

# Trabajo Fin de Grado



---

## DESARROLLO DE ENSAYOS FARMACOLÓGICOS EN MODELOS CELULARES RELEVANTES PARA EL SISTEMA CARDIOVASCULAR

---

DEVELOPMENT OF PHARMACOLOGICAL ASSAYS IN  
CELLULAR MODELS RELEVANT TO THE  
CARDIOVASCULAR SYSTEM

Grado en Medicina, Universidad de Zaragoza

Curso Académico 2020-2021



**Área de Farmacología**

Departamento de Farmacología,  
Fisiología, Medicina Legal y Forense

**AUTOR: SERGIO MORENO CARRIÓN**

TUTORA: SONIA SANTANDER BALLESTÍN

COTUTOR: ÁNGEL LUIS GARCÍA OTÍN



# ÍNDICE

Abreviaturas .....	1
Resumen y palabras clave .....	3
Resumen .....	3
Abstract.....	4
Introducción.....	5
Células progenitoras endoteliales (EPC).....	5
Células formadoras de colonias endoteliales (ECFC).....	8
Aplicación diagnóstica y terapéutica de las ECFC.....	8
Crecimiento y angiogénesis in vitro de las ECFC .....	10
Hipoxia sobre ECFC.....	10
Hipótesis y objetivos .....	11
Material.....	13
Cultivos celulares.....	13
Materiales empleados .....	13
Métodos .....	15
Preparación del medio de cultivo.....	15
Descongelación de células.....	16
Pase o resiembra y conteo de células .....	17
Recuento celular.....	19
Ensayo de citotoxicidad y viabilidad celular.....	20
Cálculo y representación del IC50 .....	23
Ensayo de proliferación y crecimiento celular.....	23
Ensayo de angiogénesis.....	24
Resultados.....	26
Ensayo de citotoxicidad y viabilidad celular.....	26
Ensayo de proliferación y crecimiento celular.....	29
Ensayo de angiogénesis.....	32
Discusión.....	36
Ensayo de citotoxicidad y viabilidad celular.....	36
Ensayo de proliferación y crecimiento celular.....	36
Ensayo de angiogénesis.....	37
Conclusiones .....	39
Bibliografía.....	40
Agradecimientos.....	42
Anexos.....	43

Anexo 1.....	43
--------------	----

## ABREVIATURAS

### *Abreviaturas y acrónimos*

<i>CAC</i>	Circulating angiogenic cells (células angiogénicas circulantes)
<i>CFA</i>	Clonogenic forming assay (ensayo de formación clonogénica)
<i>CFU</i>	Colony-forming unit (unidad formadora de colonias)
<i>CV</i>	Cardiovascular
<i>EC</i>	Endothelial cells (células endoteliales)
<i>ECFC</i>	Endothelial colony-forming cells (células formadoras de colonias endoteliales)
<i>EPC</i>	Endothelial progenitor cells (células progenitoras endoteliales)
<i>HFGF</i>	Human fibroblastic growth factor (factor de crecimiento fibroblástico humano)
<i>HIF-1<math>\alpha</math></i>	Hypoxia-inducible factor 1-alpha (subunidad alfa del factor 1 inducible por hipoxia)
<i>IGF-1</i>	Insulin-like growth factor-1 (factor de crecimiento insulínico tipo 1)
<i>KDR</i>	VEGF receptor 2 (receptor 2 de VEGF)
<i>MNC</i>	Mononuclear circulating cells (células mononucleares circulantes)
<i>PDGF</i>	Platelet derived growth factor (factor de crecimiento derivado de plaquetas)
<i>VEGF</i>	Vascular endothelial growth factor (Factor de crecimiento vascular endotelial)



## RESUMEN

**Introducción y objetivos.** Las Células Formadoras de Colonias Endoteliales (ECFC), que son consideradas como las verdaderas Células Progenitoras Endoteliales (EPC), constituyen una de las líneas de investigación para el desarrollo de nuevas terapias contra patologías de interés cardiovascular que afectan principalmente al endotelio de los vasos sanguíneos y a la formación de neovasos en procesos neoplásicos. Se ha establecido un protocolo de cultivo y expansión *in vitro* adecuado, utilizando distintos compuestos sobre ECFC para realizar ensayos celulares.

**Métodos.** Se han empleado dos líneas celulares de ECFC, una de sangre de cordón umbilical (ucb-ECFC-C2.1.1), y otra de células adultas de sangre periférica (apb-ECFC-BH20), para desarrollar ensayos de citotoxicidad, proliferación y angiogénesis bajo el efecto de los compuestos: Probenecid y Rojo de Rutenio (agonista e inhibidor de TRPV2), GSK-1016790A y HC-067047 (agonista e inhibidor de TRPV4), AB3A y AB7A (inhibidores de la fosfodiesterasa PDE1).

**Resultados y conclusiones.** La línea de ECFC C2.1.1 mostró una capacidad proliferativa mayor que la línea BH20 durante el proceso de cultivo y expansión. Ambas líneas celulares de ECFC resultaron ser más sensibles al efecto citotóxico de los compuestos en estado proliferativo que en estado quiescente o de confluencia. Los fármacos agonistas de TRPV4 y TRPV2, GSK-1016790A y Probenecid respectivamente, no cumplieron el efecto esperado de potenciar la capacidad proliferativa de las ECFC. Sin embargo los fármacos inhibidores de TRPV4 y TRPV2, HC-067047 y Rojo de Rutenio respectivamente, sí cumplieron el efecto de frenar la capacidad proliferativa de las ECFC, siendo el compuesto HC y no el Rojo de Rutenio el que lo hizo de una manera más notable. Por otra parte, los inhibidores de fosfodiesterasas AB3A y AB7A disminuyeron la capacidad proliferativa y de angiogénesis de las ECFC, sugiriendo a las fosfodiesterasas como posible diana terapéutica para frenar los procesos de angiogénesis de ciertas patologías como la formación de neovasos en procesos tumorales.

**Palabras clave:** Células Formadoras de Colonias Endoteliales (ECFC); ensayo de proliferación; angiogénesis; TRPV4 y TRPV2; inhibidores de fosfodiesterasas.

**Introduction and objectives.** Endothelial Colony Forming Cells (ECFC), which are considered as the true Endothelial Progenitor Cells (EPC), constitute one of the research lines for the development of new therapies against pathologies with cardiovascular interest that mainly affect blood vessels endothelium, and the formation of neovessels in neoplastic processes. We established a suitable *in vitro* culture and expansion protocol and used different compounds on ECFC to perform cell assays.

**Methods.** We cultured two ECFC cell lines, one obtained from umbilical cord blood (ucb-ECFC-C2.1.1), another from adult peripheral blood cells (apb-ECFC-BH20), in order to develop cytotoxicity, proliferation and angiogenesis assays under the effect of the compounds: Probenecid and Ruthenium Red (TRPV2 agonist and inhibitor), GSK-1016790A and HC-067047 (TRPV4 agonist and inhibitor), AB3A and AB7A (PDE1 phosphodiesterase inhibitors).

**Results and conclusions.** ECFC's C2.1.1 line had a higher proliferative capacity than the BH20 line during the cultivation and expansion process. Both ECFC cell lines were found to be more sensitive to the compounds cytotoxic effect in the proliferative state than in the quiescent or confluent state. TRPV4 and TRPV2 agonist drugs, GSK-1016790A and Probenecid respectively, did not meet the expected effect of enhancing the proliferative capacity of ECFCs. However, the inhibitors of TRPV4 and TRPV2, HC-067047 and Ruthenium Red respectively, did have the effect of stopping the proliferative capacity of ECFCs, although it was HC and not Ruthenium Red that did it in a more remarkable way. On the other hand, phosphodiesterase inhibitors AB3A and AB7A reduced the proliferative and angiogenic capacity of ECFCs, which suggests that phosphodiesterases might be a therapeutic target to slow down the angiogenic processes of certain pathologies such as the formation of neovessels in tumoral processes.

**Keywords:** Endothelial Colony Forming Cells (ECFC); proliferation assay; angiogenesis; TRPV4 and TRPV2; phosphodiesterase inhibitors.



## INTRODUCCIÓN

El uso de técnicas de cultivo celular, con diferentes estirpes celulares, es una aplicación muy utilizada en el ámbito del laboratorio. Los diferentes ensayos de cultivo con fármacos pretenden analizar su comportamiento “in vitro” y aplicarlo a la búsqueda de posibles relaciones de éstos con el desarrollo de aplicaciones clínicas. Por ello, el conocimiento de las técnicas de cultivo celular permite al médico una mayor comprensión sobre los procesos en los que están involucrados los diferentes fármacos que debe prescribir.

Como bien es sabido, la morbimortalidad que conllevan las enfermedades cardiovasculares (ECV) supone una gran carga sanitaria en todo el mundo, además estas son enormemente prevalentes (ya sea de forma primaria o secundaria a otras patologías) especialmente en los países desarrollados, y se asocian con mucha frecuencia a determinados factores de riesgo externos (ambientales y estilo de vida) e internos (factores genéticos)(1).

La monocapa continua de células aplanadas y extendidas que conforman el endotelio en todos los vasos sanguíneos del organismo desempeña un papel crucial en la biología y fisiología del sistema cardiovascular, tanto es así que la lesión endotelial se relaciona con la aparición de aterosclerosis, trombosis e hipertensión arterial, así como con muchas otras patologías que afectan a los vasos sanguíneos, como las de carácter autoinmune. Por ello el equilibrio entre la lesión endotelial y la recuperación de este tejido es de suma importancia para reducir los eventos cardiovasculares(1). Sin embargo, las células endoteliales (EC) maduras poseen una capacidad regenerativa limitada(2).

## CÉLULAS PROGENITORAS ENDOTELIALES (EPC)

Desde que en 1997 Asahara et al.(3) expusieron la presencia de EPC en la circulación periférica se han publicado multitud de estudios en relación a su origen, su identificación mediante marcadores de superficie, y la obtención de estas células a través de diferentes técnicas de cultivo en laboratorio. Estas EPC, a diferencia de las EC maduras, conservan una alta capacidad proliferativa basal. Además, las implicaciones que este tipo células tiene en la angiogénesis y la formación de nuevos territorios de vascularización, han llevado a la comunidad científica a investigar sobre su aplicación en técnicas diagnósticas, como predictor de riesgo y pronóstico clínico en diferentes enfermedades que afectan al sistema cardiovascular, y en nuevas oportunidades de tratamiento, asociadas a la recuperación del endotelio dañado y el mantenimiento de su integridad tras situaciones de estrés vascular como en territorios hipóxicos o isquémicos(3).

Existe una gran división de opiniones y estudios que difieren en cuanto al origen y definición exactos de las EPC, ya que se han realizado métodos diferentes de selección, aislamiento y desarrollo in vitro de este tipo celular, obteniendo una gran variedad de

células pertenecientes a la misma línea de células mononucleares circulantes (MNC) pero que se diferencian en algunos de sus marcadores de superficie, su estadio de diferenciación y, por consiguiente, en sus funciones y capacidades en lo que a angiogénesis y reparación del endotelio vascular se refiere(2).

Uno de los problemas que surgen a la hora de estudiarlas es que el porcentaje de EPC que circulan en un momento determinado en la sangre periférica es muy reducido, por lo que ni siquiera en todas las muestras de sangre es posible aislar colonias de EPC(4).

Para identificar las EPC se ha recurrido clásicamente a la citometría de flujo ya que el aislamiento directo de poblaciones celulares mediante el uso de antígenos de superficie tiene la ventaja de seleccionar poblaciones definidas de células sin necesidad de manipulación ex vivo. En la mayoría de los estudios, los marcadores utilizados para describir las EPC fueron desde un principio CD34+/ KDR+ CD133+(5). Sin embargo a pesar de numerosos estudios al respecto no se ha logrado un conjunto de marcadores específicos de este tipo celular que lo diferencie completamente de otras células hematopoyéticas o MNC(6).

En cuanto al procedimiento de aislamiento de las EPC, se distinguen diferentes métodos de sembrado in vitro de MNC obtenidos de sangre periférica en placas recubiertas de fibronectina o colágeno con medio de cultivo para células endoteliales, mediante los cuales se consiguen diversas subpoblaciones celulares como se muestra en la Figura 1(4).

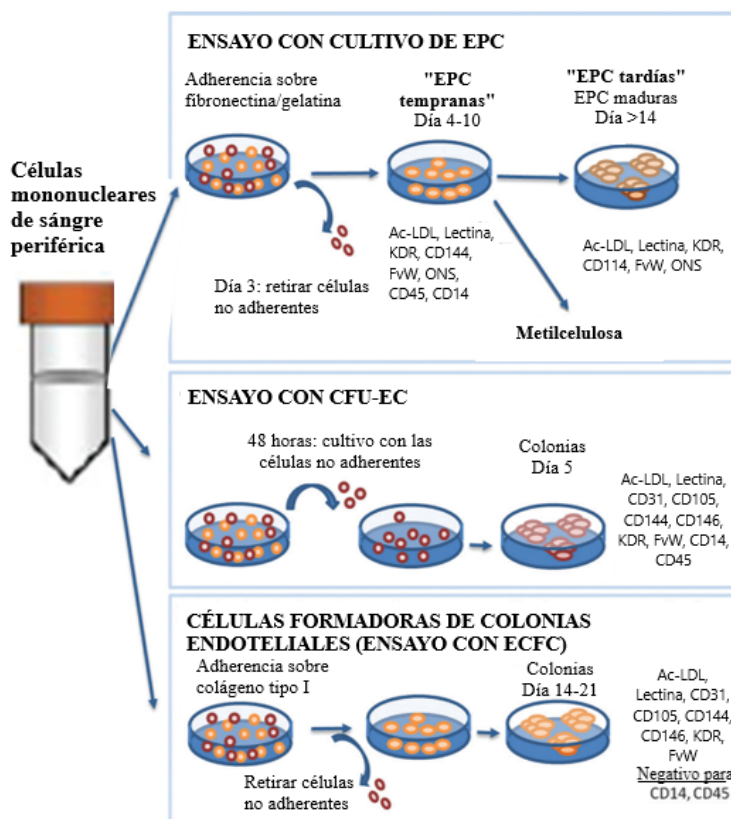


Figura 1. Métodos más comunes utilizados para aislar EPC (Modificado de Fadini et al., 2012).

- Al cultivar MNC de sangre periférica sobre una placa con fibronectina se pueden obtener distintas poblaciones celulares. Entre ellas se encuentran las denominadas EPC tempranas que aparecen 4-10 días después de la aplicación de fibronectina (habiendo retirado previamente en el día 3 la fracción no adherente del cultivo). Sin embargo también existen otras células con características hematopoyéticas/ monocíticas CD45+/CD11+ con un potencial de proliferación más limitado. Estas son las células angiogénicas circulantes (CAC), las cuales no forman colonias propiamente dichas, pero permanecen adheridas a la placa de cultivo, siendo estas las predominantes en número(7).

Por otra parte, el cultivo a largo plazo (>14 días) de EPC tempranas da lugar a células con un fenotipo de células endoteliales más maduras también llamadas EPC tardías, que difieren de las primeras en que presentan una mayor expresión de VE-cadherina, KDR, Factor de von Willebrand y óxido nítrico (NO), y una menor expresión de CD45 y liberación de citoquinas que las EPC tempranas(8).

- Dado que la capacidad proliferativa es concebida como un criterio para definir a una célula progenitora, se establecen ensayos de colonias, siendo el primero de ellos desarrollado por Hill et al.(9), quienes presembraron MNC de sangre periférica durante 48 horas en fibronectina (con la intención de eliminar monocitos y macrófagos) para luego cultivar la fracción no adherente de nuevo en fibronectina durante 5 días. Los grupos de células que aparecen tras 4-9 días son Unidades Formadoras de Colonias que se denominan CFU-EC (que en algunos trabajos son llamadas indistintamente EPC tempranas). Una vez formadas las colonias, no crecen, sino que progresivamente se irán disgregando hasta desaparecer. Estas células liberan distintas citoquinas proangiogénicas y presentan CD45, CD14, VEGFR2 y CD31 como marcadores en su superficie(4).
- Las Células Formadoras de Colonias Endoteliales (ECFC) aparecen tras 14-21 días después de cultivar en una placa recubierta de colágeno I las MNC de sangre periférica, y haber descartado las células no adherentes diariamente. Estas células forman colonias homogéneas de células con una morfología típica de célula endotelial y con potencial proliferativo y capacidad para formar redes vasculares en implantes de matrigel in vivo, que no expresan proteínas de superficie hematopoyéticas como CD45 sino que parecen derivar de hemangioblastos, sin embargo todavía existe el debate sobre si estas ECFC circulantes son células derivadas de la pared vascular o de la médula ósea. Su principal función como células proangiogénicas es la de diferenciarse en células endoteliales maduras formando parte de nuevos vasos sanguíneos(10) y se diferencian de estas últimas en la alta capacidad proliferativa y la falta de expresión de CD36(11). Son, en número, el grupo celular más reducido al realizar su aislamiento en cultivo de los que hasta ahora han sido mencionados.

Más recientemente, se ha utilizado un método novedoso para la evaluación de EPC basado en ensayos de formación clonogénica (CFA) in vitro(12). Para ello se cultivaron CD34+ derivados de sangre de cordón umbilical en un medio que contenía metilcelulosa durante 8 días. Después de ese tiempo, las EPC se identificaron como EPC-CFU pequeñas o grandes. Se sugirió que esta técnica permitiría evaluar el destino y el potencial vasculogénico de las EPC circulantes basándose en la evaluación numérica de su clonogenicidad adhesiva jerárquica(13). Sin embargo también se demostró que tales colonias están formadas por poblaciones de células heterogéneas, que expresan marcadores de linaje endotelial y monocítico(14),

Investigaciones recientes confirman la existencia de EPC de vasos altamente proliferantes, que expresan CD117(15).

#### CÉLULAS FORMADORAS DE COLONIAS ENDOTELIALES (ECFC)

Como ya se ha mencionado, las ECFC, aunque se encontrarían en pequeña cantidad en sangre circulante, se encargan de funciones tan importantes como la reparación de zonas dañadas del endotelio, así como de la extensión y formación de nuevos territorios de vascularización, hablando incluso de la realización de vasculogénesis, proceso que hasta el estudio de Asahara et al. 2011(16) se creía exclusivo de embriones, que consiste en la generación de nuevos vasos sanguíneos por las células derivadas de hemangioblastos aún no diferenciadas que se acumulan en una zona concreta de tejido conformando un estructura tubular que conecta con el resto del sistema circulatorio. Por todo ello las ECFC, EPC tardías o “células emergentes de población endotelial” (Endothelial Outgrowth Cells) se consideran las “verdaderas” EPC(16).

En las líneas previas ya se destaca la dificultad de lograr consenso para seleccionar el método más adecuado para aislar e identificar estas células, del mismo modo que para establecer el valor real de su proliferación y capacidad angiogénica.

---

#### APLICACIÓN DIAGNÓSTICA Y TERAPÉUTICA DE LAS ECFC

Cuando una zona del endotelio sufre una agresión o daño, se liberan multitud de citoquinas proangiogénicas e inflamatorias que inducen el reclutamiento y migración a la sangre circulante de células procedentes de la médula ósea, entre las que se encuentran las ECFC (si bien existen así mismo otros reservorios minoritarios en zonas arteriales y pulmonares)(17). Debido a esto, se ha planteado una posible aplicación de las ECFC como marcador de pronosis en isquemia.

En multitud de estudios se correlacionan niveles bajos de ECFC con un mayor riesgo de episodios cardiovasculares y enfermedades que afectan directamente o de manera secundaria al sistema cardiovascular, sin embargo inmediatamente después de eventos cardiovasculares isquémicos agudos, como el infarto de miocardio, la concentración de ECFC en sangre experimenta un pico, aunque sin llegar al nivel de los controles sanos(4).

El problema vuelve a ser el procedimiento de detección y la falta de consenso que existe en cuanto a los marcadores o sustancias detectadas por citometría que permitirían diferenciar con exactitud a las verdaderas EPC del resto.

Las ECFC también serían útiles como marcadores pronósticos de tromboembolismo venoso, ya que en pacientes afectos de esta patología las ECFC muestran un incremento de sus niveles, lo cual se traduce en una mayor facilidad para aislarlas *in vitro* a partir de una muestra de sangre periférica, pues las colonias también aparecen antes en el cultivo(18).

Por otra parte estas células parecen tener un papel principal en la evolución de tumores agresivos, pues su rápido consumo de nutrientes tiende a crear un ambiente hipóxico en su interior favoreciendo la emisión de VEGF o PDGF-2 que promueven el reclutamiento de EPC que estarían involucradas en la formación de neovasos en dichos tumores facilitando por una parte el crecimiento y desarrollo del tumor en cuestión gracias al aporte vascular y de más nutrientes, y por otra la diseminación de células malignas a la circulación general y, por lo tanto, a otros tejidos. Esto abre la oportunidad de investigar sobre formas para impedir dicho reclutamiento de las EPC, que reducirían la agresividad de estos tumores(19).

El trasplante de EPC en modelos animales ha demostrado que los enfoques terapéuticos que utilizan EPC expandidas en cultivo podrían promover con éxito la neovascularización y la regeneración de los tejidos isquémicos, incluso cuando se administran como terapia única, es decir, en ausencia de otros tratamientos con factores de crecimiento proangiogénicos de apoyo. Estos hallazgos han sido informados en estudios experimentales con ratones con isquemia en extremidades traseras(20), y en modelos de isquemia miocárdica de rata en los que se evidenció que las EPC expandidas *ex vivo* se incorporan a focos de neovascularización miocárdica y tienen un impacto favorable en la preservación de la función ventricular izquierda(10).

De igual manera estas células podrían tener grandes aplicaciones en el tratamiento de complicaciones derivadas de trasplantes en los que se requiere un intensa revascularización(18).

A pesar de todo esto las pruebas de formación de capilares *in vivo* han mostrado que de las ECFC inyectadas en los modelos sólo un porcentaje relativamente bajo acaba formando parte de los nuevos capilares, si bien todos los trabajos y estudios parecen estar de acuerdo en la mejoría de todas las variables de evolución favorable de la patología.

Las ECFC, por tanto, son consideradas como una prometedora línea de investigación para el desarrollo de nuevas terapias contra las patologías que afectan al endotelio vascular gracias a su mecanismo de acción por el cual son capaces de formar por sí mismas nuevos vasos sanguíneos o reparar los ya existentes. No obstante, dado el reducido número de ECFC obtenidas a partir de una muestra de sangre periférica es imprescindible someter al cultivo de estas colonias a una fase de amplificación previa a su aplicación como medida terapéutica, lo cual hace especialmente importante el correcto desarrollo de las mejores técnicas de aislamiento y crecimiento in vitro de estas células. Además, hay que tener en cuenta que la concentración, tipo y lote de la matriz de colágeno introducida junto a las ECFC afecta sensiblemente al número y tamaño de los vasos generados(21).

---

#### CRECIMIENTO Y ANGIOGÉNESIS IN VITRO DE LAS ECFC

Además de comprobar la proliferación de las ECFC a la hora de realizar el cultivo por el método pertinente, es importante determinar si el cultivo mantiene sus propiedades angiogénicas para que cuando estas ECFC lleguen a las células del tejido diana sean capaces de ejercer su utilidad terapéutica. Para ello se tienen en cuenta distintos aspectos(18) :

- Capacidad clonogénica: sembrar ECFC de forma individual para a continuación ver si se forma una colonia y el tamaño de la colonia.
- Formación de estructuras tubulares: sembrando las células sobre una superficie cubierta por matriz de la membrana basal del tumor Engelbreth-Holm-Swarm, de mayor similitud a la matriz extracelular presente in vivo, se comprueba que en el caso de las EPC estas estructuras tubulares conformarían redes capilares(22).
- Medidas de viabilidad: determinando niveles de apoptosis en el cultivo, senescencia y porcentaje de células que desarrollen el ciclo celular.

#### HIPOXIA SOBRE ECFC

Como ya se ha hecho referencia al comienzo del anterior apartado, se ha visto que tras eventos isquémicos agudos las ECFC experimentan un pico en sangre periférica, y esto nos puede llevar a entender el sentido de que en condiciones de hipoxia se estimule la capacidad de migración y angiogénesis que poseen estas células, como indican diversos estudios(23), no obstante la proliferación no parece afectada en un sentido u otro en la hipoxia, si bien es cierto que hay indicios de aumentos proliferativos al inducir sobreexpresión de HIF-1 $\alpha$ (24).

Dado que la aplicación de técnicas de cultivo celular, con diferentes estirpes celulares, es un método muy utilizado adaptado al uso de ensayos con distintos fármacos para analizar su comportamiento “in vitro”, planteamos aplicarlo en el ámbito Cardiovascular usando fármacos agonistas y antagonistas de diferentes receptores de canal que pudieran estar implicados y analizar sus efectos a nivel celular, fundamentalmente a nivel de la proliferación y angiogénesis.

El Receptor de Potencial Transitorio, subfamilia V, miembro 4 (TRPV4), es una proteína perteneciente a la familia de los canales iónicos, concretamente unos canales catiónicos no selectivos permeables a  $\text{Ca}^{2+}$  que pueden activarse por cambios en la presión osmótica, el esfuerzo cortante del flujo y la temperatura(25). Un número creciente de estudios reveló que la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  mediada por TRPV4 contribuye a la proliferación de células endoteliales y la remodelación vascular (arteriogénesis) que se produce como consecuencia de la oclusión arterial de varios distritos vasculares. Así mismo se ha demostrado que este tipo de canales se encuentran presentes en las EPC circulantes humanas(26).

Otro tipo de canales de la misma familia, los TRPV2, se encuentran en otros tipos celulares, por ejemplo en los cardiomiocitos, así como en las células endoteliales de la vena umbilical y las venas pulmonares. Pueden actuar como canales mecano-sensibles, estando involucrados en la regulación del tono vascular(27).

Los TRPV4 tienen un agonista específico GSK-1016790A (GSK), y un inhibidor HC-067047 (HC) que actúa como un antagonista selectivo de dicho receptor. Ambos compuestos tienen implicaciones en la regulación de la presión arterial(28).

Por otra parte el Probenecid es un potente agonista de los TRPV2 en los cardiomiocitos. En cambio el oxiclورو de rutenio, también conocido como Rojo de Rutenio (*Ruthenium Red*) bloquea de forma muy específica al TRPV2 si bien es cierto que también actúa como inhibidor del resto de canales TRPV(27).

Existen unos compuestos novedosos de reciente aparición (AB3A y AB7A) inhibidores de fosfodiesterasas (PDE1) que se han utilizado como antiproliferativos en líneas celulares de melanoma(29). Sin embargo, no hay estudios que muestren su efecto en líneas celulares de ECFC, como las que utilizaremos en este trabajo: línea de ECFC sacadas de cordón umbilical (ucb-ECFC-C2.1.1), y línea de ECFC adultas de sangre periférica (apb-ECFC-BH20).

Sabemos que los procesos de proliferación y angiogénesis se sirven de las mencionadas dianas farmacológicas de estos compuestos para poder llevarse a cabo pues todos los procesos celulares necesitan del  $\text{Ca}^{2+}$  para realizarse con éxito, así como de moléculas que actúan como segundos mensajeros como el AMP cíclico o GMP cíclico cuyas concentraciones dentro de las células están reguladas por las enzimas fosfodiesterasas.

La hipótesis del presente trabajo consiste en que la manipulación farmacológica de los niveles intracelulares de calcio o mensajeros intracelulares mediante el uso de agentes agonistas o antagonistas de canales iónicos de calcio o inhibidores de fosfodiesterasas afectaría a la capacidad proliferativa, la viabilidad y funcionalidad de células progenitoras endoteliales, lo cual puede resultar de interés en su aplicación farmacológica.

Teniendo en cuenta lo anteriormente expuesto, se plantea ver el efecto en las diferentes líneas celulares de ECFC que se van a emplear, y, de esa forma, comprobar de qué manera les afectan estos fármacos en términos de citotoxicidad, capacidad proliferativa y angiogénesis, y si estos podrían ser por tanto un herramienta terapéutica de interés cardiovascular.

### **Objetivo general:**

Estudiar el efecto de agonistas/antagonistas de TRPV2 y TRPV4, y de inhibidores de fosfodiesterasas sobre el comportamiento de células ECFC.

### **Objetivos específicos:**

- Aprender el manejo de los diferentes útiles empleados en cultivo celular y preparación de medios de cultivo.
- Desarrollar rutinas de trabajo en modelos celulares en condiciones de esterilidad.
- Realizar el seguimiento morfológico detallado de las diferentes estirpes celulares.
- Aplicar técnicas de mantenimiento de los cultivos celulares y la consecuente manipulación de varios lotes de cultivos celulares.
- Desarrollar ensayos de determinación de IC50 en rangos de concentración de los compuestos estudiados.
- Analizar el efecto de los compuestos estudiados sobre la capacidad proliferativa de las líneas celulares empleadas.
- Determinar el efecto de los compuestos estudiados sobre la actividad angiogénica.



## MATERIAL

### CULTIVOS CELULARES

El cultivo celular puede ser realizado a partir de células disgregadas de tejido, denominándose cultivo primario, sin embargo también pueden adquirirse líneas celulares de forma comercial, en tubos criogénicos con células congeladas, a partir de las cuales se inicia y establece la proliferación celular. Utilizaremos dos líneas celulares diferentes de ECFC humanas, obtenidas previamente por el grupo de investigación en el que se ha desarrollado este trabajo a partir de donantes sanos anónimos, con las que trabajaremos en paralelo: una línea de ECFC sacadas de cordón umbilical (ucb-ECFC-C2.1.1), y otra línea de ECFC en un estadio de diferenciación más maduro a las que llamaremos “Adultas” (apb-ECFC-BH20).

### MATERIALES EMPLEADOS

Todo el material utilizado durante el procedimiento debe encontrarse en condiciones estériles empleando con frecuencia etanol 70% para limpiar superficies y material.

- Pipetas serológicas y pipeteador automático.
- Micropipetas de rangos adecuados (1000  $\mu$ L, 200  $\mu$ L, 100  $\mu$ L, 50  $\mu$ L, 20  $\mu$ L, 10  $\mu$ L, 3  $\mu$ L).
- Mecanismo de aspiración de volúmenes desechables.
- Tubos cónicos para centrifuga tipo Falcon (15 mL, 50 mL)
- Campana de cultivos con flujo laminar.
- Incubadoras: temperatura de 37°C, mezcla de aire y CO<sub>2</sub> en una proporción del 5%, dispositivo de mantenimiento de una humedad ambiente elevada (95-98%) y un sistema de recirculación del aire.
- Centrifugadora.
- Recipiente para Baño María.
- Microscopio invertido.
- Lupa binocular.
- Frascos de cultivo de 25 (T-25), 75 (T-75) o 150 cm<sup>2</sup> (T-150). Los volúmenes expuestos en los siguientes apartados están pensados para T-75 como ejemplo, dado que es la superficie de siembra más frecuentemente empleada para expansión celular durante este trabajo, sin embargo será necesario ajustar los volúmenes según la superficie del recipiente utilizado.
- Placas multipocillo (P6, P12, P24, P48, P96).
- Hemocitómetro o Cámara de Neubauer y cubre-placas.
- Espectrofotómetro.

- Fármacos y reactivos empleados: EGM-2MV (medio de cultivo) DMSO, Probenecid, Rojo de Rutenio, GSK, HC, AB3A y AB7A.

## MÉTODOS

Mediante el cultivo de cada una de las líneas celulares y su distribución para experimentación desarrollaremos tres experimentos distintos con los compuestos mencionados (utilizando distintas concentraciones de cada uno):

1. Citotoxicidad y viabilidad celular
2. Proliferación celular (crecimiento a lo largo de 24, 48 y 72 horas)
3. Angiogénesis

Posteriormente los resultados serán analizados con diferentes herramientas: la página web <https://www.aatbio.com/tools/ic50-calculator>, diseñada para calcular el IC50 de cada fármaco según los resultados observados en los experimentos de citotoxicidad(30) (Anexo 1); Software de hoja de cálculo Excel para representar la variación de la proliferación celular a lo largo del tiempo, tomando para ello valores obtenidos a través de mediciones con un espectrofotómetro; y software de tratamiento estadístico Jamovi, con el módulo de análisis “Mixed models”, para realizar el análisis estadístico de los resultados obtenidos de proliferación. Así mismo se tomarán fotografías con microscopio invertido y lupa binocular para valorar el resultado de los ensayos de angiogénesis.

## PREPARACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO

Para la elaboración del medio de cultivo utilizaremos una serie de reactivos que en primer lugar deberán ser atemperados en baño maría a 37°C antes de pasarlos a la campana de flujo laminar. Para la adición de cada compuesto al medio, utilizaremos puntas de micropipetas nuevas, siempre en ambiente estéril. El orden de adición y la concentración de cada reactivo se describen a continuación:

1. Añadir al medio basal EGM-2MV® (*Microvascular Endothelial Cell Growth Medium-2*), Suero Fetal Bovino (FBS) de manera que la concentración de suero sea del 5%.
2. Añadir factores de crecimiento (VEGF, HEGF, Ácido Ascórbico, IGF-1, HFGF), solución de antibiótico/antimicótico GA 1000 (sulfato de gentamicina/anfotericina).
3. Añadir hidrocortisona para elaborar el medio que utilizaremos con las células adultas (las células de cordón no necesitan hidrocortisona ya que al encontrarse en un estadio de maduración más precoz, tienen una capacidad de proliferación mayor).

4. Tomar 12 ml de medio (por frasco de T-75) con pipeta serológica e introducirlo en el frasco, que etiquetaremos con nombre del medio, fase del cultivo y fecha de realización. Llevar a incubadora para mantener la temperatura del medio a 37°C, mientras se realiza la descongelación de células.

## DESCONGELACIÓN DE CÉLULAS

La criopreservación celular a -80°C o -196°C en caso de utilizar nitrógeno líquido, disminuye las funciones vitales de las células y las mantiene en condiciones de vida suspendida durante periodos prolongados. Estas células al ponerlas en condiciones adecuadas de temperatura, medios, nutrientes, CO<sub>2</sub> y humedad son cultivadas y proliferan para llevar a cabo diversos estudios. Pueden proliferar y de esta forma obtener una cantidad de células suficientes para congelarlas y almacenarlas.

Una vez preparado el medio de cultivo que emplearemos, procedemos a descongelar las células:

1. Sacar ampolla de nitrógeno líquido o congelador de -80°C y trasladarla en un recipiente con hielo seco hasta sumergirla en baño maría a 37°C, agitando suavemente el recipiente hasta descongelar.
2. Limpiar la ampolla con etanol 70% e introducirla en la campana de flujo laminar, abrir en condiciones de esterilidad.
3. Se procede a coger muestra para realizar conteo de células (ver más adelante).
4. Con una micropipeta se recoge el contenido y se introduce en frasco con medio de cultivo previamente elaborado (siembra).
5. Colocar cultivo en la incubadora a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> y humedad ambiente elevada (95-98%).

Realizamos observaciones cada 24h utilizando el microscopio invertido. Además se recomienda cambiar el medio de cultivo (a la misma concentración de suero) tras las primeras 24 horas cuando ya se han adherido suficientes células. Posteriormente el medio se cambiará aproximadamente cada 48 h, dependiendo del ritmo de crecimiento celular, de manera que en unos pocos días el número de células se multiplica ocupando toda la superficie de la placa o frasco al reponer nutrientes y eliminar productos de degradación de forma periódica mediante el cambio de medio.

Los medios de cultivo son generalmente tamponados para mantener un pH en torno a 7,4, además están dotados de indicadores de pH, como el rojo fenol, que cambian de color a medida que aparecen catabolitos ácidos en el medio, resultado del metabolismo celular. De manera que al principio el medio tendrá un color rojo (más alcalino) y conforme las células vayan proliferando, vertiendo metabolitos y productos de desecho tornará a un color más amarillento (más ácido).

Cuando las células que crecen adheridas a plástico (fondo del frasco o placa) ocupan toda la superficie o bien cuando todas las células están en contacto con otras (sin necesariamente cubrir completamente toda la superficie del plástico) se produce una situación denominada *confluencia* del cultivo, en la cual la densidad celular es suficientemente elevada para provocar una parada en el crecimiento del cultivo impuesta por el proceso de inhibición por contacto.

Períodos excesivamente prolongados en confluencia pueden alterar seriamente las propiedades de la línea celular por lo que deberemos realizar una resiembra o pase tanto si queremos realizar ensayos con la misma línea celular como si lo que deseamos es expandir las células para aumentar su número total, para lo que se distribuirán todas las células adheridas (retirando las flotantes junto con el medio) a un número mayor de frascos o placas.

Lo primero que hacemos a la hora de realizar un pase de células es preparar el medio de cultivo que se utilizará en los nuevos frascos o placas (ver apartado “Preparación del medio de cultivo”). En este caso podemos rebajar la concentración de FBS a la mitad si nos interesa que el cultivo prolifere a un ritmo más lento. Con una pipeta serológica introduciremos un volumen de unos 12 ml de medio en cada frasco que vayamos a utilizar para expandir, y los llevaremos a la incubadora hasta que tengamos preparadas las células.

A continuación se procederá a la retirada del medio de cultivo del frasco utilizado hasta el momento y al lavado del mismo con 12 ml de DPBS® (*Dulbecco's Phosphate Buffered Saline*) sin calcio ni magnesio (ya que estos iones solo favorecerían aún más la adhesión celular mediante cadherinas, principales proteínas de adhesión celular que son calcio-dependientes). Se realizarán 3 lavados, para lo cual usaremos una pipeta serológica y, para retirar el DPBS, un aspirador conectado a una pipeta Pasteur de vidrio que desecharemos al contenedor de residuos amarillo una vez hayamos terminado de utilizarla (cuidando de que la punta no contacte con ninguna superficie, manteniendo así la esterilidad); este sistema es el mismo que empleamos para retirar el medio de cultivo o cualquier líquido que va a ser desechado.

Para levantar las células adherentes en una suspensión celular, se utiliza una sustancia proteolítica o proteasa que digiere aquellas proteínas celulares implicadas en la adhesión celular al soporte. Puede usarse la tripsina (tripsinización) pero considerando que puede ser demasiado agresiva para las células y sus proteínas de membrana, en nuestro caso optamos por emplear acutasa (*Accutase*®).

De esta forma, tras el lavado, añadimos 1,5-2 ml de acutasa en el frasco moviendo bien el recipiente en el eje horizontal para que se distribuya bien por toda la superficie. Daremos además golpes secos en los laterales del recipiente para que se terminen de despegar el mayor número de células posible.

Utilizaremos a continuación 1,5-2 ml de medio (puede ser uno que hayamos utilizado con anterioridad en otros pases ya que no será el que utilicemos definitivamente para nuestras células) que añadiremos sobre la acutasa vertida anteriormente para inactivarla (véase que utilizamos el mismo volumen de este medio que de acutasa) y pipetearemos todo varias veces para conseguir una suspensión de células lo más sueltas posible. Esta solución la pasaremos a un tubo de centrifuga o Falcon, y realizaremos una segunda pasada con 5 ml de medio para tratar de arrastrar las células que puedan haberse quedado todavía adheridas al fondo de plástico. Seguidamente introduciremos de igual modo este volumen en el mismo tubo Falcon.

Para separar la parte celular de la acutasa y el medio utilizados para despegar las células utilizaremos la centrifugadora.

1. Primero hay que equilibrar las cargas con la misma masa y centro de gravedad en posiciones opuestas para que el centro del rotor sea estable; para ello utilizaremos la báscula miligrámica y llenaremos otro tubo Falcon con agua ayudándonos de una pipeta Pasteur de plástico hasta que la báscula se estabilice en 0 (masas iguales).
2. Una vez introducidos los tubos nos aseguraremos de que la tapa está correctamente cerrada y accionaremos la centrifuga durante 5 minutos a 250 g.

Ya centrifugado, aspiraremos el medio no celular del tubo Falcon procurando aspirar primero la espuma y burbujas que se puedan haber formado, y teniendo cuidado de no aspirar la parte celular. Hecho esto, cerraremos el tubo y disgregaremos el pellet de células con golpes secos o vibraciones y seguidamente pipetearemos con unos 2 ml de medio “nuevo” (según el grosor del pellet de células que hayamos obtenido utilizaremos más o menos volumen), que ya habíamos preparado previamente y que utilizaremos finalmente para terminar de disgregar las células.

Llegados a este punto, cogemos una muestra para realizar el recuento de células lo que nos permitirá obtener el número de células viables aproximado y realizar los cálculos necesarios para distribuir nuestras células en función de nuestros objetivos (expandir, ensayos experimentales, etc.). Para mantener unas condiciones de cultivo reproducibles entre pases y experimentos, es recomendable sembrar las células a la misma densidad, para lo cual necesitamos conocer el número de células en la suspensión preparada.

La manera más común de determinar el número de células es contándolas en un hemocitómetro o cámara de Neubauer (Figura 2); como la acutassa y el pipeteo de las células conlleva inevitablemente la muerte de cierto número de células, se emplea una tinción para poder diferenciar las células vivas y las muertas. Se contará el total de las células vivas y muertas pero para sembrar de nuevo las células tendremos en cuenta el número de células vivas.

La distinción entre células vivas y muertas se lleva a cabo utilizando un colorante vital como el Azul de Tripano (*Trypan Blue*), cuyo stock está en una concentración de 0,4% en tampón fisiológico (por ejemplo PBS).

De esta manera la muestra de células que cogemos de la suspensión que hasta ahora hemos preparado será de unos 11  $\mu\text{l}$  (células que al final descartaremos, por lo que no necesitarán medio estéril). Mezclamos este volumen en un tubo Eppendorf con 11  $\mu\text{l}$  de solución de Azul de Tripano. A continuación pipeteamos 10  $\mu\text{l}$  de esta nueva suspensión en cada lado del hemocitómetro.

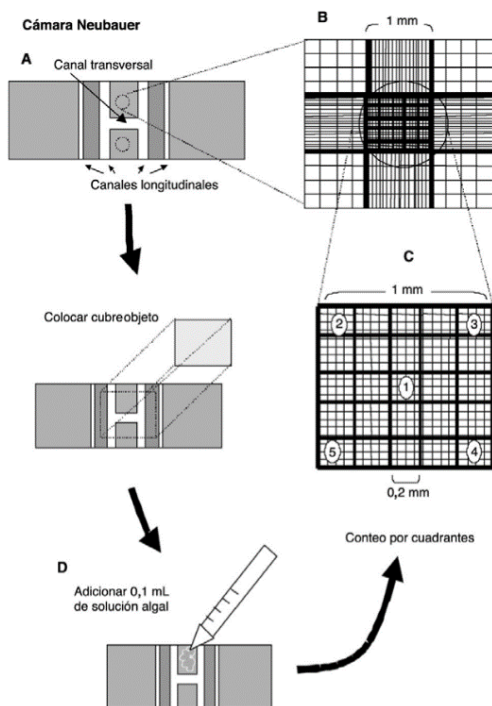


Figura 2. Cámara de Neubauer

Bajo el microscopio, se observa que el hemocitómetro está equipado a ambos lados con una cuadrícula de 9 cuadrados cada uno de los cuales está subdividido en otros 16 más pequeños. La cámara está diseñada de manera que el volumen medio sobre uno de los cuadrados grandes es de 0,1  $\mu\text{l}$  (o lo que es lo mismo, 0,1  $\text{mm}^3$ ). El recuento se realiza sobre las dos cuadrículas grandes a cada lado de la cámara, de modo que se tengan cuatro determinaciones del número de células en un cuadrado grande (cuatro en cada una de las dos cuadrículas) y cuya medida será el número de células en 0,1  $\mu\text{l}$  de la suspensión de células en Azul de Tripano. Dichos cuadrados en los que se lleva a cabo el recuento serán los que se encuentren en las cuatro esquinas de las cuadrículas de 9 cuadrados.

Teniendo en cuenta las diluciones realizadas calcularemos el número total de células en los 2 ml de suspensión que hemos preparado:

1. Realizar promedio del número de células contadas en cada uno de los 8 cuadrados (4 por cuadrícula).

2. Multiplicar el número medio de células contadas por 2 (la dilución con el Azul de Tripano está a la mitad), y multiplicar también por 10.000  $\mu\text{l}$  (ya que queremos obtener el resultado en mililitros, y estamos trabajando con un volumen de 0,1  $\mu\text{l}$ ). De esta forma obtendremos el número de células totales por cada ml de nuestra suspensión, por lo que si queremos saber el número total de células que tenemos únicamente tendremos que multiplicar por el volumen de nuestra suspensión en el medio de cultivo “nuevo”, en este caso 2 ml.
3. El mismo proceso se aplica al número de células vivas que contemos, de modo que podemos hallar el % de viabilidad de nuestras células.

Una vez conocemos el número de células viables que tenemos en suspensión ya podremos distribuirlas según nuestros objetivos añadiendo el volumen de medio que se precise, que ya preparamos previamente. Por ejemplo en otro frasco T-75 para expandir (12 ml), y en dos placas multipocillos, una P48 (300  $\mu\text{l}$  por pocillo) y otra P96 (150  $\mu\text{l}$  por pocillo) para realizar ensayos experimentales. Por último incubaremos nuestro nuevo frasco y las placas y cambiaremos el medio cuando sea pertinente.

## ENSAYO DE CITOTOXICIDAD Y VIABILIDAD CELULAR

Para este ensayo emplearemos los seis compuestos (Probenecid, Rojo de Rutenio, GSK, HC, AB3A y AB7A) a distintas concentraciones, en ambas líneas celulares. Trabajaremos con placas multipocillos P48, seis por línea celular (utilizaremos los seis compuestos en ambas líneas celulares) de manera que en cada placa existan 8 condiciones o columnas, de 6 pocillos cada una (7 concentraciones de un compuesto + 1 columna control con medio o “concentración 0”).

Debemos tener en cuenta que para una P48 serán necesarios 300  $\mu\text{l}$  por pocillo (1 pocillo=1 $\text{cm}^2$ ), si bien en este experimento decidimos usar 250  $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ . Por lo tanto en cada tubo que preparemos para las distintas condiciones deberá haber un mínimo de 1,8 ml de compuesto y medio correspondiente a la línea celular (contaremos siempre con un pequeño exceso para no tener problemas de volumen al distribuirlo en la placa).

Debido a que cada compuesto se encuentra a una concentración de stock distinta, inicialmente elaboraremos una dilución de trabajo todos ellos en DMSO 0,1% (dimetilsulfóxido) un disolvente orgánico incoloro, excepto el Rojo de Rutenio que estará disuelto en agua destilada, partiendo de esta manera de diluciones 1:1000 en todos los compuestos para poder preparar más cómodamente los tubos con las distintas concentraciones.

Las concentraciones utilizadas son en cierto modo "exploratorias". Estos compuestos no se han utilizado en células endoteliales y tampoco en progenitores endoteliales, por lo que se aplican concentraciones que habían mostrado actividad en ensayos de electrofisiología en otros tipos celulares, principalmente líneas transformadas y fibroblastos.



Las concentraciones de los distintos compuestos se describen a continuación (P48 para cada una de las dos líneas celulares).

Probenecid:

100 μM	50 μM	25 μM	12,5 μM	6,25 μM	3,125 μM	1,5625 μM	0 (control)

Rojo de Rutenio:

10 μM	5 μM	2,5 μM	12,5 μM	0,625 μM	0,3125 μM	0,15625 μM	0 (control)

GSK:

200 nM	100 nM	50 nM	25 nM	12,5 nM	6,25 nM	3,125 nM	0 (control)

HC:

1 μM	0,5 μM	0,25 μM	1,25 μM	00,625 μM	00,3125 μM	00,15625 μM	0 (control)

AB3A y AB7A (cada uno en una placa):

10 $\mu\text{M}$	5 $\mu\text{M}$	2,5 $\mu\text{M}$	12,5 $\mu\text{M}$	0,625 $\mu\text{M}$	0,3125 $\mu\text{M}$	0,15625 $\mu\text{M}$	0 (control)

Tras hacer dos lavados con PBS (con Calcio y Magnesio) añadiremos el medio con sus respectivas concentraciones de cada compuesto e incubaremos.

Tras 24 horas los compuestos ya han ejercido cierto efecto citotóxico sobre las células y para medirlo emplearemos la resazurina o *Alamar Blue* (31), un colorante azul y no fluorescente que actúa como un indicador redox que permite detectar la viabilidad de las células por la conversión de este reactivo mediante reducción irreversible a resorufina (de color rosado y altamente fluorescente), y en una segunda etapa reversible, a dihidroresorufina (incolore y no fluorescente), procesos que se asocian principalmente con la mitocondria de células viables.

Añadiremos al nuevo medio con compuesto la resazurina (5  $\mu\text{l}$  / 100 ml de medio) y dejaremos que actúe durante 1 hora en la incubadora.

El crecimiento celular crea un ambiente reducido (conversión a resorufina de color rojizo y muy fluorescente), mientras que la inhibición del crecimiento mantiene un entorno oxidado (mantendrá el color azul de la resazurina y no emitirá fluorescencia).

La resorufina es difundida al medio permitiendo el continuo monitoreo de la viabilidad y/o citotoxicidad mediante la medición de la fluorescencia o la absorbancia mediante un espectrofotómetro. De esta forma la fluorescencia y la señal colorimétrica generada del ensayo son proporcionales, de manera directa e inversa respectivamente, al número de células vivas en la muestra. La absorbancia se mide a una longitud de onda de 600 nm, y la fluorescencia con una excitación  $E_x=530-570$  nm y una emisión  $E_m=590-620$  nm.

Una vez finalizada la medición desecharemos las placas o, si queremos seguir realizando experimentos sobre esas mismas células, se retira la solución de resazurina con el aspirador y se realiza un lavado con PBS con Calcio y Magnesio, tras lo cual añadiremos nuevo medio e incubaremos para poder seguir trabajando con esas mismas células posteriormente.

El valor IC50 indica la concentración a la que un fármaco o sustancia es capaz de inhibir un proceso biológico concreto en un 50%. Este parámetro nos será de gran utilidad para determinar si las condiciones de cultivo celular con los diferentes fármacos influyen en la viabilidad y citotoxicidad. Mediremos la potencia citotóxica de cada compuesto mediante un espectrofotómetro (medida de fluorescencia).

Para el cálculo del IC50 emplearemos los datos de fluorescencia (el promedio de los pocillos de cada una de las columnas), ya que se correlacionan de manera más precisa con la viabilidad celular que los de absorbancia, ya que la absorbancia captada engloba tanto a la de la resazurina (células no viables) como a la de la resorufina (células vivas). Utilizaremos la herramienta web: [https://www.aatbio.com/tools/ic50-calculator\(30\)](https://www.aatbio.com/tools/ic50-calculator(30)) ya comentada en epígrafes anteriores.

## ENSAYO DE PROLIFERACIÓN Y CRECIMIENTO CELULAR

En ambas líneas celulares se prepararán placas P48 para realizar un ensayo de proliferación o crecimiento celular a lo largo de varios días utilizando los mismos compuestos previamente empleados y otros dos nuevos compuestos (AB3A y AB7A). Partiremos inicialmente desde un momento 0 sin compuesto y mediremos fluorescencia de la misma forma que se ha indicado en el ensayo de citotoxicidad y viabilidad celular. Posteriormente añadiremos los compuestos distribuidos en las concentraciones deseadas por columnas y se realizarán mediciones a las 24h, a las 48h y a las 72h, cambiando el medio con la concentración de compuesto correspondiente después de cada medición (ya que deberemos retirar la resazurina que añadimos para medir en el espectrofotómetro). Finalmente elaboraremos una representación del crecimiento celular que ha experimentado cada línea celular sometida a las distintas condiciones a lo largo de ese tiempo.

Para esto debemos entender que el resultado de una línea celular sometida a un compuesto será igual al sumatorio de proliferación + muerte celular + células que se mantienen en estado estacionario sin dividirse.

Igual que en el ensayo de citotoxicidad, emplearemos 2 placas P48 por línea celular. Llamaremos “Placa 1” (BH20 o C2.1.1) a la que contendrá las condiciones con Probenecid y Rojo de Rutenio, y “Placa 2” a la que contendrá las condiciones con GSK y HC. Posteriormente se realizará un promedio de los resultados obtenidos en los 6 pocillos de cada condición para obtener muestras lo más homogéneas y representativas posible. Las condiciones por columnas de las distintas placas se describen a continuación.

Placa 1:

Probenecid 100 $\mu$ M	Probenecid 10 $\mu$ M	Probenecid 1 $\mu$ M	Probenecid 100 $\mu$ M + Rojo de Rutenio 10 $\mu$ M	Rojo de Rutenio 10 $\mu$ M	Control Medio	Control DMSO 0,1%	AB3A 10 $\mu$ M

Placa 2:

GSK 200 nM	GSK 200 nM	GSK 200 nM	GSK 200 nM + HC 1 $\mu$ M	HC 1 $\mu$ M	Control Medio	Control DMSO 0,2%	AB7A 10 $\mu$ M

ENSAYO DE ANGIOGÉNESIS

Para comprobar el potencial proangiogénico o anti-angiogénico de los distintos compuestos activadores e inhibidores utilizados en nuestros ensayos sobre las ECFC realizaremos un ensayo de angiogénesis, para lo cual sembraremos las C2.1.1 y las BH20 en el hidrogel Cultrex® BME, una superficie similar a la membrana basal que rodea a las células endoteliales en nuestro cuerpo. De esta forma podremos observar cómo las células se diferencian morfológicamente para formar estructuras tubulares, lo cual se produce en unas pocas horas (18-20 h).

El procedimiento a seguir se describe a continuación:

1. Se cultivan las células ECFC hasta 50-60% de confluencia y se cuantifican según el procedimiento rutinario descrito anteriormente.

2. Se preparan las placas de angiogénesis *ibidi μ-Slide Angiogenesis* (5 columnas con 3 pocillos/columna) con 10 μL de Cultrex y se incuba durante 30 minutos a 37 C°.
3. Una vez levantadas las células, se depositan 10.000 células por pocillo sobre la matriz en el medio de cultivo con el compuesto correspondiente.
4. Se incuba a 37C° entre 18 y 20 horas. El resultado se observa y fotografía con el microscopio invertido.

Posteriormente se procede a fijar las células para tomar fotografías con lupa binocular:

1. Se elimina el medio de cultivo con una micropipeta y se lava con PBS con Ca<sup>2+</sup> y Mg<sup>+</sup>.
2. Se fija con glutaraldehido 1%, 10 minutos a 37C°.
3. Se realizan dos lavados con PBS y se tiñen las células con 30 μL de Cultrex® Cell Staining Solution que dejamos actuar durante 30 minutos a temperatura ambiente.
4. Finalmente se realizan tres últimos lavados con PBS y se toman fotografías con la lupa binocular.

Las concentraciones de compuestos que llevarán las distintas condiciones (columnas) de cada placa de angiogénesis se describen a continuación (para cada una de las dos líneas celulares).

Placa 1:

Probenecid 100 μM	Rojo de Rutenio 10 μM	Probenecid 100 μM + Rojo de Rutenio 10 μM	Control Medio	Control DMSO 0,1%

Placa 2:

GSK 200 nM	HC 1 μM	GSK 200 nM + HC 1 μM	Control Medio	Control DMSO 0,2%

Placa 3 (En este caso se decide distribución por filas):

Control DMSO 0,1%					
AB3A 10 μM					
AB7A 10 μM					

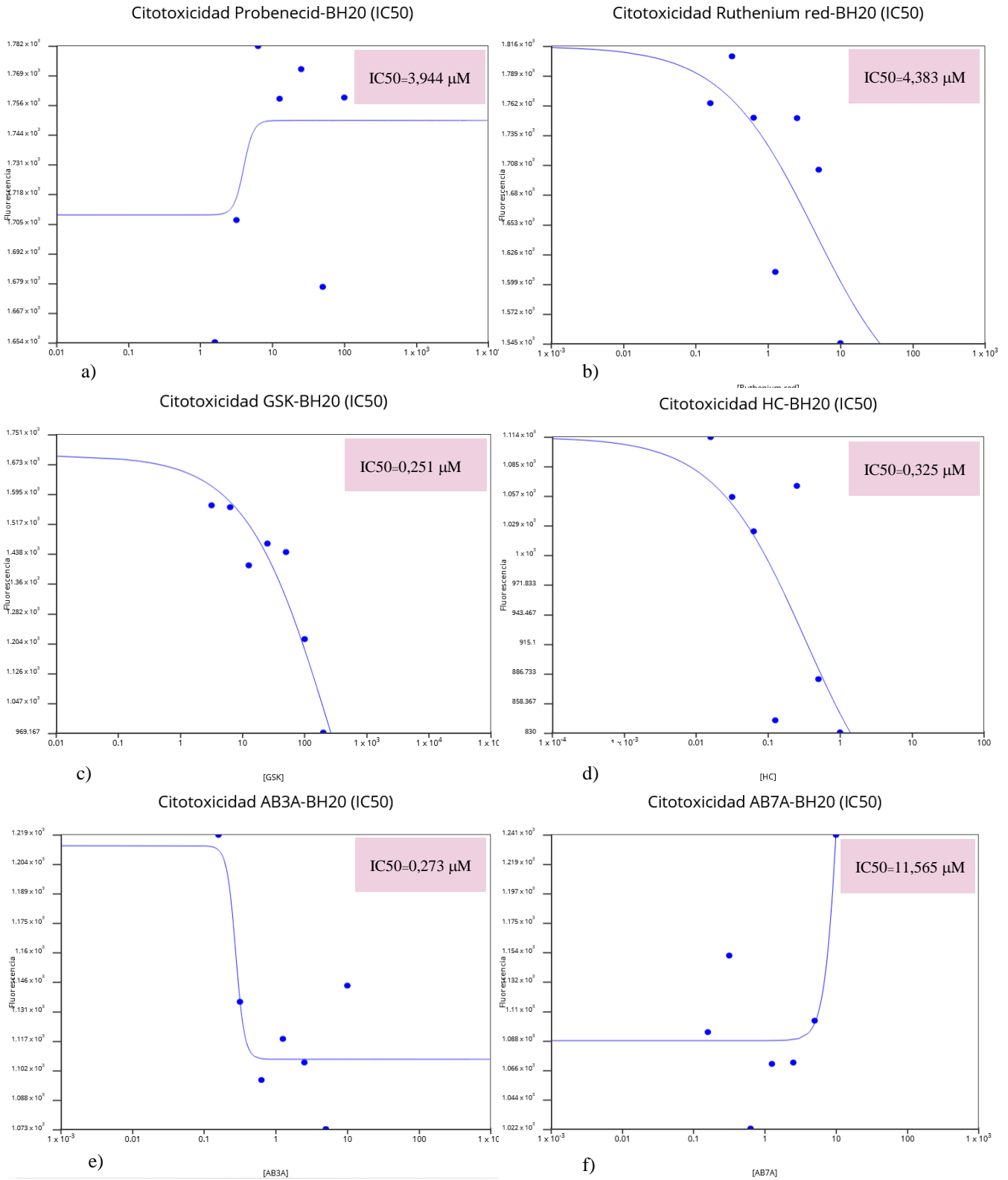
## RESULTADOS

### ENSAYO DE CITOTOXICIDAD Y VIABILIDAD CELULAR

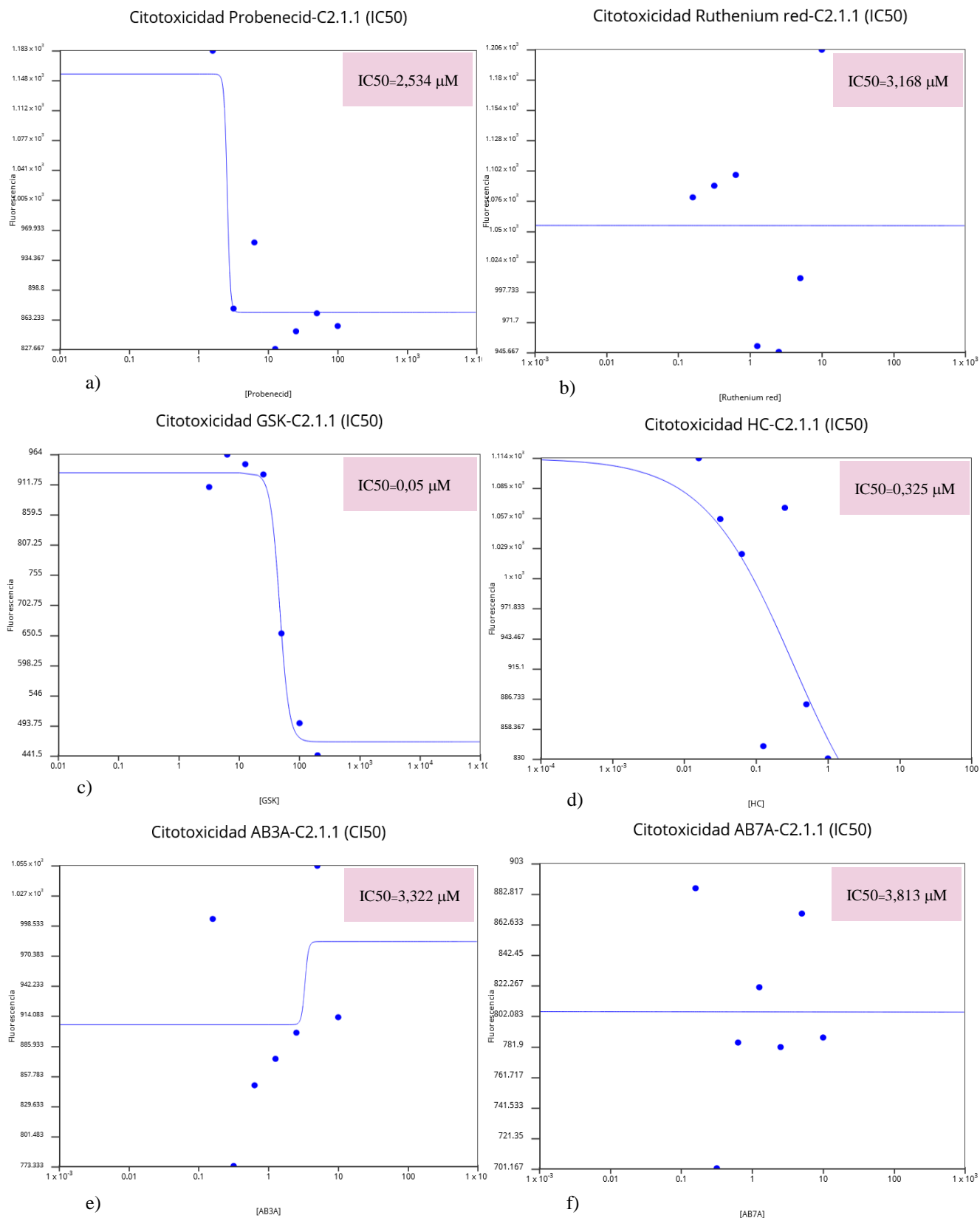
Mediante el cálculo del IC50 a partir de la fluorescencia medida tras 24 horas de acción de los compuestos sobre las células se puede comprobar la citotoxicidad teórica que ejerce cada uno de los compuestos utilizados en ambas líneas celulares.

En el caso de la línea celular BH20, la curva representada en la condición de Probenecid (Figura 5 a) indicaría no un efecto de citotoxicidad sino un aumento de la viabilidad celular con concentraciones crecientes de Probenecid, aunque como podemos ver la dispersión de puntos (valores reales) respecto de la curva dibujada por la aplicación web es considerablemente elevada, dando un IC50 de 3,944  $\mu\text{M}$ . Tanto el Rojo de Rutenio (Figura 5 b) como los fármacos que actúan sobre TRPV4 (GSK y HC) (Figura 5 c y d), presentan una curva de trayectoria similar que indica incremento de citotoxicidad a medida que aumenta la concentración del fármaco, siendo su IC50 de 4,383  $\mu\text{M}$ , 0,251  $\mu\text{M}$  y 0,325  $\mu\text{M}$  respectivamente. Los inhibidores de las fosfodiesterasas según la representación gráfica tendrían efectos contrarios sobre esta línea celular con el incremento de concentración: aumento de citotoxicidad por parte de AB3A con IC50 de 0,273  $\mu\text{M}$  (Figura 5 e) y aumento de viabilidad por parte de AB7A con IC50 de 11,565  $\mu\text{M}$  (Figura 5 f).

Por otra parte, en la línea C2.1.1 el Probenecid (Figura 6 a) sí que presenta una curva de citotoxicidad concentración-dependiente con IC50 2,534  $\mu\text{M}$ , aunque con valores reales medidos muy agrupados en la cola final de la curva sigmoidea. El Rojo de Rutenio con IC50 de 3,168  $\mu\text{M}$  (Figura 6 b) y el AB7A con IC50 de 3,813  $\mu\text{M}$  (Figura 6 f) tienen una representación en forma de línea recta paralela al eje de abscisas ya que los valores reales de fluorescencia a las distintas concentraciones están tan dispersos que prácticamente no se aprecia el punto de inflexión (aunque esta representación implicaría teóricamente que los compuestos no ejercen efecto alguno sobre la viabilidad de las células). GSK (Figura 6 c) y HC (Figura 6 d), como en el caso de las BH20, presentan una curva que indica incremento de citotoxicidad con el aumento de concentración del fármaco, con un IC50 de 0,05  $\mu\text{M}$  y 0,325  $\mu\text{M}$  respectivamente. Por último AB3 (Figura 6 e), con un IC50 de 3,322  $\mu\text{M}$ , presenta una curva sigmoidea en la que el incremento de concentración implica también un aumento de la fluorescencia medida, es decir, de la viabilidad celular, aunque de nuevo con valores reales muy dispersos respecto de la curva representada.



**Figura 5. Representación IC50 de a) Probenecid, b) Rojo de Rutenio, c) GSK, d) HC, e) AB3A y f) AB7A en línea celular BH20. Datos extrapolados por la aplicación web a partir de la fluorescencia medida tras 24 h de acción de los compuestos.**



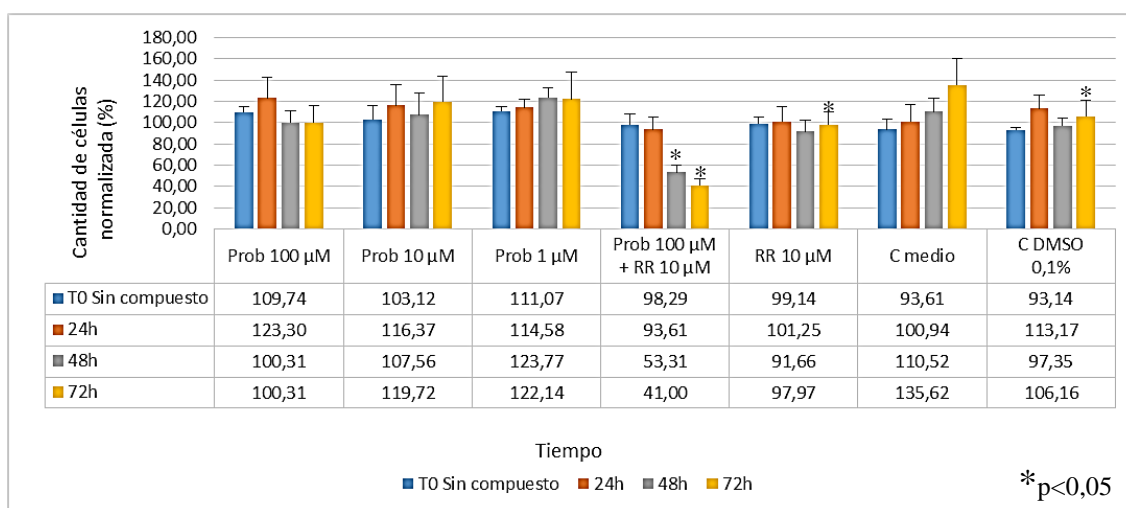
**Figura 6. Representación IC50 de a) Probenecid, b) Rojo de Rutenio, c) GSK, d) HC, e) AB3A y f) AB7A en línea celular C2.1.1. Datos extrapolados por la aplicación web a partir de la fluorescencia medida tras 24 h de acción de los compuestos.**



ENSAYO DE PROLIFERACIÓN Y CRECIMIENTO CELULAR

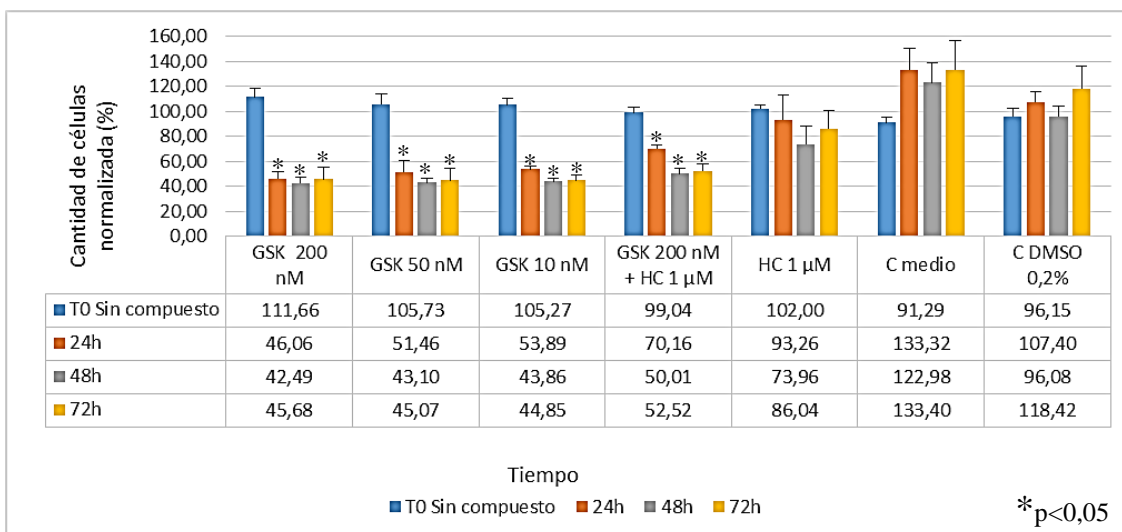
Los valores de fluorescencia han sido normalizados de forma porcentual respecto al promedio de todos los pocillos de la placa de “Tiempo 0” sin compuesto, que se considera como la situación de 100% de células vivas

En el caso de la línea celular BH20 se puede observar cómo el control con DMSO tanto 0,1% como a 0,2% ejerce un enlentecimiento de la proliferación celular aunque se mantiene dicha capacidad de las células adultas considerando que existe un incremento de la población celular respecto de la situación basal sin compuesto a lo largo de los distintos tiempos en los que se realiza la medición de fluorescencia. Esto nos permite interpretar más fácilmente el efecto que ejercen el resto de compuestos que se encuentran diluidos en DMSO. En el caso del Probenecid vemos cómo a la concentración de 100 µM llega a inhibir la actividad proliferativa apreciándose un leve efecto citotóxico, no así con el resto de concentraciones más bajas (10 y 1 µM) a las que el crecimiento celular se mantiene a lo largo del tiempo. En el caso del Rojo de Rutenio la proliferación se ve inhibida igualmente estancando el crecimiento de la población celular en una fase de meseta. Sin embargo el efecto combinado de Probenecid y Rojo de Rutenio disminuye claramente el porcentaje de células vivas a lo largo del tiempo lo cual indica un fuerte efecto citotóxico ejercido por la acción combinada de activador e inhibidor de TRPV2, al menos a las concentraciones utilizadas, existiendo una reducción estadísticamente significativa respecto al control de DMSO 0,1% a las 48 y 72h (Figura 7).

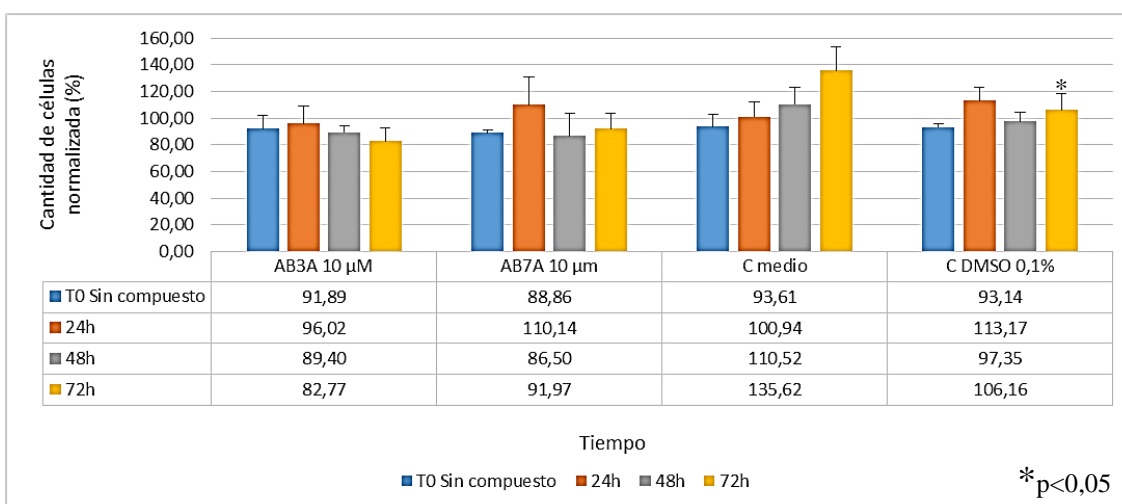


**Figura 7. Ensayo de proliferación celular en línea celular BH20 desde un tiempo 0 sin compuesto y tras 24, 48 y 72 horas bajo el efecto de los compuestos distribuidos por columnas - Probenecid (Prob), Rojo de Rutenio (RR), grupo control con medio (C medio), grupo control con DMSO al 0,1% (C DMSO 0,1%). El símbolo (\*) indica diferencias estadísticamente significativas con una p<0,05.**

En cuanto a los compuestos con TRPV4 como diana farmacológica, el GSK ejerce un potente efecto citotóxico sobre las células adultas a cualquiera de las concentraciones que se emplean (200, 50 y 10 nM), así como en combinación con HC, que además se refleja de una manera estadísticamente significativa en todos los tiempos respecto al control con DMSO 0,1% (y 0,2% en el caso de la combinación de GSK+HC). En cambio el inhibidor HC utilizado de forma aislada aparentemente solo frena la capacidad proliferativa de las células (Figura 8). De la misma forma ambos inhibidores de fosfodiesterasas paralizan el crecimiento de esta línea celular (Figura 9).

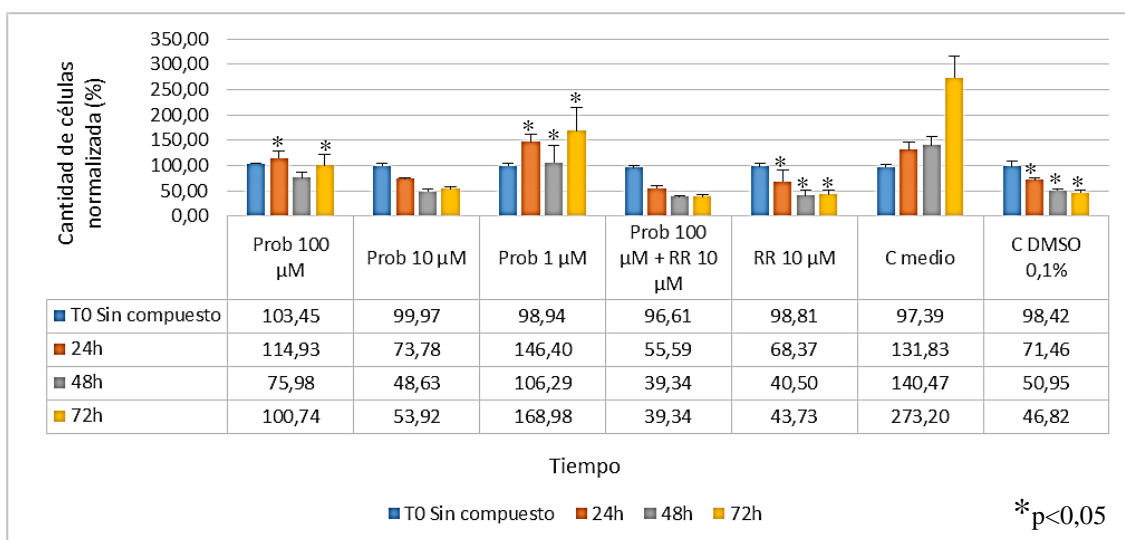


**Figura 8. Ensayo de proliferación celular en línea celular BH20 desde un tiempo 0 sin compuesto y tras 24, 48 y 72 horas bajo el efecto de los compuestos distribuidos por columnas - GSK, HC, grupo control con medio (C medio), grupo control con DMSO al 0,1% (C DMSO 0,2%).** El símbolo (\*) indica diferencias estadísticamente significativas con una  $p < 0,05$ .

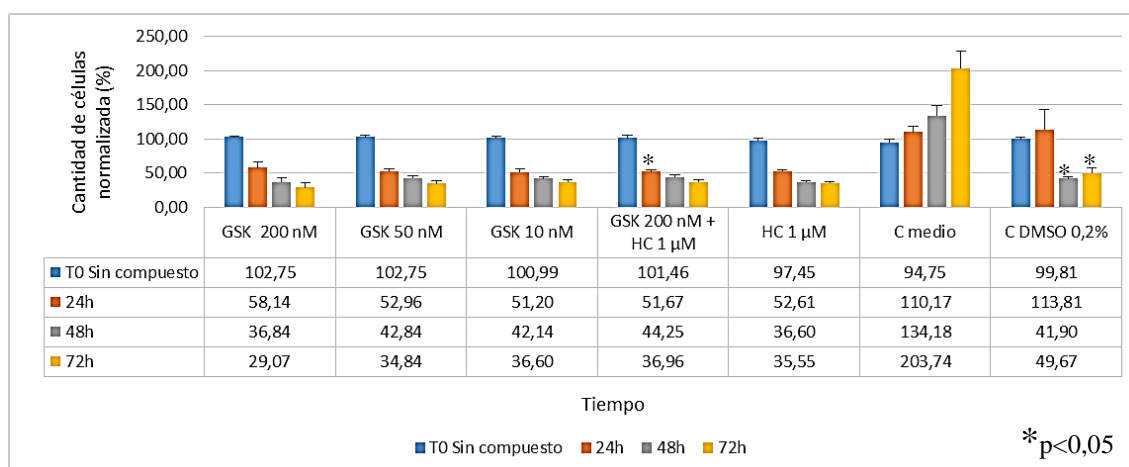


**Figura 9. Ensayo de proliferación celular en línea celular BH20 desde un tiempo 0 sin compuesto y tras 24, 48 y 72 horas bajo el efecto de los compuestos distribuidos por columna - AB3A, AB7A, grupo control con medio (C medio) y grupo control con DMSO al 0,1% (C DMSO 0,1%).** El símbolo (\*) indica diferencias estadísticamente significativas con una  $p < 0,05$ .

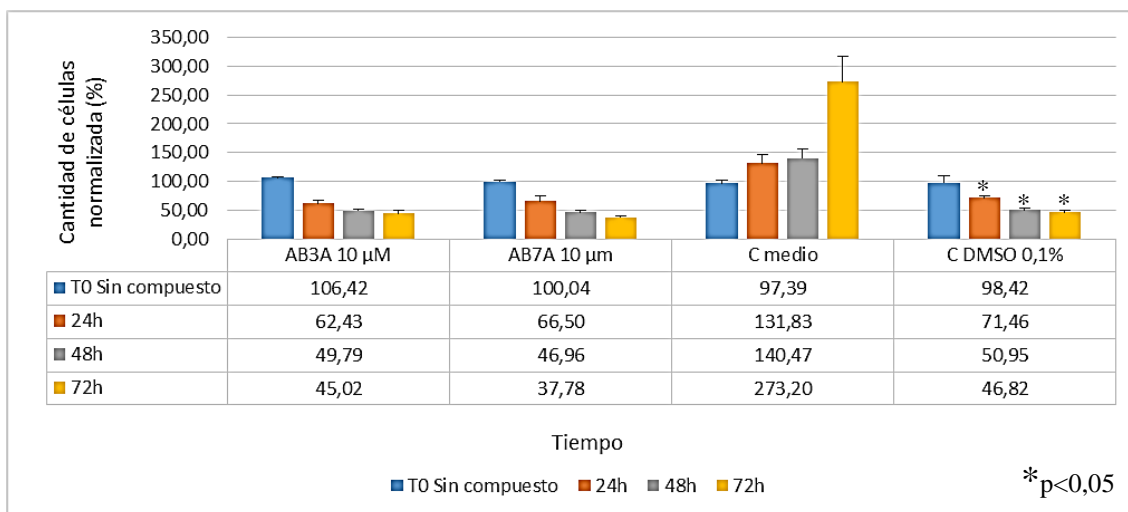
Por otra parte en la línea celular C2.1.1 las condiciones con control de DMSO a cualquiera de sus dos concentraciones tienen un efecto citotóxico estadísticamente significativo sobre la población celular, el cual se sumará al efecto que tengan los compuestos diluidos en DMSO. En esta línea celular todas las condiciones planteadas en el ensayo suponen una reducción considerable del número de células respecto del tiempo inicial (Figura 10, 11 y 12), incluyendo al Rojo de Rutenio que es el único que no está diluido en DMSO y por lo tanto el efecto evidenciado en las células sobre las que actúa no se ve influenciado por el efecto del disolvente. Podemos sin embargo destacar una excepción, en la condición de Probenecid a concentración 1  $\mu\text{M}$  en la que la cantidad de compuesto parece alterar de forma no concluyente la actividad celular a pesar de tener diferencias estadísticamente significativas con respecto al control de DMSO 0,1% (Figura 10).



**Figura 10. Ensayo de proliferación celular en línea celular C2.1.1 desde un tiempo 0 sin compuesto y tras 24, 48 y 72 horas bajo el efecto de los compuestos distribuidos por columnas - Probenecid (Prob), Rojo de Rutenio (RR), grupo control con medio (C medio), grupo control con DMSO al 0,1% (C DMSO 0,1%).** El símbolo (\*) indica diferencias estadísticamente significativas con una  $p < 0,05$ .



**Figura 11. Ensayo de proliferación celular en línea celular C2.1.1 desde un tiempo 0 sin compuesto y tras 24, 48 y 72 horas bajo el efecto de los compuestos distribuidos por columnas - GSK, HC, grupo control con medio (C medio), grupo control con DMSO al 0,1% (C DMSO 0,2%).** El símbolo (\*) indica diferencias estadísticamente significativas con una  $p < 0,05$ .



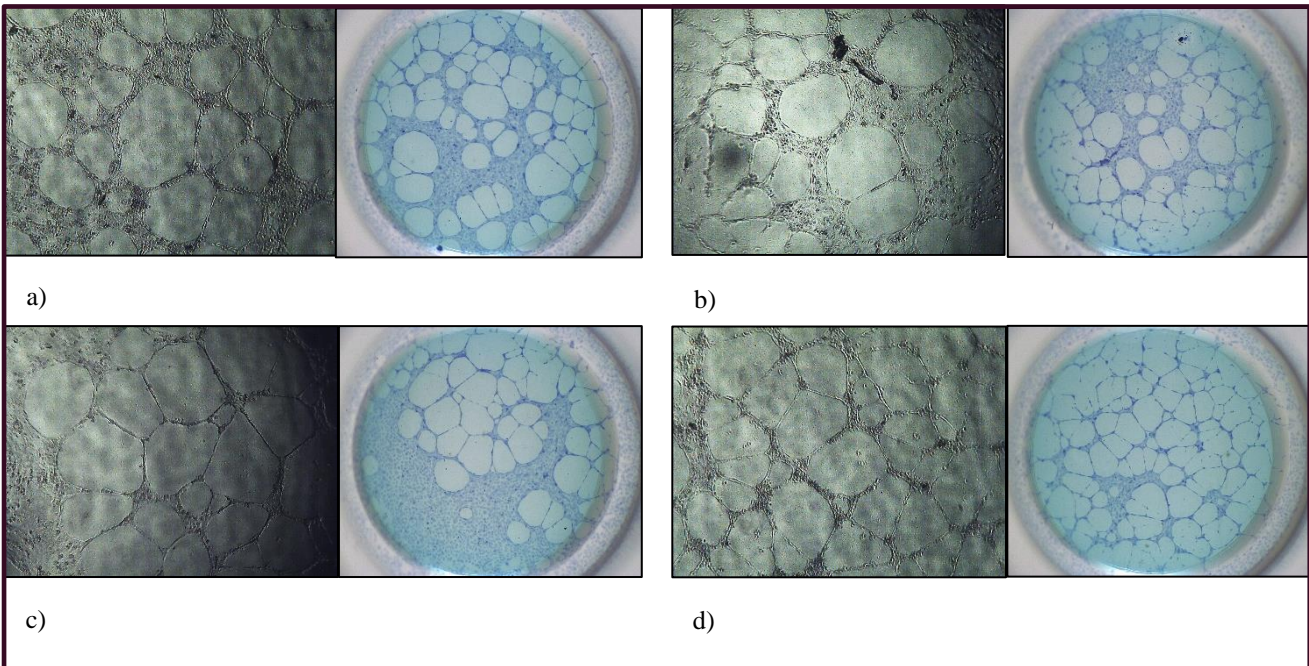
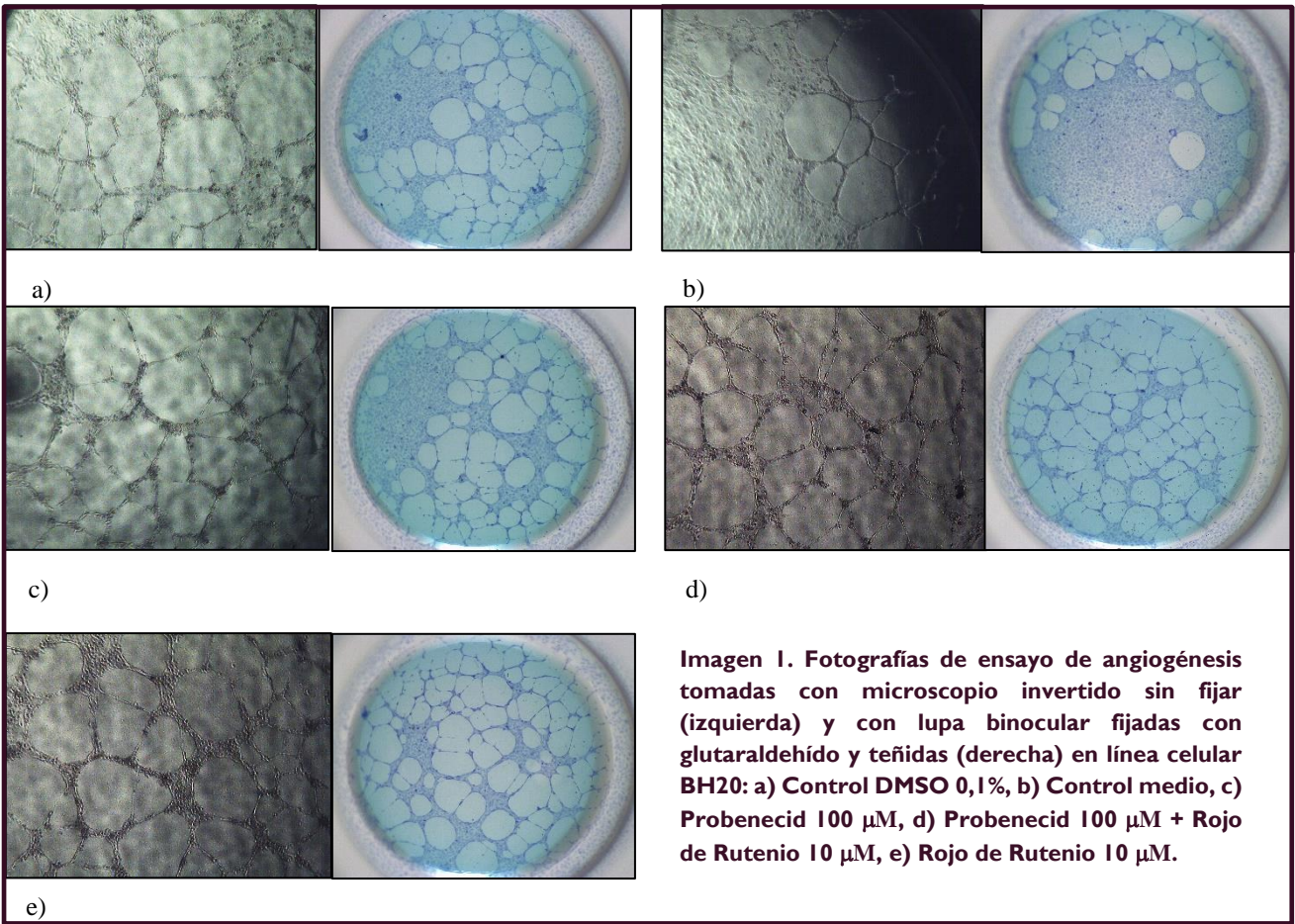
**Figura 12. Ensayo de proliferación celular en línea celular BH20 desde un tiempo 0 sin compuesto y tras 24, 48 y 72 horas bajo el efecto de los compuestos distribuidos por columna - AB3A, AB7A, grupo control con medio (C medio) y grupo control con DMSO al 0,1% (C DMSO 0,1%). El símbolo (\*) indica diferencias estadísticamente significativas con una  $p < 0,05$ .**

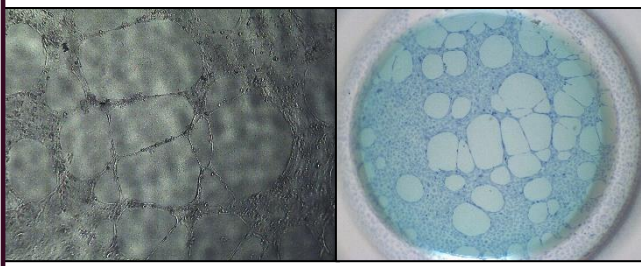
## ENSAYO DE ANGIOGÉNESIS

En conjunto, en ambas líneas celulares BH20 y C2.1.1, se puede observar como en el caso de los compuestos que actúan sobre los TRPV4 (GSK y HC) las imágenes obtenidas del ensayo de angiogénesis (Imágenes 2c, 2d, 2e, 4c, 4d y 4e) no muestran grandes diferencias respecto de los controles de medio y DMSO (Imágenes 2a, 2b, 4a, 4b), presentando estructuras tubulares definidas y más o menos organizadas, si bien se aprecia un considerable apiñamiento de las células. Sin embargo en aquellas condiciones en las que actúan los compuestos Probenecid y Rojo de Rutenio (Imágenes 1c, 1d, 1e, 3c, 3d y 3e) la organización en redes tubulares que forman las células son menos definidas y tienen un aspecto más desestructurado que los controles de medio y DMSO (Imágenes 1a, 1b, 3a y 3b).

En el caso de los inhibidores de fosfodiesterasas (AB3A y AB7A) podemos apreciar la formación de redes tubulares muy primitivas, desorganizadas y con multitud de células aglomeradas que todavía no han tenido tiempo para adoptar la disposición típica de las células endoteliales maduras, que se hace más evidente en la línea celular BH20 (Imagen 5), en comparación con el control con DMSO en el cual las estructuras vasculares tienen una apariencia de mayor evolución en el tiempo debido a que probablemente las células ya habrían entrado en estado de senescencia tras formar las redes tubulares antes de ser fijadas con glutaraldehído, por lo que dichos túbulos parecen haber comenzado a degradarse.

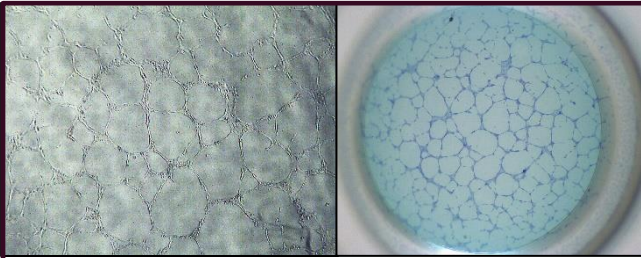
Las imágenes obtenidas con microscopio invertido y lupa binocular se muestran en las siguientes páginas.



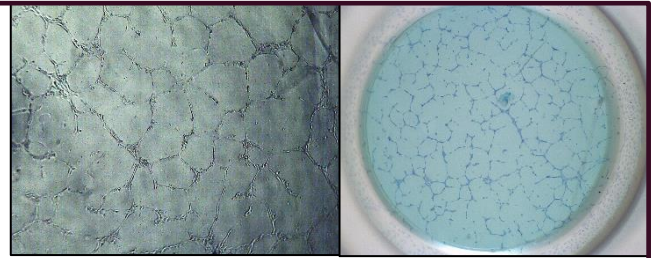


**Imagen 2. Fotografías de ensayo de angiogénesis tomadas con microscopio invertido sin fijar (izquierda) y con lupa binocular fijadas con glutaraldehído y teñidas (derecha) en línea celular BH20: a) Control DMSO 0,2%, b) Control medio, c) GSK 200 nM, d) GSK 200 nM + HC 1  $\mu$ M, e) HC 1  $\mu$ M.**

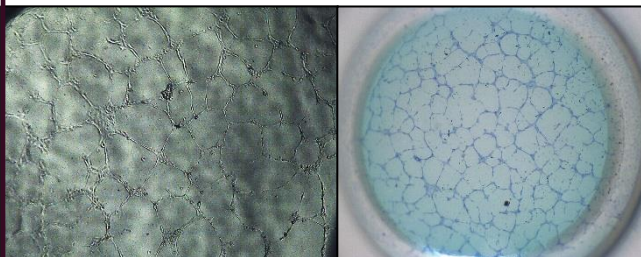
e)



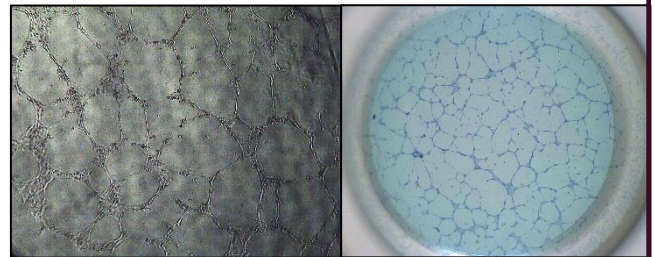
a)



b)

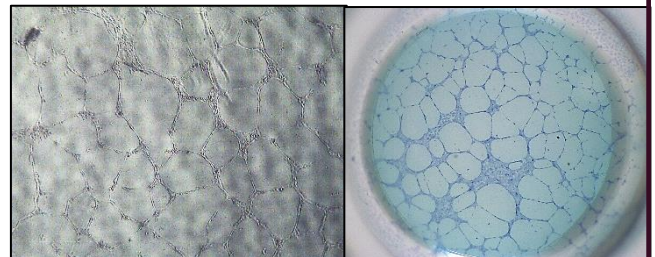


c)

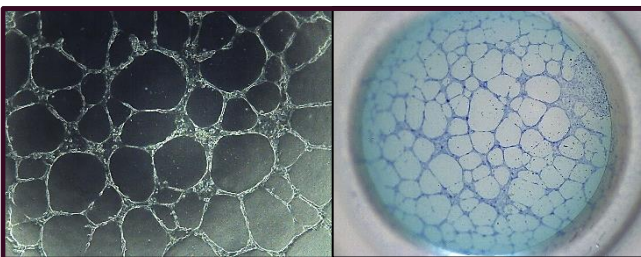


d)

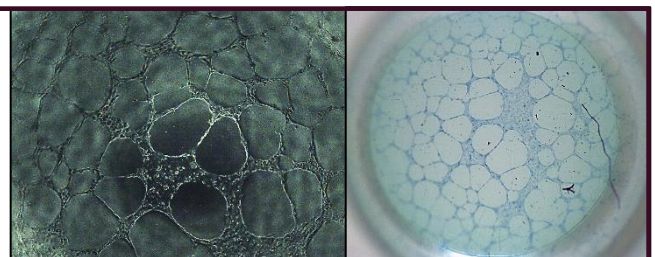
**Imagen 3. Fotografías de ensayo de angiogénesis tomadas con microscopio invertido sin fijar (izquierda) y con lupa binocular fijadas con glutaraldehído y teñidas (derecha) en línea celular C2.1.1: a) Control DMSO 0,1%, b) Control medio, c) Probenecid 100  $\mu$ M, d) Probenecid 100  $\mu$ M + Rojo de Rutenio 10  $\mu$ M, e) Rojo de Rutenio 10  $\mu$ M.**



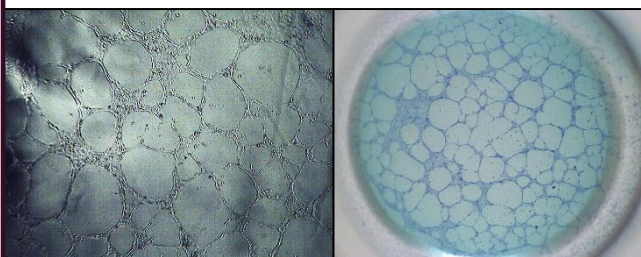
e)



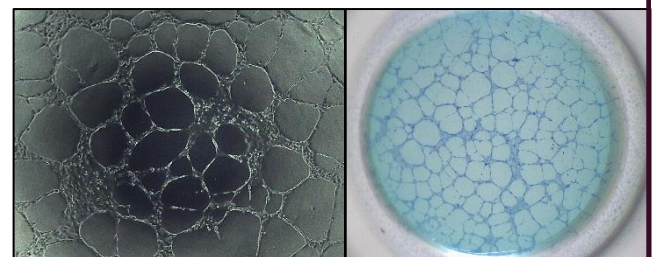
a)



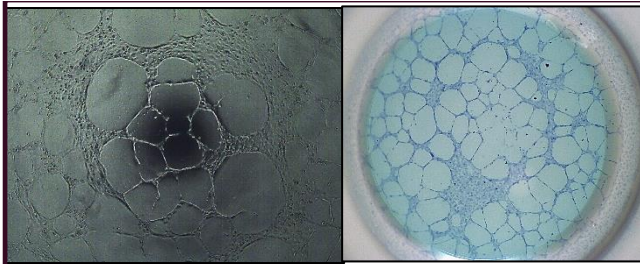
b)



c)

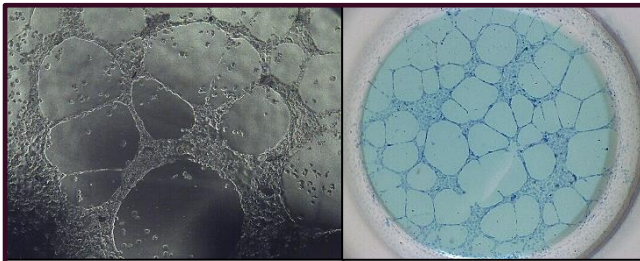


d)

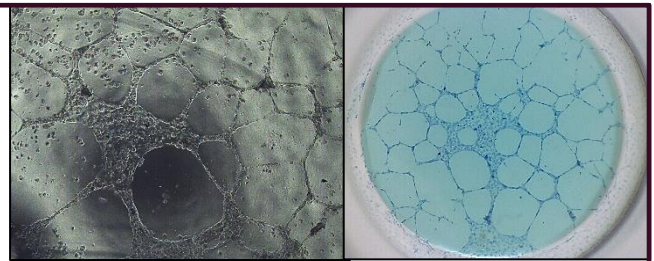


**Imagen 4.** Fotografías de ensayo de angiogénesis tomadas con microscopio invertido sin fijar (izquierda) y con lupa binocular fijadas con glutaraldehído y teñidas (derecha) en línea celular C2.I.1: a) Control DMSO 0,2%, b) Control medio, c) GSK 200 nM, d) GSK 200 nM + HC 1  $\mu$ M, e) HC 1  $\mu$ M.

e)

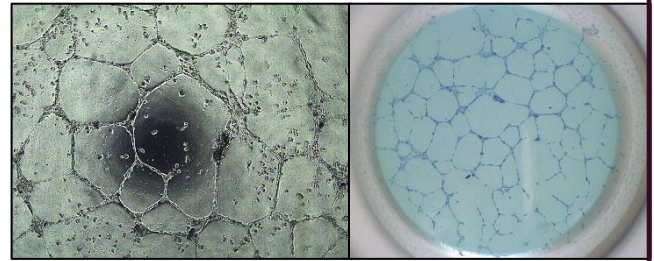


a)

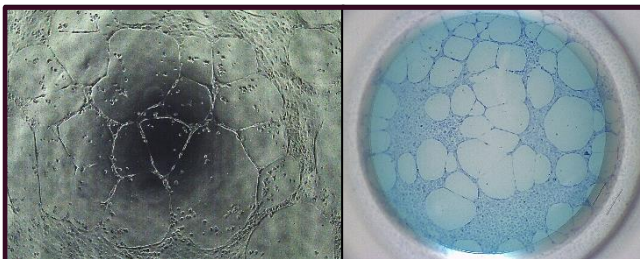


b)

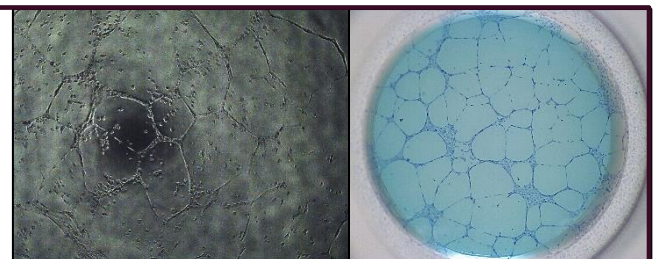
**Imagen 5.** Fotografías de ensayo de angiogénesis tomadas con microscopio invertido sin fijar (izquierda) y con lupa binocular fijadas con glutaraldehído y teñidas (derecha) en línea celular BH20: a) AB3A 10  $\mu$ M, b) AB7A 10  $\mu$ M, c) Control DMSO 0,1%.



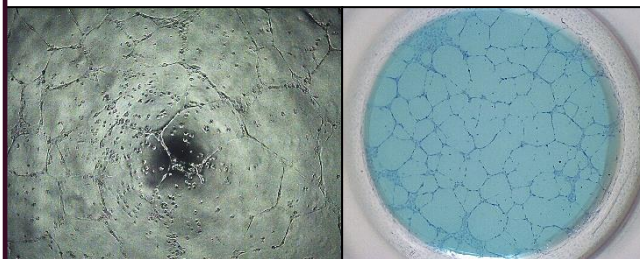
c)



a)



b)



c)

**Imagen 6.** Fotografías de ensayo de angiogénesis tomadas con microscopio invertido sin fijar (izquierda) y con lupa binocular fijadas con glutaraldehído y teñidas (derecha) en línea celular C2.I.1: a) AB3A 10  $\mu$ M, b) AB7A 10  $\mu$ M, c) Control DMSO 0,1%.

## DISCUSIÓN

### ENSAYO DE CITOTOXICIDAD Y VIABILIDAD CELULAR

Como podemos ver, las representaciones y cálculo de los IC50 de cada compuesto son aproximaciones realizadas por la herramienta web utilizada para dicho fin. Esto explica que la dispersión de los puntos respecto de la curva trazada sea considerablemente elevada en varias de las gráficas: tanto Probenecid, AB3A y AB7A en la línea celular BH20, como Rojo de Rutenio, AB3A y AB7A en la línea C2.1.1 muestran representaciones poco próximas a los valores obtenidos durante la medición por lo que no podemos considerarlas como una representación fiable del efecto real de citotoxicidad, o bien porque los compuestos no ejercen tal efecto citotóxico o por la posible existencia de factores externos que hayan alterado los resultados (utilización de concentraciones demasiado bajas, error humano en alguno de los procedimientos a realizar durante el ensayo, etc.). En la mayoría de los casos no se aprecia una mortalidad elevada o evidente de la población celular a las concentraciones utilizadas, lo cual nos permitió utilizar concentraciones dentro del mismo rango en el resto de ensayos.

Sin embargo podemos observar que en el caso de los compuestos que actúan sobre los TRPV4 (el activador GSK y el inhibidor HC), estos sí que ejercen un claro efecto citotóxico sobre ambas líneas celulares que es evidenciable con las concentraciones que utilizamos en este ensayo.

### ENSAYO DE PROLIFERACIÓN Y CRECIMIENTO CELULAR

Como es esperable, en todas las condiciones de control de medio de ambas líneas celulares se observa un crecimiento de la población celular a lo largo del tiempo que dura el ensayo. En comparación con esta situación se encuentran las condiciones con los distintos compuestos y sus concentraciones, y el control de DMSO.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos que ya se han comentado podemos decir que:

- Sorprendentemente, de forma contraria a lo que se demuestra en otros estudios como el de Hatano et al., 2013(32) en los que se afirma que la entrada de Ca<sup>2+</sup> mediada por TRPV4 promueve la replicación celular en una variedad de células endoteliales maduras, la estimulación de TRPV4 por GSK en nuestros experimentos con ECFC no solo no provocó un aumento en el número de células, sino que además redujo de manera importante la población celular a las concentraciones utilizadas. De esto se puede deducir que la entrada de Ca<sup>2+</sup> regulada por TRPV4 no implica por sí misma la proliferación de las Células Progenitoras Endoteliales y, coincidiendo con lo descrito en el estudio de Dragoni et al., 2015(26), *“es probable que requiera la activación concomitante de vías de*



*entrada de Ca<sup>2+</sup> adicionales o cascadas de transducción de señales*”. Por otra parte la inhibición farmacológica específica de TRPV4 con HC sí que cumple su función esperada y frena la proliferación de las ECFC.

- El Probenecid, como estimulante de TRPV2 no tuvo un efecto concluyente en lo que a las hipótesis que guían este trabajo se refiere, ya que al igual que el GSK, no favoreció de forma clara la proliferación celular y solo en algunas concentraciones esta actividad proliferativa se mantuvo en el tiempo, aunque de forma más atenuada y enlentecida que en el caso de las condiciones control con medio de cultivo EGM-2MV. De acuerdo con las hipótesis iniciales la inhibición de TRPV2 con Rojo de Rutenio redujo de forma significativa la proliferación de ECFC. Curiosamente HC ejerció un efecto más fuerte en comparación con Rojo de Rutenio a la hora de frenar la proliferación celular, a pesar de que el primero está diseñado para alterar selectivamente el flujo de entrada de Ca<sup>2+</sup> por TRPV4 y el Rojo de Rutenio puede afectar a otros canales de TRPV (TRPV1, TRPV2, TRPV4)(33) y por lo tanto sería concebible que fuese este último el que mayor grado de inhibición provocase.
- Los novedosos compuestos AB3A y AB7A con función de inhibidores de la enzima fosfodiesterasa 1 (PDE1), cuyo efecto antiproliferativo ya se había estudiado en el caso de las células tumorales del melanoma(29), volvieron a mostrar en nuestro estudio dicha capacidad, en este caso inhibiendo la proliferación de las líneas celulares de ECFC.

A la luz de los resultados del ensayo de proliferación resulta tentador especular sobre si las células son más sensibles en estado proliferativo a la citotoxicidad ejercida por los compuestos utilizados que en el propio ensayo en el que estudiábamos dicho efecto, en el cual las células se encontraban en un estado quiescente de confluencia y no de crecimiento. Esto podría explicar por qué en ciertos compuestos la proliferación no solo se frena si no que se evidencia una disminución considerable de la población celular. Además, reforzaría esta hipótesis el hecho de que este efecto citotóxico sea más evidente en la línea de células de cordón, las cuales de por sí tienen una mayor capacidad proliferativa al encontrarse en un estadio de maduración más precoz que las células adultas.

## ENSAYO DE ANGIOGÉNESIS

Si bien este ensayo podría dar resultados más concluyentes si se aplicase un estudio semicuantitativo sobre los resultados obtenidos, al ser esto mucho más costoso y elaborado, se escapa de los objetivos de este trabajo. Por lo tanto se realiza una interpretación descriptiva de los resultados apoyándose el autor de estas líneas en las imágenes obtenidas en laboratorio.

Basándonos en los resultados observados en este ensayo, destacamos que los hallazgos comentados sobre las condiciones con inhibidores de las fosfodiesterasas podrían traducirse en un retraso en el proceso o disminución de la capacidad de angiogénesis experimentado por parte de las ECFC al estar sometidas a la acción de los compuestos AB3A y AB7A. Estos resultados, junto con los del ensayo de proliferación abrirían la puerta a una nueva hipótesis que situaría a las fosfodiesterasas como posible diana terapéutica para frenar los procesos de angiogénesis en patologías tales como tumores cuya progresión depende en buena medida de la formación de neovasos gracias a los cuales las células tumorales se nutren y son capaces de diseminarse vía hematológica.

Además podemos comparar también ambas líneas celulares en su conjunto destacando que la línea C2.1.1 forma por lo general en todas las condiciones una mayor densidad de estructuras tubulares (mayores en número y de menor tamaño) que la línea celular BH20.

## CONCLUSIONES

Relativas al cultivo de ECFC según lo observado en el laboratorio:

- Las ECFC son líneas celulares primarias con limitada capacidad proliferativa, si bien inicialmente elevada. A medida que transcurren los pases en cultivo, la capacidad proliferativa disminuye, el tamaño de las células se incrementa, aparecen rasgos de senescencia y se reduce la capacidad clonogénica, lo cual se hace evidente de manera más temprana en la línea de células adultas.
- La línea de ECFC de cordón umbilical tiene una capacidad proliferativa mayor y cada pase entra antes en confluencia que en el caso de la línea de ECFC adultas.

Relativas los ensayos realizados con los diferentes fármacos:

- El cálculo del IC50 de cada compuesto resultaría más fiable con el empleo de un rango de concentraciones más amplio.
- Ambas líneas celulares de ECFC resultan ser más sensibles al efecto citotóxico de los compuestos en estado proliferativo que en estado quiescente o de confluencia.
- Los fármacos agonistas de TRPV4 y TRPV2, GSK-1016790A y Probenecid respectivamente, no cumplen el efecto esperado de potenciar la capacidad proliferativa de las ECFC.
- Los fármacos inhibidores de TRPV4 y TRPV2, HC-067047 y Rojo de Rutenio respectivamente, si cumplen el efecto de frenar la capacidad proliferativa de las ECFC aunque es el HC y no el Rojo de Rutenio el que lo hizo de una manera más notable, al contrario de lo esperado como se indica en la discusión.
- Los inhibidores de fosfodiesterasas AB3A y AB7A reducen la capacidad proliferativa y de angiogénesis de las ECFC, que concuerda con lo que podría esperarse observando el efecto de estos compuestos en otros estudios.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Endemann DH, Schiffrin EL. Endothelial dysfunction. Vol. 15, *J. Am. Soc. Nephrol.* 2004. p. 1983-92.
2. Dimmeler S, Zeiher AM. Vascular repair by circulating endothelial progenitor cells: The missing link in atherosclerosis? Vol. 82, *J. Mol. Med.* 2004. p. 671-7.
3. Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, Van Der Zee R, Li T, et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science.* 1997;275(5302):964-7.
4. Fadini GP, Losordo D, Dimmeler S. Critical reevaluation of endothelial progenitor cell phenotypes for therapeutic and diagnostic use. *Circ Res.* 2012;110(4):624-37.
5. Timmermans F, Plum J, Yöder MC, Ingram DA, Vandekerckhove B, Case J. Endothelial progenitor cells: Identity defined? *J Cell Mol Med.* 2009;13(1):87-102.
6. Hirschi KK, Ingram DA, Yoder MC. Assessing identity, phenotype, and fate of endothelial progenitor cells. Vol. 28, *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008. p. 1584-95.
7. Rehman J, Li J, Orschell CM, March KL. Peripheral blood «endothelial progenitor cells» are derived from monocyte/macrophages and secrete angiogenic growth factors. *Circulation.* 2003;107(8):1164-9.
8. Hur J, Yoon CH, Kim HS, Choi JH, Kang HJ, Hwang KK, et al. Characterization of Two Types of Endothelial Progenitor Cells and Their Different Contributions to Neovasculogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004;24(2):288-93.
9. Hill JM, Zalos G, Halcox JPJ, Schenke WH, Waclawiw MA, Quyyumi AA, et al. Circulating Endothelial Progenitor Cells, Vascular Function, and Cardiovascular Risk. *N Engl J Med.* 2003;348:593-600.
10. Kawamoto A, Gwon HC, Iwaguro H, Yamaguchi JI, Uchida S, Masuda H, et al. Therapeutic potential of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for myocardial ischemia. *Circulation.* 2001;103(5):634-7.
11. Ott I, Keller U, Knoedler M, Götze KS, Doss K, Fischer P, et al. Endothelial-like cells expanded from CD34 + blood cells improve left ventricular function after experimental myocardial infarction. *FASEB J.* 6 de junio de 2005;19(8):992-4.
12. Masuda H, Asahara T. Clonogenic assay of endothelial progenitor cells. *Trends Cardiovasc Med.* 2013;23(4):99-103.
13. Kwon SM, Lee JH, Lee SH, Jung SY, Kim DY, Kang SH, et al. Cross talk with hematopoietic cells regulates the endothelial progenitor cell differentiation of CD34 positive cells. *PLoS One.* 2014;9(8).
14. Masuda H, Alev C, Akimaru H, Ito R, Shizuno T, Kobori M, et al. Methodological development of a clonogenic assay to determine endothelial progenitor cell potential. *Circ Res.* 24 de junio de 2011;109(1):20-37.
15. Fang S, Wei J, Pentimikko N, Leinonen H, Salven P. Generation of Functional Blood Vessels from a Single c-kit+ Adult Vascular Endothelial Stem Cell. *PLoS Biol.* 2012;10(10):1001407.
16. Asahara T, Kawamoto A, Masuda H. Concise review: Circulating endothelial progenitor cells for vascular medicine. *Stem Cells.* 2011;29(11):1650-5.
17. Yoder MC. Is endothelium the origin of endothelial progenitor cells? *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2010;30(6):1094-103.
18. Lozano Gerona J. Efecto de la Hipoxia sobre las Células Progenitoras Endoteliales / Javier

- Lozano Gerona [Internet]. [Zaragoza]: Universidad de Zaragoza; 2019 [citado 3 de enero de 2021]. Disponible en: <https://zaguan.unizar.es/record/77087/files/TESIS-2019-046.pdf>
19. Collet G, Szade K, Nowak W, Klimkiewicz K, El Hafny-Rahbi B, Szczepanek K, et al. Endothelial precursor cell-based therapy to target the pathologic angiogenesis and compensate tumor hypoxia. *Cancer Lett.* 28 de enero de 2016;370(2):345-57.
  20. Kalka C, Masuda H, Takahashi T, Kalka-Moll WM, Silver M, Kearney M, et al. Transplantation of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97(7):3422-7.
  21. Critser PJ, Kreger ST, Voytik-Harbin SL, Yoder MC. Collagen matrix physical properties modulate endothelial colony forming cell-derived vessels in vivo. *Microvasc Res.* 2010;80(1):23-30.
  22. Sieveking DP, Buckle A, Celermajer DS, Ng MKC. Strikingly Different Angiogenic Properties of Endothelial Progenitor Cell Subpopulations. Insights From a Novel Human Angiogenesis Assay. *J Am Coll Cardiol.* 2008;51(6):660-8.
  23. Lee SH, Lee JH, Han YS, Ryu JM, Yoon YM, Han HJ. Hypoxia accelerates vascular repair of endothelial colony-forming cells on ischemic injury via STAT3-BCL3 axis. *Stem Cell Res Ther.* 2015;6(1).
  24. Abaci HE, Truitt R, Luong E, Drazer G, Gerecht S. Adaptation to oxygen deprivation in cultures of human pluripotent stem cells, endothelial progenitor cells, and umbilical vein endothelial cells. *Am J Physiol - Cell Physiol.* 2010;298(6):1527-37.
  25. Shibasaki K. TRPV4 ion channel as important cell sensors. *J Anesth.* 2016;30(6):1014-9.
  26. Dragoni S, Guerra G, Pla AF, Bertoni G, Rappa A, Poletto V, et al. A functional transient receptor potential vanilloid 4 (TRPV4) channel is expressed in human endothelial progenitor cells. *J Cell Physiol.* 2015;230(1):95-104.
  27. Kojima I, Nagasawa M. Trpv2. *Handb Exp Pharmacol.* 2014;222:247-72.
  28. Negri S, Faris P, Berra-Romani R, Guerra G, Moccia F. Endothelial Transient Receptor Potential Channels and Vascular Remodeling: Extracellular Ca<sup>2+</sup> Entry for Angiogenesis, Arteriogenesis and Vasculogenesis. *Front Physiol.* 21 de enero de 2020;10.
  29. Castán A, Badorrey R, Díez JA, Christoffersen CT, Rasmussen LK, Kehler J, et al. Debenzylative Cycloetherification as a Synthetic Tool in the Diastereoselective Synthesis of 3,6-Disubstituted Hexahydro-2 H-furo[3,2- b]pyrroles, PDE1 Enzyme Inhibitors with an Antiproliferative Effect on Melanoma Cells. *J Org Chem.* 1 de mayo de 2020;85(9):5941-51.
  30. IC50 Calculator | AAT Bioquest [Internet]. 04 Apr. 2020. Disponible en: <https://www.aatbio.com/tools/ic50-calculator>
  31. O'Brien J, Wilson I, Orton T, Pognan F. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *Eur J Biochem.* 2000;267(17):5421-6.
  32. Hatano N, Suzuki H, Itoh Y, Muraki K. TRPV4 partially participates in proliferation of human brain capillary endothelial cells. *Life Sci.* 2013;92(4-5):317-24.
  33. Mergler S, Valtink M, Taetz K, Sahlmüller M, Fels G, Reinach PS, et al. Characterization of transient receptor potential vanilloid channel 4 (TRPV4) in human corneal endothelial cells. *Exp Eye Res.* 2011;93(5):710-9.

## AGRADECIMIENTOS

Por el tiempo y esfuerzo que ha requerido este trabajo, merecen una mención a aquellas personas que han hecho posible que lo haya finalizado obteniendo un resultado del que personalmente me siento orgulloso y satisfecho.

Por lo tanto, incluyo en estos agradecimientos a mi tutora Sonia Santander Ballestín y a mi cotutor Ángel Luis García Otín, así como a los compañeros con los que he compartido laboratorio como Paula Gómara. Todos ellos me han enseñado a trabajar entre células, incubadoras, centrifugadoras y microscopios, y me han transmitido la importancia que supone la investigación en el avance de nuestra profesión.

Por último, quiero agradecer a mi familia el apoyo constante que he recibido hasta llegar a donde estoy hoy en día. Cualquier éxito que haya conseguido o pueda conseguir se debe a ellos en gran medida. A mis padres y a mi hermana, por encima de cualquier otra mención, les debo todo.

## Calculadora IC50

IC<sub>50</sub> representa la concentración a la que A ejerce sustancias medio de su efecto inhibitor máximo. Este valor se usa típicamente para caracterizar un antagonista de un proceso biológico (por ejemplo, fosforilación). En farmacología, es una medida importante de la potencia de un agente determinado. Tradicionalmente, este valor se expresa como concentración molar.

Esta calculadora genera un IC<sub>50</sub> valor típicamente pensado como la relación IC<sub>50</sub>. Para obtener asistencia técnica sobre el uso de esta calculadora, comuníquese con [websupport@aatbio.com](mailto:websupport@aatbio.com).

*Esta herramienta se ha actualizado recientemente. Para obtener la versión anterior de esta herramienta, haga clic [aquí](#).*

### Cómo utilizar esta herramienta

1. Pegue los datos experimentales en el cuadro de la derecha. Los datos se pueden copiar directamente de las columnas de Excel. Los datos también pueden ser valores separados por comas, tabuladores o separados por espacios. Si ingresa datos manualmente, solo ingrese una concentración por línea.

Las réplicas se pueden graficar simultáneamente. El gráfico generará barras de error basadas en el error estándar de la media (SEM). Simplemente pegue o ingrese todas las columnas de datos para comenzar. El formato debe ser el siguiente:

Concentración	Respuesta 1	Respuesta 2...	
C <sub>1</sub>	R1 <sub>1</sub>	R2 <sub>1</sub>	...
C <sub>2</sub>	R1 <sub>2</sub>	R2 <sub>2</sub>	...
C <sub>3</sub>	R1 <sub>3</sub>	R2 <sub>3</sub>	...
...	...	...	...

Los usuarios pueden representar gráficamente hasta tres conjuntos de datos en el mismo gráfico para fines de comparación. Para agregar un nuevo conjunto de datos, presione la pestaña "+" sobre el área de entrada de datos. Los conjuntos de datos se pueden renombrar haciendo doble clic en la pestaña. Cada conjunto de datos generará un correspondiente valor así como la ecuación para la línea de mejor ajuste.

2. Verifique que sus datos sean precisos en la tabla que aparece.

3. Presione el botón "Calcular" para mostrar los resultados, incluidos los cálculos y el gráfico.

### Entrada de datos

Datos 1	+
Pegue los datos aquí	

Procesar datos

La calculadora Quest Graph™ IC50 intenta modelar un conjunto experimental utilizando un modelo de regresión logística de cuatro parámetros, llamado así porque tiene cuatro parámetros clave en una ecuación de la forma:

$$Y = \text{Min} + \frac{\text{Máximo mínimo}}{1 + \left(\frac{X}{IC_{50}}\right)^{\text{Coeficiente de colina}}}$$

Este modelo generalmente se resuelve como una función sigmoidea o una curva en forma de "S". Para la promoción biológica, el coeficiente de Hill de la ecuación será (-) negativo, con la pendiente de la curva ascendente ("S"). Para la inhibición biológica, el coeficiente de Hill de la ecuación será (+) positivo, con la pendiente de la curva descendente ("∩").

Con respecto a IC50, la [función sigmoidea](#) en sí misma es un caso especial de la [distribución log-logística](#), que es parte de una familia más amplia de [distribuciones y funciones logísticas](#). Sin embargo, a diferencia de las distribuciones logísticas estándar, una distinción principal de esta calculadora es que no necesita la normalización previa de los datos, ni impone estos límites en el modelado de un conjunto experimental. Es decir, en una distribución logística estándar, los valores de respuesta (Y) van de 0 a 1 valores de probabilidad. Esto es típicamente lo que se ve en el análisis probit / logit y lo que se usa comúnmente al modelar las tasas de supervivencia de la población. En esta calculadora, los valores de respuesta pueden ser cualquier número real positivo, lo que puede resultar en modelos de regresión que no se adhieren a los límites de distribución logística de 0 a 1. Este es especialmente el caso cuando los controles de un conjunto experimental no aclaran los límites superior e inferior de los datos. En tales casos, no es raro generar un modelo de regresión que se extienda mucho hacia el eje Y negativo o aumente exponencialmente.

Debido a que los valores de respuesta negativa suelen ser incoherentes en contextos biológicos, a menudo es deseable restringir los modelos de regresión analíticos al dominio de respuesta positiva. Esto se puede lograr computacionalmente fijando el valor de respuesta mínimo en cero. Esto reduce el modelo logístico de cuatro parámetros a un modelo logístico de tres parámetros con la ecuación simplificada de la siguiente manera:

$$Y = \frac{\text{Max}}{1 + \left(\frac{X}{IC_{50}}\right)^{\text{Coeficiente de colina}}}$$

Con esta forma, el modelo de regresión tiene límites inferiores fijos en cero, eliminando cualquier modelo que de otra manera se podría extender al dominio de respuesta negativa.

Hay dos puntos finales que hacer sobre esta calculadora. La primera es que la curva logística de cuatro parámetros es un modelo de regresión simétrica alrededor del punto de inflexión, es decir, el IC<sub>50</sub>. En términos generales, esto implica que la forma de la función sigmoidea en un lado del punto de inflexión reflejará la del otro lado. Para modelar un conjunto experimental que es de naturaleza asimétrica, se requiere una curva logística de cinco parámetros. En segundo lugar, es inadecuado utilizar R<sup>2</sup> cuando se habla de la bondad de ajuste de un modelo de regresión de cuatro parámetros. Como se ha demostrado en varios trabajos, R<sup>2</sup> se puede utilizar cuando se describen modelos de regresión lineal, pero no logra captar el grado de ruido y la variabilidad en los modelos no lineales.