Serrano, C. V *et al.* pH dependence of neutrophil-endothelial cell adhesion and adhesion molecule expression. *Am. J. Physiol.* **271**, C962-70 (1996).
  92. Martínez, D. *et al.* Extracellular acidosis triggers the maturation of human dendritic cells and the production of IL-12. *J. Immunol.* **179**, 1950–9 (2007).
  93. D'Atri, L. P. *et al.* The low viability of human CD34+ cells under acidic conditions is improved by exposure to thrombopoietin, stem cell factor, interleukin-3, or increased cyclic adenosine monophosphate levels. *Transfusion* **51**, 1784–1795 (2011).
  94. Benslimane-Ahmim, Z. *et al.* Osteoprotegerin, a new actor in vasculogenesis, stimulates endothelial colony-forming cells properties. *J. Thromb. Haemost.* **9**, 834–43 (2011).
  95. Vasa, M. *et al.* Number and migratory activity of circulating endothelial progenitor cells inversely correlate with risk factors for coronary artery disease. *Circ. Res.* **89**, E1-7 (2001).
  96. Jaffe, E. A., Nachman, R. L., Becker, C. G. & Minick, C. R. Culture of Human Endothelial Cells Derived from Umbilical Veins. Identification by morphologic and immunologic criteria. *J. Clin. Invest.* **52**, 2745–2756 (1973).
  97. Mena, H. A. *et al.* Extracellular histones reduce survival and angiogenic responses of late outgrowth progenitor and mature endothelial cells. *J. Thromb. Haemost.* **14**, 397–410 (2016).
  98. Negrotto, S. *et al.* Activation of cyclic AMP pathway prevents CD34+ cell apoptosis. *Exp. Hematol.* **34**, 1420–1428 (2006).
  99. Mena, H. A. *et al.* Acidic preconditioning improves the proangiogenic responses

- of endothelial colony forming cells. *Angiogenesis* **17**, 867–879 (2014).
100. Foubert, P. *et al.* PSGL-1-mediated activation of EphB4 increases the proangiogenic potential of endothelial progenitor cells. *J. Clin. Invest.* **117**, 1527–37 (2007).
  101. Li, S. *et al.* The role of the dynamics of focal adhesion kinase in the mechanotaxis of endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 3546–51 (2002).
  102. Yoder, M. C. *et al.* Redefining endothelial progenitor cells via clonal analysis and hematopoietic stem/progenitor cell principals. *Blood* **109**, 1801–1809 (2007).
  103. Au, P. *et al.* Differential in vivo potential of endothelial progenitor cells from human umbilical cord blood and adult peripheral blood to form functional long-lasting vessels. *Blood* **111**, 1302–1305 (2007).
  104. Cross, M. J. & Claesson-Welsh, L. FGF and VEGF function in angiogenesis: signalling pathways, biological responses and therapeutic inhibition. *Trends Pharmacol. Sci.* **22**, 201–7 (2001).
  105. Morello, F., Perino, A. & Hirsch, E. Phosphoinositide 3-kinase signalling in the vascular system. *Cardiovasc. Res.* **82**, 261–271 (2009).
  106. Gerwins, P., Sköldenberg, E. & Claesson-Welsh, L. Function of fibroblast growth factors and vascular endothelial growth factors and their receptors in angiogenesis. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **34**, 185–94 (2000).
  107. Zemani, F. *et al.* Low-molecular-weight fucoidan enhances the proangiogenic phenotype of endothelial progenitor cells. *Biochem. Pharmacol.* **70**, 1167–75 (2005).
  108. Du, G. *et al.* Simvastatin attenuates TNF- $\alpha$ -induced apoptosis in endothelial progenitor cells via the upregulation of SIRT1. *Int. J. Mol. Med.* **34**, 177–82 (2014).
  109. Kang, H., Ma, X., Liu, J., Fan, Y. & Deng, X. High glucose-induced endothelial progenitor cell dysfunction. *Diabetes Vasc. Dis. Res.* **14**, 381–394 (2017).
  110. D’Arcangelo, D. *et al.* Acidosis inhibits endothelial cell apoptosis and function and induces basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor expression. *Circ. Res.* **86**, 312–8 (2000).
  111. Cencioni, C., Capogrossi, M. C. & Napolitano, M. The SDF-1/CXCR4 axis in stem cell preconditioning. *Cardiovasc. Res.* **94**, 400–7 (2012).

112. Zemani, F. *et al.* Ex vivo priming of endothelial progenitor cells with SDF-1 before transplantation could increase their proangiogenic potential. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **28**, 644–50 (2008).
113. Fujita, M. *et al.* Prolonged transient acidosis during early reperfusion contributes to the cardioprotective effects of postconditioning. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **292**, H2004-8 (2007).
114. Costello, J. *et al.* Hypercapnic acidosis attenuates shock and lung injury in early and prolonged systemic sepsis. *Crit. Care Med.* **37**, 2412–2420 (2009).
115. Flacke, J.-P., Kumar, S., Kostin, S., Reusch, H. P. & Ladilov, Y. Acidic preconditioning protects endothelial cells against apoptosis through p38- and Akt-dependent Bcl-xL overexpression. *Apoptosis* **14**, 90–96 (2009).
116. Kumar, S., Reusch, H. P. & Ladilov, Y. Acidic pre-conditioning suppresses apoptosis and increases expression of Bcl-xL in coronary endothelial cells under simulated ischaemia. *J. Cell. Mol. Med.* **12**, 1584–1592 (2008).
117. Frøyland, E. *et al.* Inflammatory receptors and pathways in human NT2-N neurons during hypoxia and reoxygenation. Impact of acidosis. *Brain Res.* **1217**, 37–49 (2008).
118. Cencioni, C. *et al.* Ex vivo acidic preconditioning enhances bone marrow ckit+ cell therapeutic potential via increased CXCR4 expression. *Eur. Heart J.* **34**, 2007–16 (2013).
119. Goerges, A. L. & Nugent, M. A. Regulation of Vascular Endothelial Growth Factor Binding and Activity by Extracellular pH. *J. Biol. Chem.* **278**, 19518–19525 (2003).
120. Wu, G.-S. *et al.* Ganoderiol A-enriched extract suppresses migration and adhesion of MDA-MB-231 cells by inhibiting FAK-SRC-paxillin cascade pathway. *PLoS One* **8**, e76620 (2013).
121. Kucia, M. *et al.* CXCR4-SDF-1 signalling, locomotion, chemotaxis and adhesion. *J. Mol. Histol.* **35**, 233–45 (2004).
122. Everaert, B. R. *et al.* Current perspective of pathophysiological and interventional effects on endothelial progenitor cell biology: Focus on Pi3K/AKT/eNOS pathway. *Int. J. Cardiol.* **144**, 350–366 (2010).
123. Seeger, F. H. *et al.* p38 mitogen-activated protein kinase downregulates endothelial progenitor cells. *Circulation* **111**, 1184–91 (2005).

124. Wu, Y., Wang, Q., Cheng, L., Wang, J. & Lu, G. Effect of Oxidized Low-density Lipoprotein on Survival and Function of Endothelial Progenitor Cell Mediated by p38 Signal Pathway. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **53**, 151–156 (2009).
125. Kuki, S. *et al.* Hyperglycemia accelerated endothelial progenitor cell senescence via the activation of p38 mitogen-activated protein kinase. *Circ. J.* **70**, 1076–81 (2006).
126. Huh, J.-E. *et al.* Formononetin accelerates wound repair by the regulation of early growth response factor-1 transcription factor through the phosphorylation of the ERK and p38 MAPK pathways. *Int. Immunopharmacol.* **11**, 46–54 (2011).
127. Sieveking, D. P., Buckle, A., Celermajer, D. S. & Ng, M. K. C. Strikingly Different Angiogenic Properties of Endothelial Progenitor Cell Subpopulations. *J. Am. Coll. Cardiol.* **51**, 660–668 (2008).
128. Bouvard, C. *et al.* 6-Integrin Subunit Plays a Major Role in the Proangiogenic Properties of Endothelial Progenitor Cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **30**, 1569–1575 (2010).
129. Zhang, R. *et al.* The Therapeutic Value of Bone Marrow-Derived Endothelial Progenitor Cell Transplantation after Intracerebral Hemorrhage in Rats. *Front. Neurol.* **8**, 174 (2017).
130. Moubarik, C. *et al.* Transplanted late outgrowth endothelial progenitor cells as cell therapy product for stroke. *Stem Cell Rev.* **7**, 208–20 (2011).
131. Desai, J., Steiger, S. & Anders, H.-J. Molecular Pathophysiology of Gout. *Trends Mol. Med.* **23**, 756–768 (2017).
132. Chen, Y.-H. *et al.* High glucose impairs early and late endothelial progenitor cells by modifying nitric oxide-related but not oxidative stress-mediated mechanisms. *Diabetes* **56**, 1559–68 (2007).
133. Popa, C., Netea, M. G., van Riel, P. L. C. M., van der Meer, J. W. M. & Stalenhoef, A. F. H. The role of TNF- $\alpha$  in chronic inflammatory conditions, intermediary metabolism, and cardiovascular risk. *J. Lipid Res.* **48**, 751–762 (2007).
134. Chen, T.-G., Zhong, Z.-Y., Sun, G.-F., Zhou, Y.-X. & Zhao, Y. Effects of tumour necrosis factor-alpha on activity and nitric oxide synthase of endothelial progenitor cells from peripheral blood. *Cell Prolif.* **44**, 352–9 (2011).

Bioq. Hebe Agustina Mena – Doctorando

Dra. Soledad Negrotto – Directora

Dra. Graciela Calabrese – Consejera de estudios