



UNIVERSIDAD DE CONCEPCION
FACULTAD DE FARMACIA
DEPARTAMENTO EN BIOQUÍMICA CLÍNICA E INMUNOLOGÍA

Efecto de la Producción Autocrina de Eritropoyetina en la Funcionalidad de Células Progenitoras Endoteliales Humanas

SARA GABRIELA VALDÉS HUERTA

**TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE MAGÍSTER EN BIOQUÍMICA CLÍNICA E
INMUNOLOGÍA**

Profesor Guía : Dra. Claudia Radojkovic Navarro

Profesor co-Guía : Dr. Jorge Roberto Toledo Alonso

Concepción, Mayo 2015

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	5
ÍNDICE DE TABLAS	8
ABREVIATURAS	9
RESUMEN	11
SUMMARY	12
INTRODUCCIÓN	13
Generalidades de la enfermedad cardiovascular	13
Células progenitoras endoteliales humanas (hEPC)	17
Factores que regulan el número y función de las hEPC	22
Vectores Virales	27
Tratamiento de ECV con hEPC modificadas genéticamente	30
Efectos de la eritropoyetina en las EPC	33
HIPÓTESIS	39
OBJETIVO GENERAL	39
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	39
METODOLOGÍA	40
Generación del vector lentiviral para Epo humana	40
Obtención del vector adenoviral para eritropoyetina humana	43
Aislamiento y cultivo de hEPC	45
Selección de la multiplicidad de infección	45

Expresión del receptor de eritropoyetina	46
Transducción de hEPC	47
Producción de eritropoyetina	47
Ensayo de proliferación	47
Ensayo de apoptosis	48
Citometría de flujo	50
Evaluación de marcadores de diferenciación	50
Ensayo de formación de vasos sanguíneos <i>in vivo</i>	53
Ensayo de formación de vasos sanguíneos <i>ex vivo</i>	54
Análisis estadísticos	55
RESULTADOS	56
Generación del vector lentiviral	56
<i>Clonamiento del vector lentiviral</i>	56
<i>Transfección de células HEK 293-FT para obtención de partículas virales</i>	61
Amplificación partículas adenovirales	61
Aislamiento y cultivo de hEPC	65
<i>Características morfológicas</i>	65
<i>Expresión de marcadores de diferenciación de hEPC</i>	65
<i>Expresión del receptor de eritropoyetina en hEPC</i>	70
Transducción de hEPC tempranas con los vectores virales	74
Expresión de eritropoyetina por hEPC transducidas con el vector adenoviral	77

Evaluación de la proliferación de hEPC transducidas con el vector adenoviral	77
Evaluación de la apoptosis en hEPC transducidas con el vector adenoviral	80
Evaluación genotípica de marcadores de diferenciación de hEPC	82
Determinación del potencial angiogénico de hEPC productoras de eritropoyetina humana	85
<i>Evaluación de la angiogénesis en membranas corioalantoídeas</i>	85
<i>Evaluación de la angiogénesis en anillos aórticos</i>	93
DISCUSIÓN	100
CONCLUSIONES Y PROYECCIONES	109
FINANCIAMIENTO	111
AGRADECIMIENTOS	112
BIBLIOGRAFÍA	113



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Formación de una lesión aterosclerótica.	16
Figura 2. Función fisiológica de las hEPC tempranas y tardías.	21
Figura 3. Cambios en los niveles de EPC, de acuerdo a la evolución de ECV.	26
Figura 4. Diagrama de la activación del receptor de eritropoyetina y su cascada de señalización en progenitores eritroides.	35
Figura 5. Efecto de eritropoyetina en el número y funcionalidad de hEPC.	37
Figura 6. Generación del vector lentiviral pLEpo-GFP.	41
Figura 7. Vector adenoviral AdEpo-GFP.	44
Figura 8. Cuantificación de la proliferación, mediante el reactivo Alamar Blue.	49
Figura 9. Amplificación por PCR convencional de hEpo desde pAdTrackEpo-CMV y digestión de p-TARGET, utilizando las enzimas <i>EcoRV</i> y <i>HpaI</i> .	57
Figura 10. Ensayo de restricción del plásmido p-TARGET y hEpo, utilizando las enzimas <i>XhoI</i> y <i>HpaI</i> .	58
Figura 11. Ensayo de restricción del vector pLCW-FSH-Lgl, utilizando las enzimas <i>XhoI</i> y <i>HpaI</i> .	59
Figura 12. Ensayo de restricción de pLEpo, utilizando las enzimas <i>XhoI</i> y <i>HpaI</i> .	60
Figura 13. Producción de lentivirus LEpo-GFP en células HEK 293-FT.	62
Figura 14. Verificación de la expresión de hEpo en medio de cultivo de células HEK 293-A transducidas con el lentivirus.	63
Figura 15. Producción de adenovirus AdEpo-GFP en células HEK 293-A.	64
Figura 16. Características morfológicas de las hEPC a distintos tiempos de cultivo.	66
Figura 17. Caracterización fenotípica de hEPC tempranas.	67

Figura 18. Distribución relativa de cada subpoblación de hEPC, según el tiempo de cultivo.	68
Figura 19. Detección de los marcadores de diferenciación CD34 y KDR en hEPC tempranas.	71
Figura 20. Comparación de marcadores de diferenciación en subpoblaciones de hEPC a través del tiempo.	72
Figura 21. Expresión de EpoR en hEPC tempranas.	73
Figura 22. Comparación de la transducción de hEPC tempranas con los vectores virales.	75
Figura 23. Determinación del MOI para el vector adenoviral. hEPC de 9 días transducidas con diferentes cantidades de partículas virales de AdEpo-GFP.	76
Figura 24. Expresión de hEpo por hEPC transducidas con adenovirus.	78
Figura 25. Efecto de la transducción con el vector adenoviral en la proliferación de hEPC.	79
Figura 26. Efecto de la transducción con el vector adenoviral sobre la apoptosis de hEPC.	81
Figura 27. Curvas de eficiencia de marcadores de diferenciación de hEPC.	83
Figura 28. Niveles de expresión de ARNm de marcadores de diferenciación de hEPC de 9 días.	84
Figura 29. Estandarización del ensayo de angiogénesis <i>in vivo</i> .	86
Figura 30. Cuantificación de la angiogénesis <i>in vivo</i> .	87
Figura 31. Evaluación de controles positivos, para los ensayos de angiogénesis <i>in vivo</i> .	89
Figura 32. Cuantificación de la angiogénesis <i>in vivo</i> , utilizando distintos controles positivos.	90
Figura 33. Evaluación del efecto de hEPC de 9 días transducidas en la angiogénesis <i>in vivo</i> .	91
Figura 34. Cuantificación del efecto de hEPC de 9 días transducidas en la angiogénesis <i>in vivo</i> .	92
Figura 35. Evaluación de moléculas angiogénicas, para los ensayos de angiogénesis <i>ex vivo</i> .	94

Figura 36. Cuantificación de la angiogénesis *ex vivo*, utilizando distintas moléculas angiogénicas. 95

Figura 37. Evaluación del efecto de medios condicionados sin concentrar, en la angiogénesis *ex vivo*. 96

Figura 38. Cuantificación del efecto de medios condicionados sin concentrar, en la angiogénesis *ex vivo*. 97

Figura 39. Evaluación del efecto de medios condicionados concentrados, en la angiogénesis *ex vivo*. 98

Figura 40. Cuantificación del efecto de medios condicionados concentrados, en la angiogénesis *ex vivo*. 99



ÍNDICE DE TABLAS

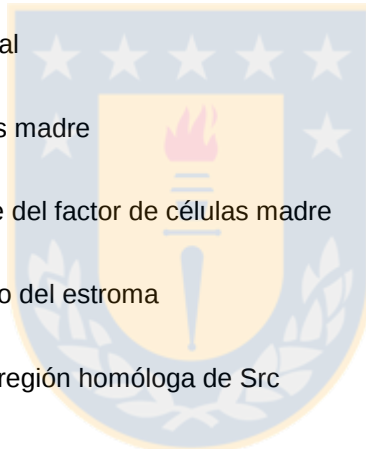
Tabla 1. Características de las EPC tempranas, EPC tardías y células endoteliales maduras.	20
Tabla 2. Efecto de factores de riesgo cardiovascular en el número y función de EPC.	25
Tabla 3. Comparación de características y propiedades de los vectores virales más empleados en terapia génica.	29
Tabla 4. Estudios de sobreexpresión de proteínas mediante el uso de vectores en EPC.	32
Tabla 5. Partidores utilizados para la detección de marcadores de diferenciación de hEPC.	52
Tabla 6. Equivalencia entre los porcentajes y número de eventos de las 4 subpoblaciones.	69



ABREVIATURAS

ADMA	: Dimetilarginina asimétrica
AdEpo	: Vector adenoviral que codifica el gen eritropoyetina
ARNm	: ARN mensajero
cDNA	: ADN complementario
CXCL-12	: Ligando 12 de quimioquina motivo C-X-C
dsDNA	: ADN de doble hebra
ECV	: Enfermedad cardiovascular
eNOS	: Sintasa de óxido nítrico endotelial
Epo	: Eritropoyetina
EpoR	: Receptor de eritropoyetina
FSC	: <i>Forward scatter</i> o complejidad celular
GFP	: Proteína fluorescente verde
GM-CSF	: Factor estimulante de colonia granulocito-monocito
HDL	: Lipoproteína de alta densidad
hEPC	: Células progenitoras endoteliales humanas
hEpo	: Eritropoyetina humana
HIF-1	: Factor inducible de hipoxia
IL-8	: Interleuquina 8
KDR	: Receptor 2 de VEGF
LDL	: Lipoproteína de baja densidad

LDLox	: LDL oxidada
LEpo	: Vector lentiviral que codifica para el gen eritropoyetina
MnSOD	: Manganeso superóxido-dismutasa
MOI	: Multiplicidad de infección
NO	: Óxido nítrico
PEI	: Polietilenimina
PI3K	: Fosfatidilinositol 3 kinasa
pLEpo	: Plásmido que contiene la información del gen eritropoyetina
SBF	: Suero bovino fetal
SCF	: Factor de células madre
SCF-sR	: Receptor soluble del factor de células madre
SDF-1	: Factor 1 derivado del estroma
SH2	: Dominio 2 de la región homóloga de Src
SSC	: <i>Side scatter</i> o tamaño celular
ssDNA	: ADN de hebra simple
ssRNA	: ARN de hebra simple
UFC	: Unidad formadora de colonia
VEGF	: Factor de crecimiento endotelio vascular



RESUMEN

Las enfermedades cardiovasculares (ECV) son la primera causa de muerte a nivel mundial, y una importante fuente de morbilidad y discapacidad. A pesar de los tratamientos para combatir ECV, su prevalencia sigue en aumento. Por ello, surge la necesidad de buscar nuevos blancos terapéuticos que mejoren las actuales estrategias de manejo de estos pacientes.

En este contexto, cobran relevancia los mecanismos de reparación endógena que posee el organismo, entre ellos, las células progenitoras endoteliales humanas (hEPC). Estas células, derivadas principalmente de precursores de la médula ósea, forman parte del *pool* de células mononucleares de sangre periférica, y pueden diferenciarse a células endoteliales maduras, participando de los procesos de reendotelización, neovascularización y restauración de la integridad de la función endotelial.

En pacientes con ECV, las hEPC se encuentran disminuidas en número y función, lo cual limita su capacidad para reparar injurias vasculares. Por ello, surge la oportunidad de conferir a las hEPC nuevas características o exacerbar alguna de sus funciones, con el propósito de hacerlas más resistentes. Esto se puede lograr a través de la terapia génica, utilizando vectores virales.

La eritropoyetina, además de su rol central en la regulación de la eritropoyesis, ejerce efectos positivos en el número y en parámetros de funcionalidad de hEPC. Sin embargo, su administración sistémica puede generar efectos secundarios no deseados en los pacientes.

El objetivo de este trabajo fue generar hEPC secretoras de eritropoyetina humana, mediante el uso de vectores virales, para su posible uso en terapia celular. Los resultados mostraron que hEPC tempranas pueden ser transducidas con adenovirus, sin afectar la proliferación, la apoptosis ni el grado de diferenciación de estas células. Las hEPC tempranas productoras de eritropoyetina producen un aumento significativo en la formación de vasos sanguíneos en dos modelos de angiogénesis: *in vivo*, en membranas corioalantoideas de huevos fecundados, y *ex vivo* en aortas de ratón.

Estos resultados aportan nuevos conocimientos sobre la fisiología y la funcionalidad de las hEPC, entregando nuevas herramientas para futuras terapias complementarias en el tratamiento de las ECV.

SUMMARY

Cardiovascular diseases (CVD) are the main cause of death in the world, and an important source of morbidity and mortality. Despite the treatments for CVD, its prevalence continues to rise. Therefore, it is necessary to find new therapeutic targets to improve current strategies for the management of patients with CVD.

In this context, endogenous repair mechanisms become relevant, *i.e.* human endothelial progenitor cells (hEPC). These cells, that are mainly derived from the bone marrow precursors, are found in the pool of peripheral blood mononuclear cells and can differentiate into mature endothelial cells, participating in processes of re-endothelialization, neovascularization and endothelial function recovery.

In patients with CVD, the number and function of hEPC is decreased, which limits their ability to repair vascular injuries. Therefore, the opportunity to confer hEPC new features or to improve any of their functions, in order to make them more resistant. This can be achieved through gene therapy using viral vectors.

Beside its central role in the control of erythropoiesis, erythropoietin exerts positive effects on the number of circulating hEPC as well as on parameters of their functionality. However, systemic administration of erythropoietin can generate unwanted side effects in patients.

The aim of this study was to generate human erythropoietin secreting hEPC, using viral vectors, for its possible use in cellular therapy. The results showed that early hEPC can be transduced with an adenovirus without affecting proliferation, apoptosis neither the differentiation state of these cells. Erythropoietin secreting hEPC generate a significant increase in blood vessel formation in two angiogenesis models: *in vivo*, in chorioallantoic membrane of fertilized eggs, and *ex vivo* mouse aortic rings.

These results provide new insights into the physiology and functionality of hEPC, which can contribute to new tools for future complementary therapies for the treatment of CVD.

INTRODUCCIÓN

Generalidades de la enfermedad cardiovascular

Las enfermedades cardiovasculares (ECV) constituyen la primera causa de muerte y una importante fuente de morbilidad y discapacidad a nivel mundial [1]. En el año 2008, 17,3 millones de personas fallecieron en el mundo por esta causa, lo cual representa un 30% de todas las muertes registradas ese año. De ellas, 7,3 millones (42,2%) se debieron a cardiopatía coronaria, y 6,2 millones (35,8%) a accidentes cerebrovasculares [1]. Las muertes por ECV afectan por igual a ambos sexos, y más del 80% se producen en países de ingresos bajos y medios. Se estima que en el año 2030 morirán cerca de 25 millones de personas por ECV en el mundo, y se prevé que estas patologías continuarán siendo la principal causa de muerte [1].

En Chile, la realidad es similar al contexto mundial. En el año 2011, un 27,1% de todas las muertes nacionales fue resultado de esta enfermedad [2]. Los principales orígenes de la mortalidad cardiovascular son las enfermedades cerebrovasculares e isquémicas del corazón, con 8.736 y 7.197 defunciones, correspondientes a un 34% y 28% de las muertes cardiovasculares respectivamente, ese mismo año [2].

En los Objetivos Sanitarios de Chile para la década 2000-2010, se formuló como meta reducir la mortalidad por ECV, enfermedades isquémicas y cerebrovasculares en un 18%, 30% y 27%, respectivamente [3]. En la evaluación del año 2005, se observó un cumplimiento parcial de las metas, con un grado de avance mayor para el conjunto de las ECV (44%), un 30% para las enfermedades isquémicas y un 27% para las cerebrovasculares [3]. Para la década 2011-2020, la Estrategia Nacional de Salud tiene como meta aumentar en 10% la sobrevida luego de un infarto agudo al miocardio y 10% post-accidente cerebro vascular, ambas proyectadas al primer año [3].

Las ECV engloban todo tipo de enfermedades relacionadas con el corazón y los vasos sanguíneos [1]. Dentro de ellas podemos encontrar las siguientes enfermedades:

- *Cardiopatía coronaria*, afección de los vasos sanguíneos que irrigan el músculo cardíaco (miocardio).
- *Accidentes cerebrovasculares*, enfermedades de los vasos sanguíneos que irrigan el cerebro.
- *Arteriopatías periféricas*, patologías de los vasos sanguíneos que irrigan los miembros superiores e inferiores.
- *Cardiopatía reumática*, lesiones del miocardio y de las válvulas cardíacas debidas a la fiebre reumática.
- *Cardiopatías congénitas*, malformaciones del corazón presentes desde el nacimiento.
- *Trombosis venosas profundas y embolias pulmonares*, coágulos de sangre (trombos) en las venas de las piernas, que pueden desprenderse (émbolos) y alojarse en los vasos del corazón y los pulmones.

El infarto agudo al miocardio y los accidentes cerebro vasculares suelen ser fenómenos agudos que se deben principalmente a una obstrucción que impide el flujo sanguíneo hacia el corazón o el cerebro. La causa más frecuente es la oclusión aguda trombótica por causa de depósitos de grasa en las paredes de los vasos sanguíneos de forma crónica, proceso conocido como **aterosclerosis**. Sin embargo, los accidentes cerebro vasculares también pueden deberse a hemorragias de los vasos cerebrales o a coágulos de sangre [1].

La aterosclerosis es una enfermedad inflamatoria crónica que comienza a temprana edad con la disfunción del endotelio, monocapa de células endoteliales que recubre el interior de los vasos sanguíneos [4]. Esta disfunción, que se relaciona con injurias crónicas, determina un aumento de la permeabilidad endotelial y con ello un incremento en el paso y depósito de lípidos en el espacio sub-endotelial, en particular aquél transportado por las lipoproteínas de baja densidad (LDL) [5]. Esta etapa inicialmente es reversible, pero es perpetuada en el tiempo por la instauración de un proceso inflamatorio, el cual es favorecido por el exceso de lípidos en el espacio sub-endotelial [6]. Las enzimas presentes en la pared de los vasos sanguíneos y los radicales libres generados por el metabolismo celular, pueden actuar sobre los lípidos de las LDL,

generando LDL oxidadas (LDLox), las cuales constituyen una señal inflamatoria tanto para el endotelio como para el organismo en general [6]. La activación del endotelio gatilla la sobreexpresión de moléculas de adhesión que favorecen el reclutamiento de células inflamatorias, como monocitos, neutrófilos y linfocitos, hacia la pared del vaso sanguíneo. En el sub-endotelio, los monocitos se diferencian a macrófagos, los cuales son capaces de fagocitar las LDLox [7]. Dado que estas células carecen de mecanismos de regulación para la captación de LDLox, el exceso de lípidos intracelular las convierte en células espuma, muy activas en el proceso inflamatorio [8]. La apoptosis y/o necrosis de las células espuma genera un núcleo necrótico en el espacio sub-endotelial que, junto con el reclutamiento de las células musculares lisas y el depósito de matriz, forman la placa aterosclerótica [4]. La reducción progresiva del lumen del vaso sanguíneo afectado por las placas de ateroma deriva en isquemia del órgano. Sin embargo, la erosión o ruptura de la placa ateromatosa gatilla un fenómeno trombótico agudo, el cual puede culminar en un infarto agudo al miocardio o un accidente cerebro vascular [9] (Figura 1).

De acuerdo a lo mencionado anteriormente, resulta crítica la mantención de la integridad física y funcional del endotelio para prevenir el inicio y/o progresión del proceso ateromatoso. Es por ello, que el propio organismo posee mecanismos endógenos de reparación entre los cuales se encuentran las células progenitoras endoteliales humanas (hEPC).

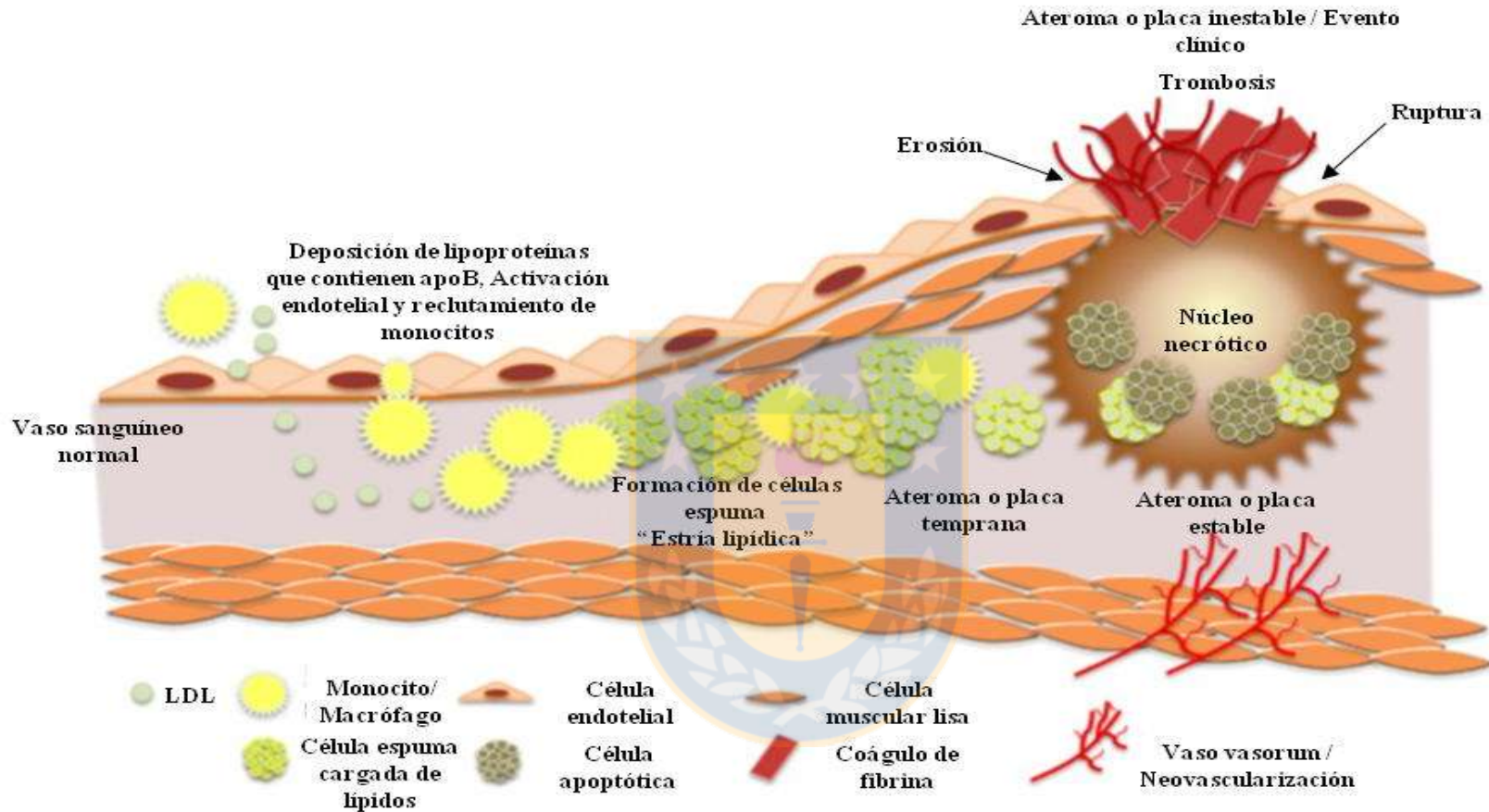


Figura 1. Formación de una lesión aterosclerótica. El desarrollo de la formación de la placa ateromatosa comienza con cambios en la permeabilidad endotelial y la composición de la matriz celular bajo el endotelio, debido a estímulos negativos como dislipidemias, hipertensión o mediadores inflamatorios. Estos cambios promueven la entrada y retención de las LDL en la pared del vaso, las cuales pueden sufrir cambios bioquímicos (LDLox) que permiten la adhesión de monocitos. La LDLox es endocitada por los macrófagos derivados de los monocitos, lo que lleva a la acumulación del colesterol intracelular, generando células espuma. En paralelo, las células musculares lisas proliferan y migran, recubriendo al ateroma. Debido a la muerte de las células espuma, se promueve la acumulación de lípidos, formando el núcleo necrótico de la placa, el cual disminuye el lumen del vaso sanguíneo. La cronicidad de este proceso puede generar una placa ateromatosa inestable o el desarrollo de un evento clínico. *Modificado de Rhee y col., 2013 [9]*

Células progenitoras endoteliales humanas (hEPC)

Las hEPC conforman un *pool* de células pluripotenciales, que pueden ser recuperadas desde sangre periférica, médula ósea u otras fuentes. Asahara y col. en el año 1997, proporcionaron la primera evidencia de la existencia de hEPC, mediante el aislamiento de angioblastos desde sangre periférica de humanos adultos, los cuales se diferenciaron *in vitro* a células endoteliales [10]. Las hEPC constituyen sólo entre 1-5% del total de células de médula ósea y entre 0,0001-0,01% del total de células mononucleares de sangre periférica [11]. A diferencia de estas últimas, las hEPC muestran la capacidad de adherirse a superficies recubiertas con fibronectina en presencia de un medio de cultivo suplementado con factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF) [10].

Desde que Asahara y col. describen por primera vez a las hEPC, se han documentado 4 orígenes para estas células, los cuales forman el *pool* circulante de hEPC. Éstos se enumeran a continuación [12, 13]:

- *Células madres hematopoyéticas derivadas de médula ósea*, las cuales se pueden diferenciar directamente a EPC a través del hemangioblasto, o dar origen a un precursor mieloide o célula mieloide capaz de transdiferenciarse a EPC.
- *Células madres derivadas de médula ósea*, entre las que destacan las células mesenquimales y otros progenitores diferentes de células madres hematopoyéticas.
- *Células madres tejido-residente no derivadas de médula ósea*, población de células que se encuentran en tejidos específicos, como cardíaco, adiposo o incluso en la pared de los vasos sanguíneos, denominadas “células progenitoras vasculares residentes” [14, 15].
- *Células endoteliales maduras circulantes*, las cuales se desprenden directamente de la monocapa de células endoteliales que conforman los vasos sanguíneos.

En condiciones normales, las células madres hematopoyéticas se encuentran mayormente en médula ósea, en estado quiescente, asociadas a las células estromales [14]. Cuando se generan estímulos, como hipoxia o injuria endotelial, se libera el factor 1 inducible de hipoxia (HIF-

1) y eritropoyetina, así como los factores VEGF, factor 1 de crecimiento derivado de células estromales (SDF-1) / ligando 12 de quimioquina motivo C-X-C (CXCL-12), y factor estimulante de colonia granulocito-monocito (GM-CSF) [16, 17]. Estas moléculas alcanzan la médula ósea, donde generan la activación de proteinasas, como elastasa, catepsina G y metaloproteinasa de matriz, las cuales clivan la matriz extracelular y/o las moléculas de adhesión (mKitL / c-kit) que mantienen unidos a los precursores inmaduros de hEPC a las células estromales, permitiendo su movilización hacia sangre periférica [14]. Bajo un microambiente propicio, precursores mieloides o monocitos provenientes desde células madres hematopoyéticas pueden transdiferenciarse a hEPC, aportando al *pool* de hEPC de sangre periférica [12].

A pesar de los distintos orígenes de las hEPC, esta población en su conjunto favorece la reendotelización, es decir, la reparación de endotelios, y la neovascularización o formación de nuevos vasos sanguíneos. Ambos procesos están involucrados en la restauración de la integridad de la función endotelial y vascular [14, 15].

Caracterización de las subpoblaciones de hEPC

In vitro, las hEPC se dividen en dos subpoblaciones, denominadas hEPC tempranas y hEPC tardías. Las **hEPC tempranas** se encuentran en cultivo desde los 3 a los 7 días, tiempo durante el cual proliferan y se transforman gradualmente en **hEPC tardías** alrededor de los 14 a 21 días de cultivo [18]. Se ha descrito que ambas subpoblaciones derivan del *pool* de células mononucleares, sin embargo, se diferencian fenotípica y funcionalmente [18, 19]. Así, las hEPC tempranas expresan en su superficie los marcadores CD45⁺ ⁽¹⁾, CD133⁺⁺ ⁽²⁾ y CD34⁺⁺ ⁽³⁾ que le otorgan las características de célula aún inmadura, además de KDR⁺⁺⁽⁴⁾ y CD31⁺⁽⁵⁾, en menor proporción, que muestran el proceso de diferenciación hacia el fenotipo endotelial [14]. Por otro lado, las hEPC tardías expresan los marcadores CD34⁺, KDR⁺⁺, CD31⁺⁺, CD62-E⁺⁺ ⁽⁶⁾, VE-

¹CD45: proteína tirosina fosfatasa, marcador de superficie de células indiferenciadas.

²CD133: glicoproteína de superficie de células indiferenciadas.

³CD34: molécula de adhesión intercelular, marcador de superficie de células indiferenciadas.

⁴KDR: receptor 2 del factor de crecimiento endotelio vascular.

⁵CD31 / PECAM: molécula de adhesión célula endotelial-plaqueta.

⁶CD62 / E-selectina: molécula de adhesión, media la adhesión entre linfocitos y endotelio.

CADERINA^{++ (7)}, WF^{++ (8)} y eNOS^{++ (9)}, todos los cuales indican mayor semejanza con células endoteliales maduras [14, 17, 19]. Funcionalmente, se ha descrito que las hEPC tempranas tienen baja capacidad de formar estructuras tipo vasos sanguíneos y alta capacidad de secretar citoquinas angiogénicas, como VEGF e interleuquina 8 (IL-8), las cuales actúan sobre las propias hEPC tempranas, hEPC tardías y células endoteliales, por lo que han sido denominadas “células angiogénicas circulantes” [17, 19, 20]. Por el contrario, las hEPC tardías, también denominadas “células endoteliales en expansión”, tienen alta capacidad de formar estructuras tipo vasos sanguíneos, debido a una alta tasa proliferativa y adhesión a monocapas de células endoteliales, lo que contribuye a la reparación de endotelios [17, 19, 20] (Tabla 1). Dadas estas características, se ha propuesto que *in vivo* las hEPC tempranas contribuyen a la neovascularización y a la reparación de endotelios, mediante la secreción de citoquinas angiogénicas, las cuales favorecerían el reclutamiento, proliferación y supervivencia de hEPC, realizando un rol de soporte trófico para la reparación endógena del endotelio, mientras las hEPC tardías participarían en estos procesos a través de su alta capacidad proliferativa y su posterior diferenciación y remplazo de células endoteliales maduras [20-22]. Además, los factores liberados por las hEPC circulantes potenciarían tanto la diferenciación de las hEPC residentes en la pared del vaso sanguíneo como la funcionalidad de las células endoteliales maduras, todo lo cual favorece la reparación endotelial [23] (Figura 2).

⁷VE-CADERINA: glicoproteína de unión intercelular, regula la permeabilidad del endotelio.

⁸WF: factor de von Willebrand.

⁹eNOS: sintasa de óxido nítrico endotelial.

Tabla 1. Características de las EPC tempranas, EPC tardías y células endoteliales maduras. *Modificado de Liu y col., 2009 [20]; Sen y col., 2011 [17].*

Características	EPC temprana	EPC tardía	Célula endotelial madura
Tiempo de cultivo	3 a 7 días	14 a 21 días	-
Morfología	Células redondeadas, población heterogénea	Células alargadas (empedrado), población homogénea	Células alargadas, pierden su función con múltiples pasajes
Marcadores de superficie	CD45 ⁺ , CD133 ⁺⁺ , CD34 ⁺⁺ , KDR ⁺⁺ , CD31 ⁺	CD34 ⁺ , KDR ⁺⁺ , CD31 ⁺⁺ , CD62-E ⁺⁺ , VE-CADERINA ⁺⁺ , WF ⁺⁺ , eNOS ⁺⁺	KDR ⁺⁺ , CD31 ⁺⁺ , CD62-E ⁺⁺ , VE-CADERINA ⁺⁺ , WF ⁺⁺ , eNOS ⁺⁺
Capacidad proliferativa	Baja	Alta	Baja
Captación de LDL acetilada	Sí	Sí	Sí
Formación de estructuras tubulares	Capacitada	Altamente capacitada	Capacitada
Migración	Capacitada	Capacitada	Capacitada
Neovascularización	Baja capacidad	Capacitada	Incapacitada
Adhesión a vasos existentes	Capacitada	Altamente capacitada	Incapacitada
Mejora de función endotelial existente	Capacitada	Capacitada	Incapacitada

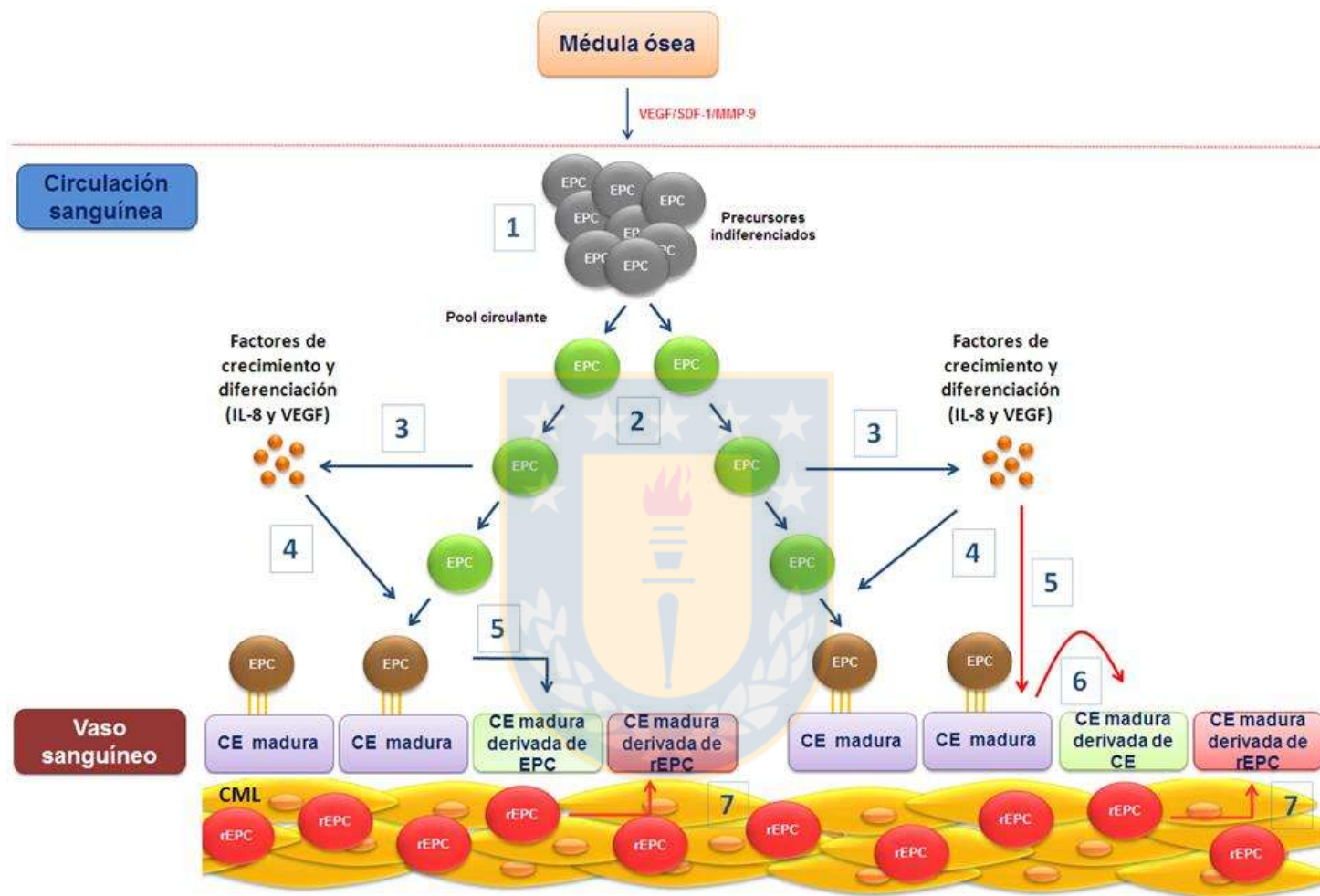


Figura 2. Función fisiológica de las hEPC tempranas y tardías. (1) Los progenitores inmaduros de EPC derivadas de médula ósea (gris) conforman un *pool* en circulación sanguínea, el cual da origen a las EPC tempranas (verde) (2). Esta células secretan factores de crecimiento y citoquinas (3) que promueven la diferenciación de EPC tempranas hacia EPC tardías (café) (4), la diferenciación de EPC tardías a células endoteliales maduras (CE) (5), y la proliferación de CE (6). Además, las EPC residentes (rEPC) en la capa muscular del vaso sanguíneo, pueden diferenciarse a CE madura en respuesta a los factores liberados por las EPC tempranas (7). (CML: célula muscular lisa). *Modificado de Lenk y col., 2011 [24].*

Factores que regulan el número y función de las hEPC

Diversos antecedentes muestran la existencia de factores deletéreos y potenciadores de la cantidad y de la funcionalidad de las hEPC. Entre los primeros destacan la edad [25, 26], el tabaquismo [27, 28], la presencia de factores de riesgo cardiovascular [27, 29], entre otros; mientras el ejercicio físico [30, 31], altos niveles de estrógenos [32, 33] y lipoproteínas de alta densidad (HDL) [34, 35] son factores protectores del número y funcionalidad de hEPC. Estos factores, a su vez, pueden ser clasificados en modificables y no modificables, y en agudos o crónicos, según el tiempo de presentación en un individuo.

Los factores de riesgo y de protección de las EPC interactúan entre sí. Por ejemplo, un estudio realizado por Xia y col. demuestra la interdependencia entre edad y ejercicio físico. Para ello, trabajaron con pacientes jóvenes ($26,3 \pm 3,15$ años) y ancianos ($67,8 \pm 3,38$ años) de sexo masculino, sin evidencias clínicas de factores de riesgo cardiovascular y sin tratamiento farmacológico. Todos los individuos fueron sometidos a una rutina consistente en 30 minutos diarios de ejercicio, 3 veces por semana, por un periodo de 3 meses. De cada individuo, se aisló hEPC al inicio y al final del estudio. Al comparar sujetos jóvenes con ancianos se observó que tanto el porcentaje de células $CD34^+ / KDR^+$ como la capacidad de reendotelización de las hEPC fue significativamente menor en los ancianos, verificando el efecto negativo de la edad sobre estos parámetros. Sin embargo, luego de las 12 semanas de ejercicio, se observó un aumento significativo en el porcentaje de células $CD34^+ / KDR^+$ y en la capacidad de reendotelización de hEPC en los ancianos, siendo ambos comparables a los valores encontrados en los jóvenes antes de iniciar la rutina de ejercicios [30].

En sujetos con isquemia aguda o en un estadio temprano de injuria endotelial, el número de hEPC aumenta en circulación, como mecanismo de reparación endógeno (Figura 3). Ejemplo de esto es el estudio realizado por Massa y col., en el cual se evaluó el número y función de hEPC en sujetos con infarto agudo de miocardio, con angina estable y en controles no infartados. En los pacientes infartados, se observó un aumento significativo de las subpoblaciones $CD34^+ / CD133^+ /$

VEGFR2⁺ y CD34⁺ / VEGFR2⁺ inmediatamente después del evento cardiovascular. En el transcurso del tiempo, estos valores disminuyeron, siendo comparables en el día 60 post-infarto con los sujetos no infartados y con aquéllos con angina estable. Los hallazgos en los pacientes infartados se asociaron a un incremento significativo de las unidades formadoras de colonias de hEPC, las cuales disminuyeron significativamente 24 h y 7 días post-infarto, y el número de células CD34⁺ / VEGFR2⁺ circulantes se correlacionó significativamente con los niveles de VEGF ($R=0,57$, $p<0,04$) [36]. De manera similar, un estudio realizado por Głowińska-Olszewska y *col.* en niños con diabetes mellitus tipo 1 demuestra que existe un aumento en la frecuencia de las hEPC en circulación sanguínea (10% aprox.), específicamente de los fenotipos CD34⁺ / VE-caderina⁺ y CD34⁺ / VEGFR2⁺, lo cual se correlaciona con una función endotelial deteriorada, evidenciada por mediciones de ultrasonografía, de dilatación mediada por flujo y espesor íntima / media. Estos resultados, argumentan los autores, demostrarían que en sujetos jóvenes que mantienen en óptimas condiciones los mecanismos de reparación endotelial, existe una movilización efectiva de hEPC, en respuesta a factores de riesgo cardiovascular, como la diabetes mellitus [37].

Por el contrario, tanto los factores de riesgo cardiovascular como la propia ECV disminuyen el número y la funcionalidad de las hEPC en sujetos adultos (Tabla 2, Figura 3). A este respecto, Schmidt-Lucke y *col.* demostraron que el número de células CD45^{dim} / CD34⁺ / KDR⁺ es significativamente menor en los pacientes con enfermedad arterial coronaria estable o con síndrome coronario agudo, comparado con sujetos control. Además, la población de células CD45^{dim} / CD34⁺ / KDR⁺ se correlacionó inversamente con el número de factores de riesgo ($r = -0,35$, $p<0,001$), incluso después de la corrección por el estado de la ECV (estable o aguda) y por el número de coronarias con procesos ateromatosos [38]. Esto demuestra que en sujetos con factores de riesgo cardiovascular crónicos o con ECV establecida, el grado de disminución de hEPC se relaciona directamente con la progresión de la condición.

Por otro lado, Jialal y *col.* demostraron que tanto el número de células CD34⁺ / KDR⁺ como el número de unidades formadoras de colonias de hEPC era significativamente menor en sujetos con síndrome metabólico comparados con sujetos control, además de presentar una tendencia a la

disminución en su capacidad migratoria en respuesta a VEGF y una disminución significativa de la formación de estructuras tubulares *in vitro* [39].

Otro estudio realizado por Westerweel y *col.* mostraron que sujetos obesos con síndrome metabólico presentan una disminución significativa del número de células CD34⁺ / KDR⁺, en comparación con sujetos control (331 ± 193 v/s 543 ± 164 células/mL sangre, $p < 0.006$). También se observó que existe una relación entre los bajos niveles circulantes de hEPC con el número de componentes del síndrome metabólico presentes en los sujetos obesos. En cuanto a la movilización de las hEPC, se evaluaron los niveles séricos de VEGF, factor de células madre (SCF) y del receptor soluble de SCF (SCF-sR) en los individuos obesos con síndrome metabólico. Se encontró una tendencia a la disminución de los niveles de VEGF y una disminución significativa, tanto de los niveles de SCF (1.013 ± 151 v/s 1.162 ± 210 pg/mL, $p < 0,04$) como de los niveles de SCF-sR (53 ± 8 v/s 63 ± 9 ng/mL; $p < 0.003$), con respecto a los sujetos control. La disminución de VEGF y SCF-sR se relaciona significativamente con los niveles de hEPC circulantes [40].

El conjunto de resultados sugieren que las hEPC constituyen un elemento fisiológico de reparación, primordial para el funcionamiento del endotelio vascular. Su número y función se ven alteradas en presencia de factores de riesgo y de ECV, principalmente en sujetos adultos, en condiciones de cronicidad. Dado lo anterior, surge la necesidad de generar estrategias para conferir a las hEPC características nuevas o exacerbar alguna de sus particularidades, con el propósito de potenciar su función en medios desfavorables, como es el caso de pacientes con factores de riesgo cardiovascular o con ECV establecida.

Tabla 2. Efecto de factores de riesgo cardiovascular en el número y función de EPC.
Modificado de Siddique y col., 2010 [41].

Factor de riesgo cardiovascular	Efecto o relación	Referencia
Hipercolesterolemia	↓ el número de EPC, deteriora la capacidad migratoria de EPC	Vasa y col., 2001 [27] Chen y col., 2004 [42]
Diabetes Mellitus	↓ el número de EPC, deteriora la capacidad migratoria de EPC	Tepper y col., 2002 [43] Li y col., 2006 [44]
Hipertensión	Relación inversa entre el número de EPC y la presión sanguínea sistólica	Vasa y col., 2001 [27] Shantsila y col., 2008 [45]
Tabaquismo	Afecta negativamente el número de EPC	Kondo y col., 2004 [28] Shantsila y col., 2007 [46] Shantsila y col., 2007 [47]

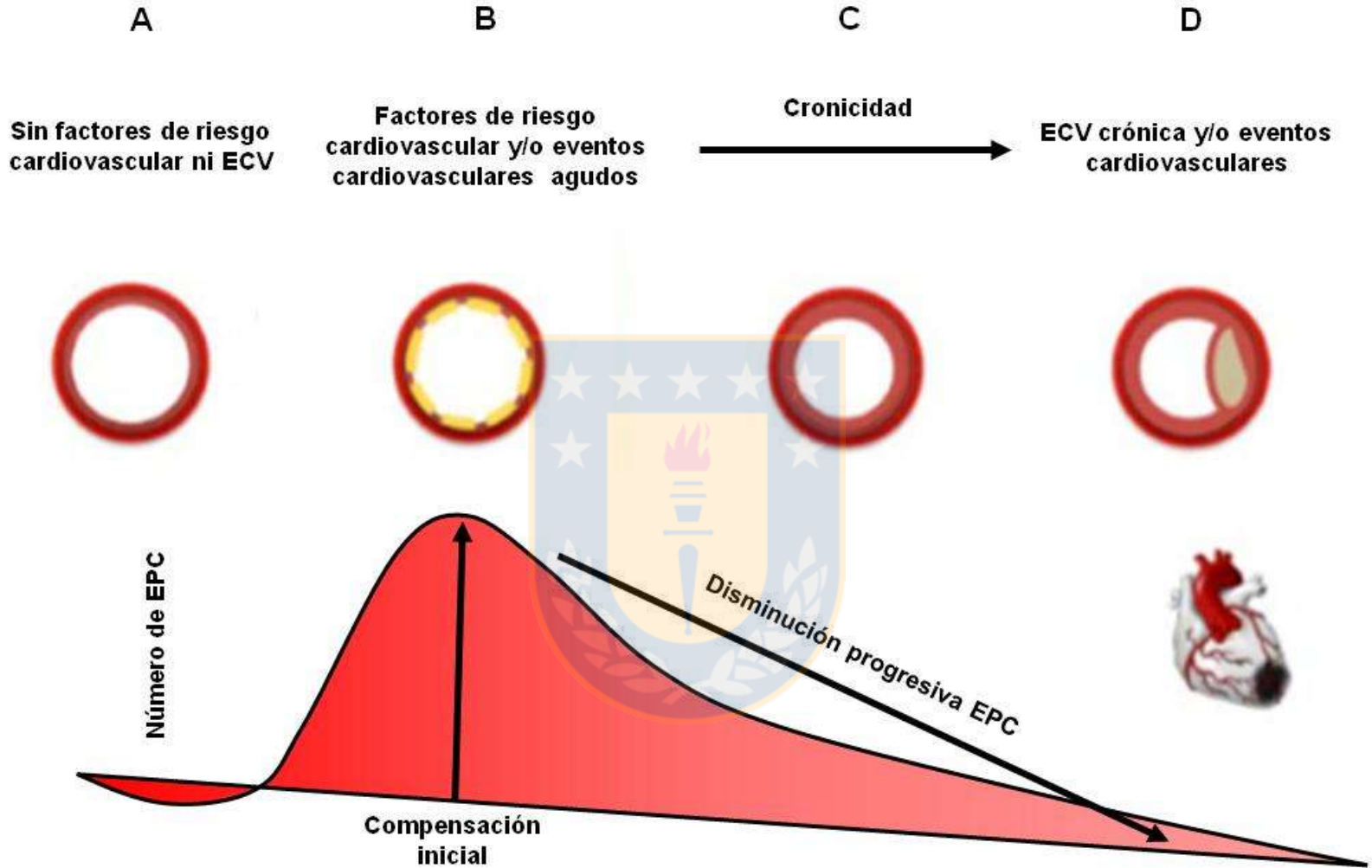


Figura 3. Cambios en los niveles de EPC, de acuerdo a la evolución de ECV. Un sujeto en condiciones normales presenta una cantidad fisiológica de EPC en circulación (A). Sin embargo, los factores de riesgo cardiovascular o el desarrollo de un evento cardiovascular agudo genera un aumento de los niveles de EPC, como una medida de reparación del endotelio disfuncional (B). Si los factores de riesgo cardiovascular se vuelven crónicos, disminuyen progresivamente las EPC, mientras aumenta el tamaño de la íntima-media (C), desencadenando una ECV crónica o un evento cardiovascular, debido a una obstrucción del lumen de vaso sanguíneo (D). *Modificado de Gutiérrez-Grobe y col., 2013 [48].*

Vectores Virales

Una estrategia para otorgar características especiales a las hEPC o exacerbar una función propia, que les permitan realizar su función biológica de manera más eficiente, es el uso de herramientas de biología molecular, como la **terapia génica**. Esta técnica consiste en la inserción de ácidos nucleicos en el interior de células diana para generar un cambio funcional que se traduzca en un efecto terapéutico. La transferencia de material genético exógeno puede realizarse empleando diferentes métodos, incluyendo la utilización de un vehículo o vector que facilita la introducción de los ácidos nucleicos [49, 50]. Es por ello, que se necesitan sistemas de transferencia capaces de internalizar la secuencia de interés en las células diana, con un alto rendimiento y por un período de tiempo adecuado que permita lograr efectos terapéuticos. Actualmente, los vectores virales son usados en más del 70% de los ensayos clínicos [51, 52], ya que cumplen con varios de los requisitos de un vector ideal [53], los cuales se enumeran a continuación:

1. Capacidad para transportar material genético de gran tamaño y protegerlo de su degradación antes de alcanzar la célula diana.
2. Alta eficiencia de internalización y transferencia del material genético.
3. Expresión alta, eficaz, estable y regulada del transgen.
4. Especificidad para el tipo celular o tejido diana.
5. Expresión específica del transgen en el tipo celular o tejido diana.
6. Baja o nula inmunogenicidad.
7. Baja toxicidad intrínseca.
8. Facilidad de manipulación y producción.
9. Alto grado de seguridad biológica, tanto para el paciente como para el entorno.
10. Bajo costo de producción.

La transferencia de un gen de interés mediante el empleo de un vector viral se le denomina **transducción** [52, 54].

Existen distintos tipos de vectores virales, sin embargo, los más utilizados se desarrollaron a partir de retrovirus, lentivirus, adenovirus y virus adeno-asociado. El uso de estos vectores se ha implementado debido a la amplia caracterización de su genoma, estructura, potencial de infectividad, factibilidad de producción, entre otras propiedades (Tabla 3).

Para la generación de un vector viral, es necesario remover una parte o todos los genes virales implicados en la replicación en el huésped, a fin de eliminar riesgos de patogenicidad y crear el espacio necesario en el genoma viral para insertar la información de interés [52, 54, 55].

Así como este tipo de vectores virales poseen características y propiedades que les otorgan ventajas por sobre otros sistemas de transferencia, también posee ciertas desventajas. En el caso de los retrovirus la integración en el genoma del huésped es aleatoria, presentando un riesgo de mutagénesis insercional debido a la posibilidad de alterar un gen maestro, o un gen supresor de tumor, interrumpiendo su expresión o, por el contrario, que se inserte en un proto-oncogén induciendo su activación [56]. También, se debe considerar que este tipo de vector sólo es capaz de transducir células en división [57, 58]. El lentivirus tiene como principales desventajas generar mutagénesis insercional, y en su producción se obtiene bajo título viral, aumentando el costo de su aplicación clínica [59, 60]. En cuanto al adenovirus, éste se incluye en la célula de forma estable sin afectar al genoma del huésped, limitando la expresión del transgen a un periodo de 7-14 días [61]. Si se pensara en una re-transducción, mediante terapia génica *in vivo*, el sistema deja de ser eficiente debido a que desarrolla respuesta inmunitaria humoral y celular [61]. Finalmente, los virus adeno-asociados presentan una baja capacidad de transportar genes de gran tamaño (>4,7 kb) [62]. Sin embargo, la mayor ventaja de estos sistemas es la eficiencia en la transducción en comparación con los sistemas no virales, lo cual genera un gran interés para utilizarlos en terapia génica.

Tabla 3. Comparación de características y propiedades de los vectores virales más empleados en terapia génica. Modificado de Sen y col., 2014 [57]; Lentz y col., 2012 [58].
AAV: Virus adeno-asociado, ssRNA: ARN de hebra simple, dsDNA: ADN de doble hebra, ssDNA: ADN de hebra simple.

Características y propiedades	Retrovirus	Lentivirus	Adenovirus	AAV
Familia	<i>Retroviridae</i>	<i>Retroviridae</i>	<i>Adenoviridae</i>	<i>Parvoviridae</i>
Cápside	Icosahédrica	Icosahédrica	Icosahédrica	Icosahédrica
Diámetro virión	80-130 nm	80-130 nm	70-90 nm	18-26 nm
Tamaño genoma viral	3-9 kb	3-9 kb	38-39 kb	5 kb
Genoma	ssRNA (+)	ssRNA (+)	dsDNA	ssDNA
Tropismo de infección	Células en división	Células en división y quiescentes	Células en división y quiescentes	Células en división y quiescentes
Interacción con genoma de huésped	Integración aleatoria	Integración aleatoria	No se integra	Integración específica
Expresión del transgen	Estable en el tiempo	Estable en el tiempo	Transitoria (7-14 días)	Estable en el tiempo
Capacidad de empaquetamiento	< 4-5 kb	8-9 kb	5-8 kb	4-5 kb
Inmunogenicidad	Mínima	Mínima	Alta	Mínima
Títulos de producción	10^5 - 10^7	10^2 - 10^{10}	10^{11} - 10^{14}	10^9 - 10^{13}

Tratamiento de ECV con hEPC modificadas genéticamente

En base a lo expuesto, se han realizado estudios utilizando sistemas de entrega de información genética virales para la expresión de moléculas que favorecen la funcionalidad de las EPC (Tabla 4), resaltando el efecto de esta herramienta en la reparación vascular, tanto en la disfunción endotelial como en etapas avanzadas de la ECV.

En este contexto, en el año 2011, Cui y *col.* realizaron un estudio para determinar si la transferencia del gen que codifica para la eNOS en las EPC potencia la proliferación y la producción de óxido nítrico (NO) por estas células y si esta estrategia reduce la hiperplasia de la neoíntima y la estenosis en la arteria carótida izquierda dañada. Para ello, se utilizó ratas machos Sprague–Dawley, desde las cuales se aislaron las EPC de médula ósea. Las EPC de 7 días de cultivo fueron transducidas, ya sea con un vector retroviral asociado a la proteína fluorescente verde (GFP) (GFP-EPC) o con el vector retroviral que expresaba eNOS humana (eNOS-EPC). Además, se consideró un grupo control de EPC no transducidas (EPC). Al cabo de 3 días, se realizaron ensayos *in vitro* para evaluar la proliferación y la producción de NO. Los resultados mostraron un aumento significativo de la proliferación en las células eNOS-EPC comparado con GFP-EPC ($0,58 \pm 0,02$ v/s $0,37 \pm 0,01$, $p < 0,05$) y EPC ($0,58 \pm 0,02$ v/s $0,36 \pm 0,01$, $p < 0,05$). La proliferación de las células eNOS-EPC dependía parcialmente de la síntesis de NO, como fue confirmado al bloquear la actividad de la eNOS con el competidor dimetilarginina asimétrica (ADMA). Con respecto a la producción de NO, ésta fue mayor en las células eNOS-EPC en comparación con GFP-EPC ($68,32 \pm 1,46$ v/s $36,22 \pm 1,51$, $p < 0,05$) y EPC ($68,32 \pm 1,46$ v/s $35,13 \pm 1,28$, $p < 0,05$), producción que fue bloqueada por ADMA. Luego de los ensayos funcionales se realizó una inyección de estas células en la cola de las ratas con una injuria en la arteria carótida izquierda y se observó, luego de dos semanas del tratamiento, que hubo una disminución significativa de la hiperplasia de la neoíntima de la carótida en aquellas ratas tratadas con eNOS-EPC en comparación con aquellas sin tratamiento ($0,58 \pm 0,05$ v/s $1,56 \pm 0,21$, $p < 0,01$), lo cual conlleva a una disminución significativa de la estenosis [63]. Por lo tanto, estos resultados

evidencian que la sobreexpresión de un gen ateroprotector, como es eNOS, en las EPC potencia su funcionalidad, generándose una estrategia eficiente para la reparación de endotelios injuriados.

Por otro lado, en el año 2010, Marrotte y *col.* evidenciaron que el aumento de los niveles de estrés oxidativo en EPC aisladas de ratones diabéticos tipo 2 (EPC *db/db*) se correlacionaba con un decaimiento en la expresión y la actividad de la enzima manganeso superóxido dismutasa (MnSOD) y con una pérdida de las funciones de estas células. Para revertir este hecho, realizaron la transferencia del gen que codifica para esta enzima (Ad-MnSOD) en las EPC *db/db*, utilizando un vector adenoviral, y como control el vector asociado a GFP (Ad-GFP). Al evaluar la capacidad de EPC de formar estructuras tubulares tipo vasos sanguíneos *in vitro*, se observó que las EPC *db/db*-Ad-MnSOD mejoraban significativamente esta función, en comparación con EPC *db/db*-Ad-GFP (40% aprox., $p<0,05$) y con EPC *db/db* (50% aprox., $p<0,05$). Para evaluar la capacidad de reparación de tejidos injuriados, se realizó una lesión en el dorso de los ratones diabéticos *db/db* y luego se les trasplantó en el sitio de injuria EPC *db/db*-Ad-MnSOD o las células control. En estos experimentos se observó un mayor grado de cicatrización de la herida en ratones tratados con EPC *db/db*-Ad-MnSOD, en comparación con las células EPC *db/db*-Ad-GFP y EPC *db/db* [64]. En conclusión, este estudio pone en evidencia que el uso de terapia génica mejora las capacidades de EPC afectadas por un factor de riesgo cardiovascular, como es la Diabetes Mellitus tipo 2, lo cual se tradujo en un incremento de la angiogénesis y de la cicatrización en el sitio de lesión.

De acuerdo a los estudios mencionados, queda en evidencia que los vectores virales son herramientas efectivas para modificar genéticamente a las EPC, permitiéndoles expresar moléculas que promueven un aumento en su número y funcionalidad. Esto nos otorga células funcionalmente estables y eficientes para su uso en terapia celular, las cuales actuarían favoreciendo la reendotelización, neovascularización y reparación vascular, tanto en sujetos con factores de riesgo cardiovascular como con ECV establecida.

Tabla 4. Estudios de sobreexpresión de proteínas mediante el uso de vectores en EPC.

Blanco Terapéutico	Función	Vector viral utilizado	Referencia
Factor de crecimiento endotelio vascular (VEGF)	↑ el número, proliferación, movilización y adhesión de las EPC, ↑ el reclutamiento en sitio de la injuria vascular y la diferenciación hacia células endoteliales.	Adenovirus Retrovirus Adenovirus	Iwaguro y col., 2002 [65] Yu y col., 2009 [66] Meng y col., 2010 [67]
Factor 1 de crecimiento derivado de células estromales (SDF-1)	Contribuye a la neovascularización, y ↑ la función cardíaca.	Lentivirus	Schuh y col., 2012 [68]
Sintasa de óxido nítrico endotelial (eNOS)	↑ la proliferación de EPC, ↓ la hiperplasia de la neoíntima y promueven la reendotelización.	Retrovirus Retrovirus Lentivirus	Kong y col., 2004 [69] Cui y col., 2011 [63] Chen y col., 2013 [70]
Factor 1 inducible de hipoxia (HIF-1)	↑ la proliferación y movilización de EPC, promueve la neovascularización mejorando la función vascular.	Adenovirus	Jiang y col., 2008 [71]
Manganeso superóxidodismutasa (MnSOD)	Restaura la capacidad angiogénica y de reparación de heridas deteriorada de las EPC en ambientes altamente oxidativos.	Adenovirus	Marrotte y col., 2010 [64]

Efectos de la eritropoyetina en las EPC

La eritropoyetina (Epo) es una glicoproteína de 30,4 kDa, miembro de la familia de citoquinas clase I. La estructura proteica de la Epo consta de 165 aminoácidos, y está codificada en el humano por un gen de 2,9 kb localizado en el cromosoma 7 (q11-q22). En condiciones fisiológicas la concentración plasmática basal de esta hormona en el adulto se encuentra en un rango de 6-32 UI/mL (100 pg/mL aprox.) y varía según el sexo y edad [72-74]. La Epo es sintetizada principalmente a nivel renal por las células intersticiales peritubulares, y secundariamente por el hígado y las glándulas salivales, sin embargo, también es producida por otros tejidos, tales como el neuronal, esplénico, pulmonar, ovárico y testicular [75, 76]. La función principal de esta hormona es controlar la producción de eritrocitos (eritropoyesis), promoviendo la sobrevida, proliferación y diferenciación de los progenitores eritroides en la médula ósea [77], aunque también se asocia con actividad citoprotectora y/o proliferativa en tejidos no-hematopoyéticos.

Los niveles de Epo plasmática aumentan en respuesta a anemia, isquemia (hipoxia), reparación de tejidos y/o a angiotensina II, y tienen por efecto un incremento de la eritropoyesis y, por lo tanto, del suministro de oxígeno [73, 78]. Indirectamente estimula la proliferación y sobrevida de células progenitoras no-hematopoyéticas [78].

A nivel celular, la producción de Epo está determinada principalmente por su actividad transcripcional. El gen de Epo tiene un promotor activo, que contiene sitios de unión para elementos sensibles a hipoxia (HRE), los cuales interactúan con factores de transcripción, tales como los factores HIF-1 e HIF-2, los cuales permiten que aumente la producción de Epo [74, 78]. A su vez, la inhibición de su expresión está dada por represores como GATA-2 y NFκB [79].

Epo está compuesta por un 60% de proteínas y un 40% de carbohidratos, con 3 sitios de N-glicosilación en los residuos asparragina 24, 38 y 83 y un sitio de O-glicosilación en el residuo serina 126, donde cada glicosilación puede tener de 2 a 4 residuos de ácido siálico [78]. Estas glicosilaciones tienen por función proteger a Epo de proteasas y modular la afinidad por receptor

[79]. En base a lo anterior, se han creado diferentes isoformas recombinantes de Epo, con el fin de extender la vida media de esta proteína, mediante la variación del número de glicosilaciones (primera generación), de la formación de homodímeros o multímeros (dímero o trímeros) de Epo (segunda generación) y a través de modificación por polietilenglicol (tercera generación) [78-81].

El monómero de Epo ejerce funciones biológicas a través de la unión con su receptor (EpoR) en la superficie celular. EpoR es una proteína de 56-57 kDa, compuesta por 508 aminoácidos y codificada en el humano por un gen de 6 kb localizado en el cromosoma 19 (p13.3-p13.2) [74, 82, 83].

La expresión de EpoR se extiende más allá de las células hematopoyéticas e incluye al tejido endotelial, neuronal, muscular, cardiovascular, pulmonar, ovárico, testicular y renal [76, 78]. Además, se ha descrito que el número de receptores en la superficie de progenitores eritroides puede variar desde 34 a 3.000 por célula [83].

La unión de Epo a su receptor conlleva la formación de un homodímero activo [84], a cuyo dominio intracelular se une la proteína accesoria tirosina quinasa JAK-2, la cual fosforila residuos tirosina de EpoR [74]. Estos eventos permiten la formación de sitios de unión para otros mediadores, como STAT-5, MAP quinasas y la vía de señalización PI3K / Akt, lo cual gatilla funciones celulares, como proliferación, diferenciación y supervivencia [74, 85] (Figura 4). Luego de la activación, EpoR es inactivado por tirosinas fosfatases que poseen el dominio 2 de la región homóloga de Src (SH2), tales como SHP1 y SOCS-1 / SOCS-2. Además, en la inactivación de EpoR participa un represor denominado PIAS, que actúa inhibiendo la transcripción de STAT-5. Luego de su inactivación, el complejo Epo-EpoR es internalizado, ubiquitinizado y preparado para la degradación por el proteosoma [86-89].

La expresión de EpoR es activada en respuesta a las variaciones fisiopatológicas de Epo, sin embargo, su expresión puede aumentar también por la presencia de isoformas sintéticas de Epo, péptidos o miméticos de Epo o formas no eritroides de Epo (asialoeritropoyetina y Epo carbamylada) presentes en circulación sanguínea [78].

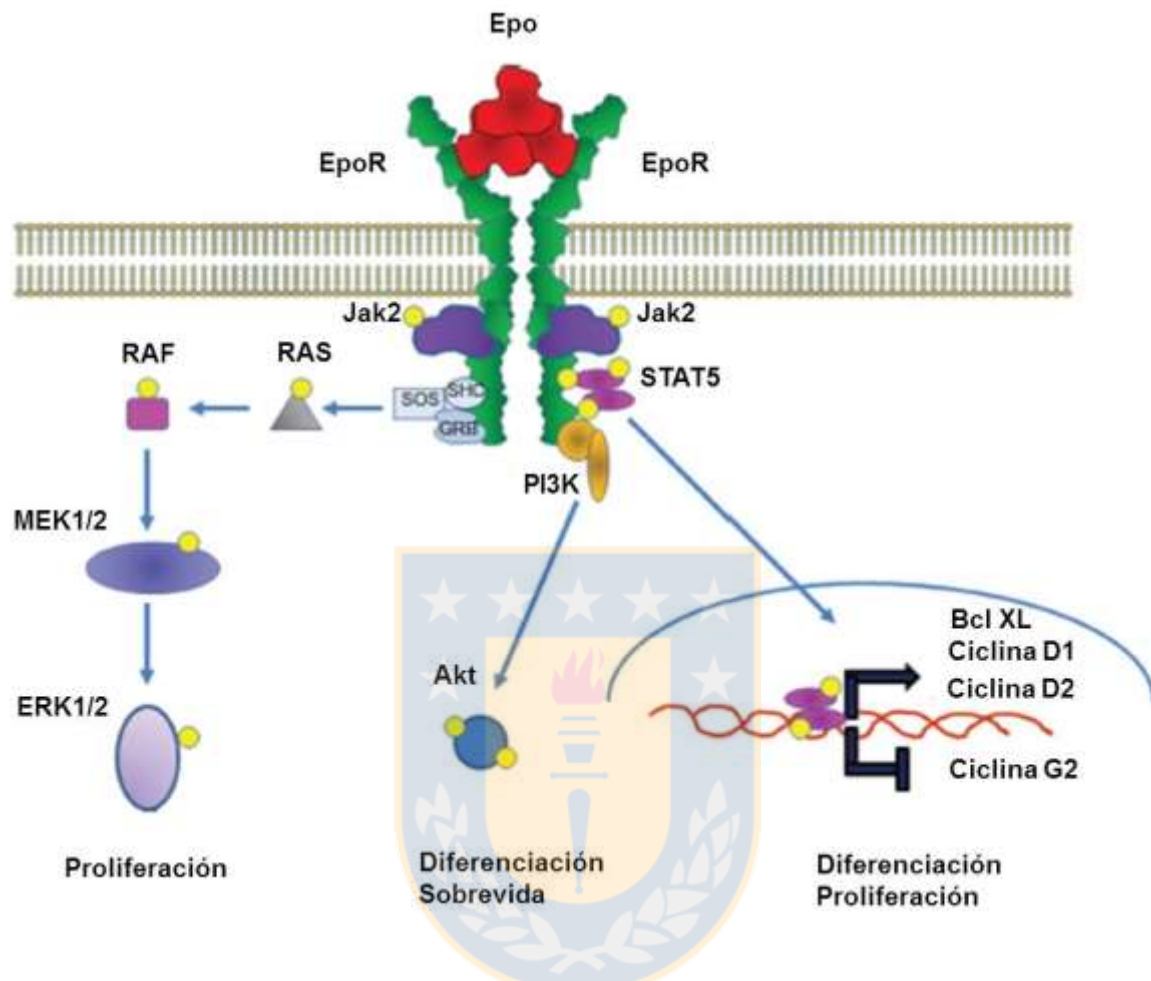


Figura 4. Diagrama de la activación del receptor de eritropoyetina y su cascada de señalización en progenitores eritroides. Epo se une a un monómero de EpoR, formando un homodímero. El complejo Epo-EpoR es activado, mediante la fosforilación de las proteínas corrientes abajo JAK-2 unidas al dominio intracelular de EpoR, que activan la fosforilación de otros residuos en este dominio, generando sitios de unión para proteínas como STAT-5, MAP quinasas y PI3K-Akt. Estas quinasas activan la cascada de señalización corriente abajo, potenciando procesos celulares como proliferación, diferenciación y supervivencia. *Modificado de Elliot y col., 2012 [74].*

Recientemente, se ha descrito que la Epo ejerce funciones ligadas a la reparación endotelial mediada por EPC. En el año 2005, George y col. realizaron estudios *in vitro* que muestran el efecto de Epo sobre el número, proliferación y adhesión de las hEPC. Para ello, células mononucleares de sangre periférica de sujetos sanos fueron incubadas con distintas concentraciones de Epo (hasta 25 UI/mL). Al séptimo día de cultivo, el número de unidades formadoras de colonia de hEPC incrementó significativamente en presencia de Epo, alcanzando el efecto máximo a 1 y 10 UI/mL con respecto a la condición basal (41% y 47% aprox., $p<0,01$, respectivamente). Además, la coincubación de Epo (1 UI/mL) con inhibidores de PI3K (Wortmanina y LY2949002) disminuye casi a nivel basal el número de unidades formadoras de colonias. Por otro lado, Epo produjo un aumento significativo, a las mismas concentraciones, de la proliferación (67% y 64% aprox., $p<0,01$, respectivamente) y en cuanto a la adhesión celular, se observó un aumento significativo a 1 UI/mL (44% aprox., $p<0,01$). Este efecto fue revertido al coincubar Epo con Wortmanina y LY2949002 (Figura 5) [90].

En otro estudio realizado el año 2006, Urao y col. demostraron que la Epo aumenta la reendotelización y la movilización de EPC desde médula ósea. Para ello, ratones C57BL/6 fueron sometidos a una remoción mecánica del endotelio de la arteria femoral izquierda. Después de la injuria, al día siguiente y luego de 2 días, estos ratones recibieron Epo o solución salina (control) una vez al día, vía intraperitoneal. En este modelo, se observó que los ratones tratados con Epo presentaron un aumento significativo de las zonas reendotelizadas al día 5 (1,4 veces, $p<0,05$) y al día 14 (1,8 veces, $p<0,01$) post-injuria, comparado con el control. La evaluación del *pool* de células mononucleares de sangre periférica mostró que el tratamiento con Epo movilizó células CD45^{dim} hacia circulación, y que la razón de células CD45^{dim} / Flk-1⁺ aumentó 7,4 veces ($p<0,05$) luego del tratamiento con Epo. Además, el número de EPC circulantes, evaluadas por el marcaje Flk⁺ / Sca⁺, fue 2 veces mayor ($p<0,05$) en los ratones tratados con Epo, en comparación con el control basal (Figura 5) [91].

Estos resultados sugieren que Epo genera un aumento en la movilización de precursores desde médula ósea, incrementando el número de EPC circulantes. Este efecto podría estar acompañado de una acción directa de Epo en el vaso injuriado, que potencie la reendotelización generada por las EPC.

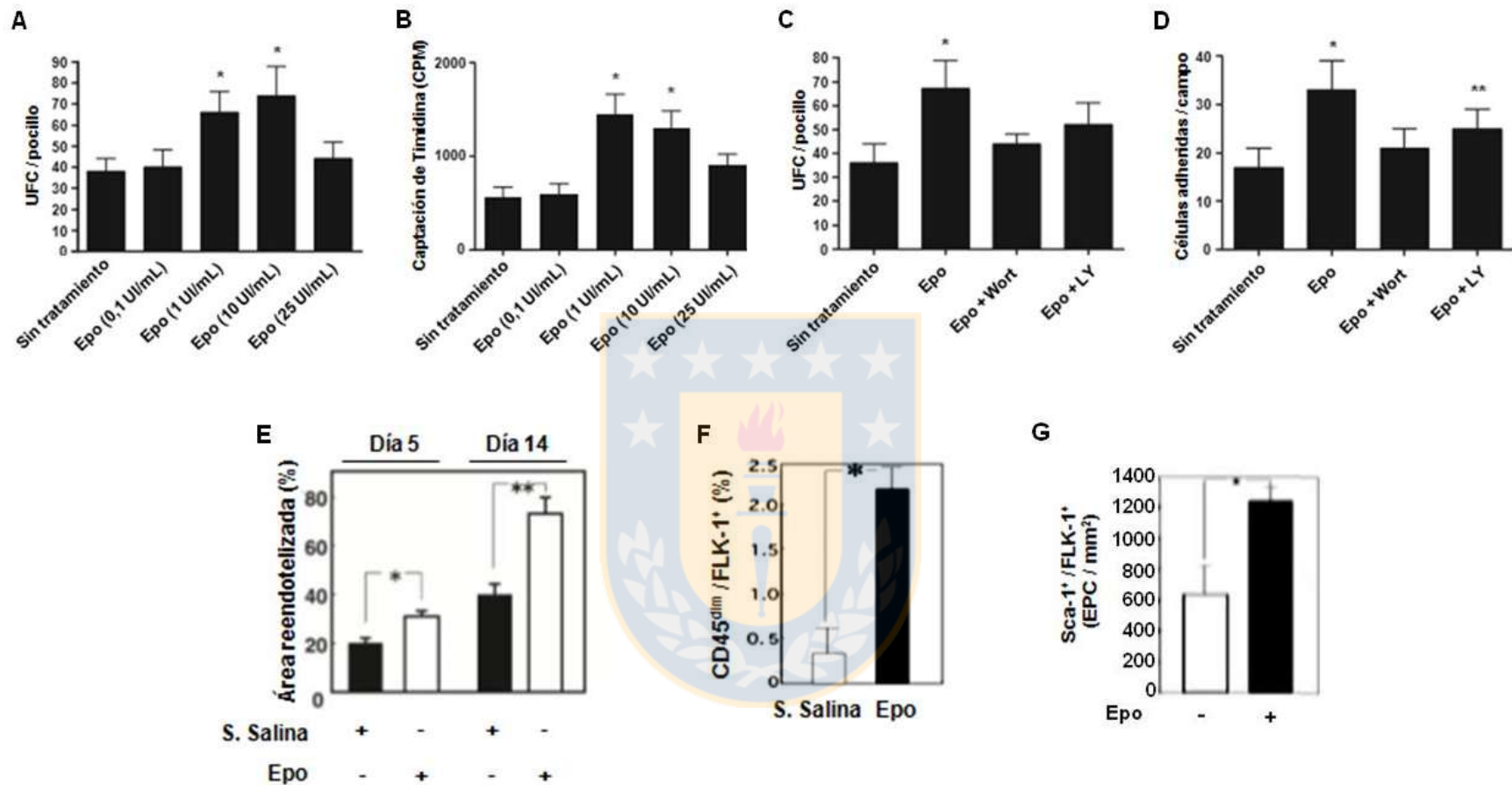


Figura 5. Efecto de eritropoyetina en el número y funcionalidad de hEPC. (A) Cuantificación del número de UFC/pocillo y (B) proliferación de hEPC incubadas con diferentes concentraciones de Epo. (C) Cuantificación del número de UFC/pocillo y (D) adhesión de hEPC en cultivos con Epo (1 UI/mL) y con inhibidores de PI3K (Wortmanina y LY2949002). (E) Cuantificación del porcentaje de área reendotelizada luego de una injuria arterial, al inyectar solución salina o con Epo. (F) Cuantificación del número de células CD45^{dim} / FLK-1⁺ del total de células mononucleares de sangre periférica post-tratamiento con solución salina o con Epo. (G) Cuantificación del número de células Sca-1⁺ / FLK-1⁺ (EPC) circulantes post tratamiento con Epo. *Modificado de George y col., 2005 [90]; Urao y col., 2006 [91].*

En el año 2012, Cheng y col. demostraron el efecto que las EPC y Epo ejercen luego de un trasplante a ratones BALB/c, a los cuales se les indujo un infarto, ligando la arteria coronaria descendente anterior izquierda. Estos ratones fueron inyectados en la zona peri-infartada con EPC autólogas marcadas con EGFP (EGFP-EPC) o con EGFP-EPC más Epo (EGFP-EPC + Epo). A los 7 días, se evaluó el marcaje EGFP en los corazones de estos ratones, observándose una mayor fluorescencia y una mayor formación de estructuras tubulares en el grupo EGFP-EPC + Epo que en el grupo EGFP-EPC (48% aprox. $p<0,01$). Luego de 28 días, esta señal no fue detectada en los ratones EGFP-EPC, mientras se observó aún algunas células positivas en los ratones EGFP-EPC + Epo. Además, se observó un incremento de las EPC circulantes ($CD45^{dim} / CD34^{+} / Flk^{+}$) en aquellos ratones trasplantados con EGFP-EPC, comparado con el grupo control (36% aprox., $p<0,05$) y fue aún mayor con EGFP-EPC + Epo ($p<0,05$), comparado con los ratones EGFP-EPC (39% aprox., $p<0,01$) [92].

Estos resultados demuestran que Epo favorece la reendotelización, principalmente mediado por una mayor presencia de EPC en el tejido lesionado. Esto podría corresponder a una mayor supervivencia en estas células y/o a otros eventos implicados en la reparación endotelial.

A pesar de las evidencias experimentales que demuestran que la administración de Epo en conjunto con EPC mejora el número y función de estas células, no se ha descrito el uso de hEPC productoras de esta hormona. Esta estrategia podría potenciar aún más el efecto de las hEPC, ya que conllevaría una secreción local de Epo en el sitio de lesión vascular, lo cual podría disminuir efectos colaterales de la terapia con Epo intravenosa, como son posibles efectos en la eritropoyesis.

En este contexto, surge la oportunidad de generar hEPC transducidas con el gen de Epo humana como estrategia para mejorar la funcionalidad de esta población celular. Esta nueva característica produciría células más resistentes a ambientes adversos, como es un paciente con ECV o con factores de riesgo cardiovascular, por lo cual estas células modificadas genéticamente podrían ser una alternativa para el tratamiento de ECV.

HIPÓTESIS

La expresión de eritropoyetina humana por hEPC potencia parámetros de funcionalidad celular como sobrevida, diferenciación y formación de vasos sanguíneos.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de la eritropoyetina humana como potenciador de la funcionalidad de hEPC que expresen y secreten esta hormona de forma recombinante.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Estandarizar 2 métodos para modificar genéticamente hEPC con vectores virales, a fin que expresen y secreten eritropoyetina humana.
2. Elegir el mejor método de transducción, en base a la producción de eritropoyetina humana y a la sobrevida de hEPC productoras de esta hormona.
3. Evaluar el fenotipo de hEPC productoras de eritropoyetina humana obtenidas con el mejor método de transducción.
4. Establecer el efecto de hEPC productoras de eritropoyetina humana obtenidas con el mejor método de transducción, en modelos de angiogénesis.

METODOLOGÍA

Objetivo 1. Estandarizar 2 métodos para modificar genéticamente hEPC con vectores virales, a fin que expresen y secreten eritropoyetina humana.

Generación del vector lentiviral para Epo humana

Clonamiento del vector lentiviral

La amplificación de la secuencia de Epo humana (hEpo) fue realizada desde el vector pAdTrackEpo-CMV, mediante PCR, utilizando los partidores: F-5'-GCTAGCCATGGGGGTGCACGAATGTC-3' y R- 5' AACTCATCTGTCCCCTGTCCTGCAG-3'. Los ensayos de PCR consideraron las siguientes condiciones: activación de la DNA polimerasa por 10 minutos a 95°C, denaturación a 95°C durante 10 segundos, alineamiento de los partidores a 53°C por 30 segundos y extensión a 72°C por 30 segundos. La presencia del producto fue confirmada por electroforesis en gel de agarosa 1%, desde donde fue extraída la banda con el kit EZNA (Omega biotec). El amplicón de hEpo fue insertado mediante ligación con T₄ DNA ligasa, en el sitio de multiclonamiento del vector de expresión pTARGET™ Mammalian Expression Vector System, utilizando las enzimas de restricción *EcoRV* y *HpaI*. Este plasmidio fue amplificado en células competentes JM109, según el método de electroporación [93], y fue purificado según el método de lisis alcalina [94], utilizando el *kit* EZNA. En forma paralela, el gen FSH fue extraído desde el plasmidio lentiviral pLCW-FSH-Lgl utilizando las enzimas de restricción *XhoI* y *HpaI*, generando un plasmidio linealizado pLCW-Lgl. La secuencia de hEpo fue integrada en el sitio de multiclonamiento del plasmidio pLCW-Lgl por ligación con T₄ DNA ligasa. El plasmidio obtenido (pLEpo-GFP) (Figura 6) fue amplificado mediante la transformación de células competentes *E. coli* Top 10, siguiendo el protocolo descrito para las células JM109.

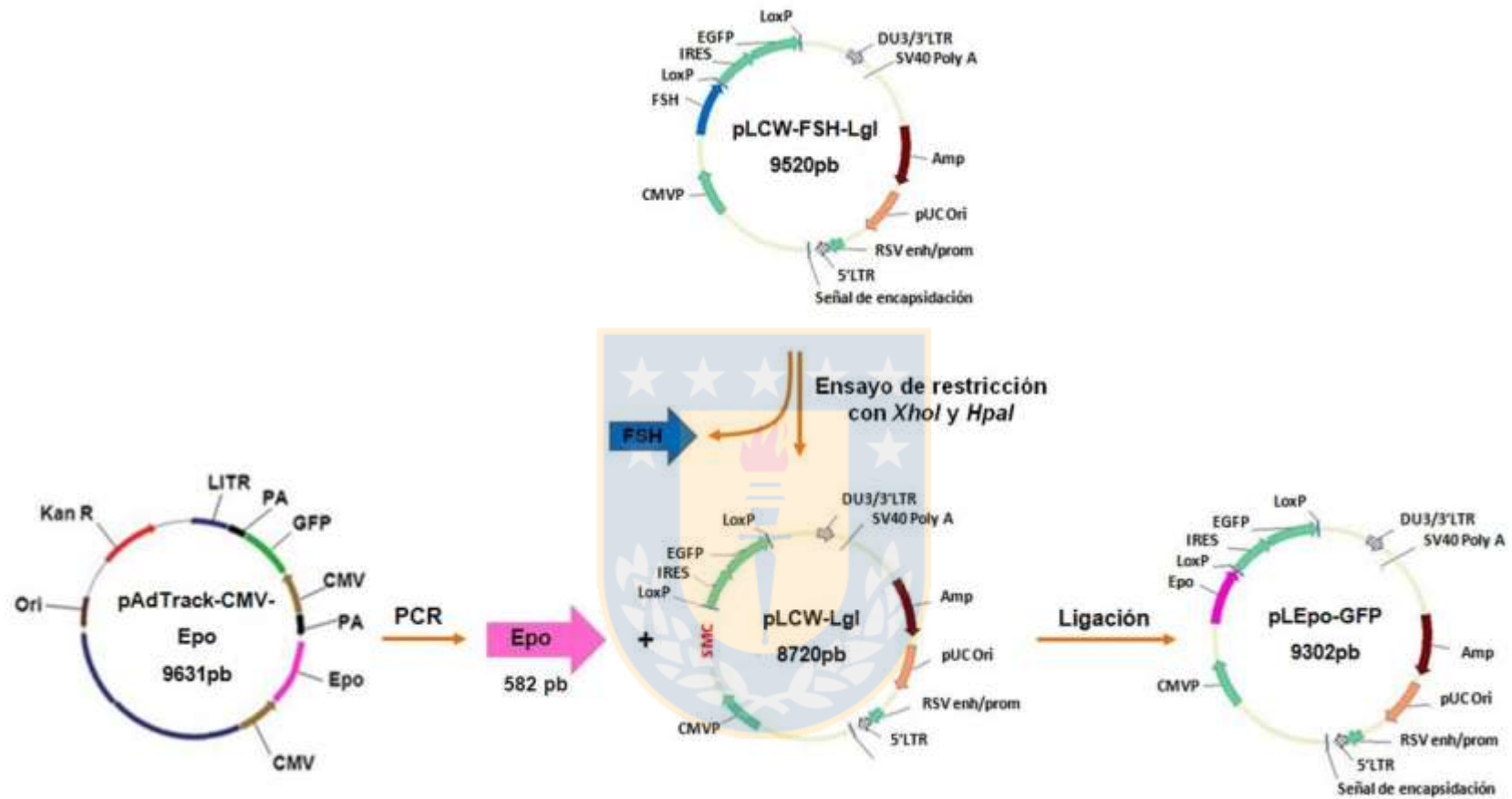


Figura 6. Generación del vector lentiviral pLEpo-GFP. El plásmido pLEpo-GFP fue obtenido a partir de la ligación de Epo, aislada desde pAdTrack-CMV-Epo, con el vector pLCW-LgI, el cual fue linealizado al extraer FSH desde el vector lentiviral pLCW-FSH-LgI.

Transfección en cultivos de células superiores

Las células HEK 293-FT fueron sembradas a una confluencia del 40% y cultivadas en medio DMEM suplementado con suero bovino fetal (SBF) 10%, bajo condiciones estándar, hasta 80% de confluencia. Una hora antes de la transfección, el medio de cultivo fue reemplazado por DMEM sin SBF.

Para la transfección, el ADN plasmídico y polietilenimina (PEI) fueron preparados por separado. Los 3 plásmidos ayudantes (*kit viral ViraPower™ Lentiviral Expression Systems*, Invitrogen) y el vector pLEpo-GFP fueron transfectados en una relación 1:2:2:3 (pLP/VSVG, pLP1, pLP2 y pLEpo-GFP, respectivamente). A partir de una solución de PEI de 25 kDa (0,81 mg/mL pH 7.0, Sigma Aldrich), fue tomado 1 μ L por cada μ g de ADN (1 μ g por cada 10^6 células), y el volumen final fue ajustado a 100 μ L con una solución de glucosa 5% previamente filtrada. Esta mezcla fue agitada vigorosamente durante 1 minuto y dejada en reposo por 5 minutos a temperatura ambiente. Pasado este tiempo, el PEI fue agregado al ADN e inmediatamente se mezclaron vigorosamente durante 1 minuto, dejando reposar la mezcla por 10 minutos a temperatura ambiente [95, 96].

Las células fueron lavadas con 5 mL de medio DMEM sin SBF e incubadas con 7 mL de medio DMEM sin SBF. Finalmente, 900 μ L de medio DMEM sin SBF fueron añadidos a la mezcla de transfección y ésta fue suavemente adicionada a la capa celular. Las células fueron incubadas durante 8 horas y luego el medio de cultivo fue cambiado por medio DMEM suplementado con SBF 5%. La efectividad de la transfección fue confirmada mediante la expresión de GFP al cabo de 24 horas [95, 96].

Luego de 48 horas de transfección, el medio de cultivo fue colectado y centrifugado a 600 x g por 10 minutos, filtrado (membranas de 0,45 μ m) y centrifugado a 108.695 x g durante 90 minutos. El precipitado fue resuspendido en 100 μ L de medio sin suero, alicuotado y almacenado a -80°C hasta su posterior uso.

Obtención del vector adenoviral para eritropoyetina humana

El vector adenoviral para hEpo (AdEpo-GFP) había sido generado previamente (Figura 7) y fue proporcionado por el Laboratorio de Biotecnología y Biofármacos de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad de Concepción.

La multiplicación, purificación y titulación de los viriones fue realizada según lo descrito en el manual AdEasy™ Vector System, utilizando la línea de empaquetamiento adenoviral HEK 293-A. Para ello, las células fueron cultivadas en condiciones estándar con medio DMEM SBF 10%, hasta 90% de confluencia. Luego, fueron infectadas con una multiplicidad de infección (MOI) de 5 unidades formadoras de colonias (UFC) por célula en medio DMEM SBF 5%, durante 8 horas, tiempo tras el cual el medio de cultivo fue remplazado por DMEM SBF 2%. Pasadas 48 horas, fue recuperado tanto el medio de cultivo como las células y fueron centrifugados a 300 x g durante 5 minutos. El *pellet* fue resuspendido en medio DMEM sin SBF, las células fueron lisadas con tres pasos sucesivos de congelación-descongelación, de -20°C a 37°C, seguido de agitación vigorosa en cada paso. La muestra fue centrifugada a 600 x g durante 10 minutos y el sobrenadante fue almacenado a -80°C.

El adenovirus fue purificado mediante ultracentrifugación a 100.000 x g por 90 minutos a 4°C en gradiente discontinuo (1,4 / 1,2) de cloruro de cesio (CsCl).

La muestra adenoviral fue titulada mediante diluciones seriadas en base 5, transfiriendo 100 µL de cada dilución a una placa de 96 pocillos con HEK 293-A (densidad de 5×10^4 células/pocillo). Luego de 48 horas, se confirmó la transducción, observando la fluorescencia verde en microscopio óptico. Se definió como una partícula viral o UFC a la máxima dilución en la cual se visualizó al menos una célula verde fluorescente por pocillo. El resultado de estos recuentos fue promediado y multiplicado por la dilución para obtener el título viral, el cual fue expresado como UFC/mL.

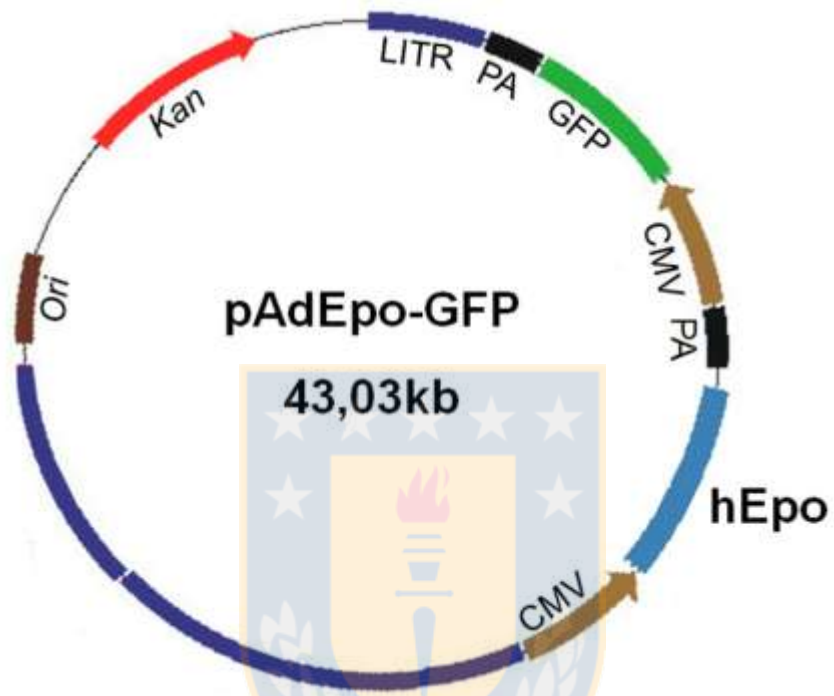


Figura 7. Vector adenoviral AdEpo-GFP. Este plásmido es resultado de la recombinación homóloga entre los plásmidos pAdTrack-CMV-Epo (9631 pb) y pAdEasy-1 (33,4 kb). Este vector tiene inserto el gen hEpo, el cual es regulado transcripcionalmente por un promotor fuerte denominado citomegalovirus (CMV).

Aislamiento y cultivo de hEPC

Las hEPC fueron aisladas desde el *pool* de células mononucleares de sangre periférica, según lo descrito previamente [10, 97]. Para ello, voluntarios sanos, normolipémicos y normoglicémicos, de 20 a 30 años de edad, fueron reclutados en la Universidad de Concepción, previa encuesta de salud y firma de consentimiento informado. Se obtuvieron 50 mL de sangre venosa de cada voluntario, muestra que fue diluida 1:1 con tampón PBS 10 mM, pH 7,4 heparinizado (0,5 UI/mL). Las células mononucleares fueron obtenidas mediante centrifugación con gradiente de densidad ($400 \times g$ por 40 minutos), utilizando Histopaque 1077 (Sigma Aldrich) o Ficoll-PaqueTMPlus (GE-Healthcare Bio-Sciences AB) (15 mL o 19 mL, respectivamente, para 50 mL de sangre diluida) [10, 27]. Estas células fueron lavadas dos veces con tampón PBS y una vez con medio de cultivo comercial para EPC (Gibco®, Invitrogen), suplementado con SBF 30%. Las células fueron resuspendidas en 1 mL de medio de cultivo EPC SBF 30% y VEGF 30 ng/mL (Sigma Aldrich), y la viabilidad fue confirmada mediante tinción con Azul de Tripán. Las células fueron distribuidas en placas de Petri, previamente recubiertas con fibronectina 10 ng/mL (Sigma Aldrich), para ser cultivadas bajo condiciones estándar.

Selección de la multiplicidad de infección

Para determinar el MOI adecuado para el adenovirus, primero fue seleccionado el día de transducción de las células. Para ello, hEPC de 3, 7 y 10 días cultivadas en placas de 24 pocillos (4×10^5 células / pocillo), con medio EPC SBF 30%, fueron incubadas con 100 partículas virales (pv) por célula durante 48 horas bajo condiciones estándar. Una vez establecido este parámetro, las hEPC fueron cultivadas en placas de 24 pocillos (4×10^5 células/pocillo) con distintas cantidades de pv / célula (50 – 200). El cultivo se incubó durante 48 horas bajo condiciones estándar, donde se seleccionó el MOI de trabajo.

Para el caso del lentivirus, la selección del MOI fue realizada con hEPC de 3, 7 y 10 días, cultivadas en placas de 96 pocillos (1×10^5 células/pocillo). A cada pocillo fueron agregados 1, 3 y

5 μ L de la suspensión de partículas virales, los cuales fueron incubados por 48 horas bajo condiciones estándar.

Se definió como la cantidad óptima de partículas virales a utilizar por célula, al pocillo que presentó la mayor expresión de proteína, determinado por emisión de fluorescencia, sin que el cultivo presente efecto citopático severo, según lo observado mediante microscopio óptico de fluorescencia, luego de 48 horas.

Expresión del receptor de eritropoyetina

Las hEPC de 4 y 9 días fueron lisadas con tampón RIPA (Tris 50 mM, pH 8; NaCl 150 mM, SDS 0,1%; Tritón X-100 o NP-4 0,1%; desoxicolato de sodio 0,5%) e inhibidor de proteasas. Las muestras fueron sonicadas en baño por 10 minutos a 4°C y se centrifugaron a 10.000 x *g* durante 10 minutos a 4°C. El sobrenadante fue recuperado y almacenado a -20°C hasta su cuantificación y posterior uso.

50 μ g de proteínas totales por muestra fueron separadas mediante una electroforesis SDS-PAGE en un gel de poliacrilamida 12%, a 100 V por 1,5 horas. La transferencia fue realizada hacia una membrana de nitrocelulosa en cámara húmeda por 1 hora y 45 minutos a 250 mA, lo cual fue verificado mediante tinción con Rojo Ponceau.

La membrana fue bloqueada con leche descremada 5% en PBS 10 mM, pH 7,4 durante 1 hora, y luego incubada ya sea, con el anticuerpo primario anti-EpoR (1:1000, sc-365662, Santa Cruz) o con un anticuerpo primario anti subunidad β de la ATP sintasa (1:1000, A-21351, Invitrogen) durante toda la noche a 4°C. Posteriormente, la membrana fue incubada con un anticuerpo secundario anti IgG de ratón conjugado a peroxidasa (1:2000, A0168, Sigma Aldrich) durante 2 horas a temperatura ambiente. La detección de las bandas proteicas fue realizada con el reactivo quimioluminiscente ECL (Thermo Scientific), siguiendo el protocolo descrito por el fabricante.

Objetivo 2. Elegir el mejor método de transducción, en base a la producción de eritropoyetina humana y a la sobrevivencia de hEPC productoras de esta hormona.

Transducción de hEPC

hEPC de 5 días fueron lavadas con tampón PBS 10 mM, pH 7,4 y recuperadas con tripsina 0,15% - EDTA 0,06% (37°C, 5 minutos). El recuento celular y la evaluación de la viabilidad fueron realizados a través del método de Azul de Tripán. Las células fueron distribuidas en placas recubiertas con fibronectina y cultivadas con medio EPC SBF 30% y VEGF 30 ng/mL, durante 48 horas. Al día 7, fue agregado el adenovirus, siendo incubado por un máximo de 48 horas.

Producción de eritropoyetina

Las hEPC de 9 días transducidas con Ad-Epo durante 2 días, fueron lisadas con tampón RIPA e inhibidor de proteasas, como fue descrito previamente en la detección del receptor de Epo. Para el western blot, se procedió como fue descrito anteriormente, utilizando geles de poliacrilamida al 15%.

Para la detección la membrana fue incubada, ya sea, con el anticuerpo primario anti-Epo (1:1000, sc-80995, Santa Cruz) o con un anticuerpo primario anti subunidad β de la ATP sintasa (1:1000, A-21351, Invitrogen) durante toda la noche a 4°C, y luego con un anticuerpo secundario anti IgG de ratón conjugado a peroxidasa (1:2000, A0168, Sigma Aldrich) durante 2 horas a temperatura ambiente.

Ensayo de proliferación

hEPC de 5 días fueron distribuidas en placas de 96 pocillos recubiertos con fibronectina (5 x 10⁴ células/pocillo) y fueron incubadas por 48 horas en medio EPC SBF 30% y 30 ng/mL, y luego por 4 h con medio EPC SBF 10%. Transcurrido este tiempo, las células fueron tratadas con medio EPC SBF 10% (control basal de proliferación), Epoietina α 5 UI/mL, o fueron transducidas con Ad-Epo o Ad-Mock, considerando un MOI de 150 pv/célula. La proliferación fue cuantificada luego de

48 horas, utilizando el reactivo Alamar Blue (Sigma-Aldrich), según las recomendaciones del fabricante. La reacción se detectó por espectrofotometría a 570 nm (reactivo reducido) y a 600 nm (reactivo oxidado) (Figura 8) [98].

La proliferación celular fue calculada utilizando la fórmula presentada en la Figura 9 comparando cada condición con el control basal (medio EPC SFB 10%).

Ensayo de apoptosis

A los 5 días de cultivo, las hEPC fueron distribuidas en placas de 100 mm recubiertas con fibronectina (1×10^6 células/placa), e incubadas en medio de cultivo EPC SBF 30% y VEGF 30 ng/mL, bajo condiciones estándar, por 48 horas. Luego de este periodo, fueron consideradas las siguientes condiciones de estudio: hEPC nativas (no transducidas), hEPC Ad-Epo y hEPC Ad-Mock, las cuales fueron incubadas durante 48 horas en medio EPC SBF 30%. Como control de apoptosis se utilizó hEPC de 9 días cultivadas en placas de 100 mm (3×10^6 células/placa) con medio de cultivo EPC sin suero durante las últimas 24 horas. La apoptosis fue determinada mediante la detección de la actividad de la caspasa 3, a 405 nm, utilizando el *kit* Caspase-3/CPP32 Colorimetric Assay (BioVision), según recomendaciones del fabricante.

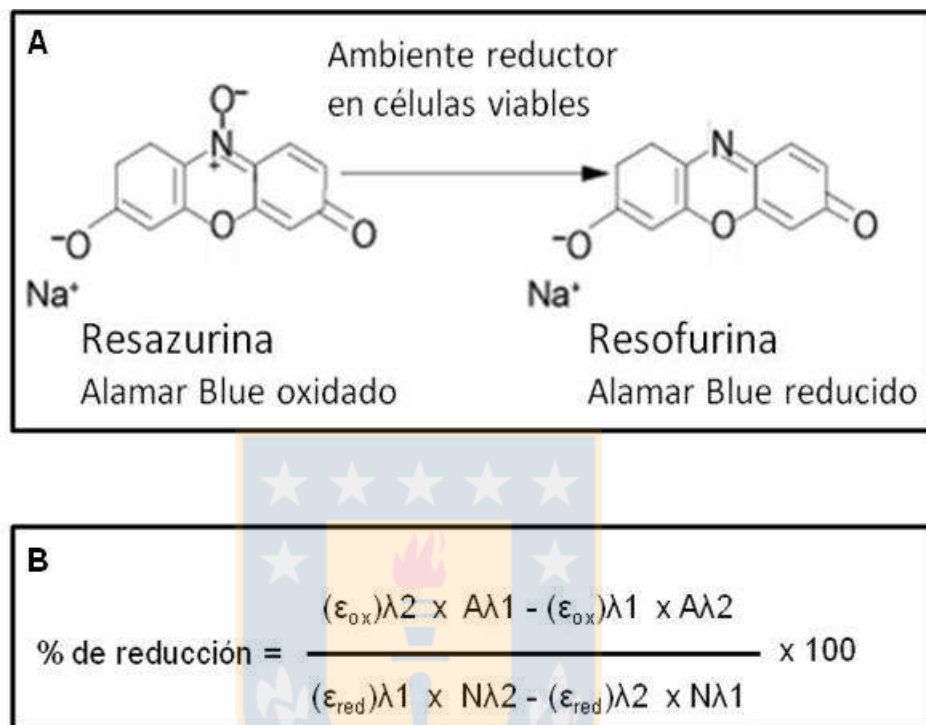


Figura 8. Cuantificación de la proliferación, mediante el reactivo Alamar Blue. El ensayo consiste en detectar la actividad metabólica de las células mediante un indicador colorimétrico. En (A) se muestra la reacción de reducción del reactivo y en (B) la fórmula para calcular el porcentaje de reducción (indicador del número de células viables presentes en el cultivo). $\epsilon_{ox}\lambda_1$: coeficiente de extinción molar de Alamar Blue a 570 nm, $\epsilon_{ox}\lambda_2$: coeficiente de extinción molar de Alamar Blue oxidado a 600 nm, $\epsilon_{red}\lambda_1$: coeficiente de extinción molar de Alamar Blue reducido a 570 nm, $\epsilon_{red}\lambda_2$: coeficiente de extinción molar de Alamar Blue reducido a 600 nm, $A\lambda_1$: absorbancia de las muestras a 570 nm, $A\lambda_2$: absorbancia de las muestras a 600 nm, $N\lambda_1$: absorbancia del control negativo a 570 nm y $N\lambda_2$: absorbancia del control negativo a 600 nm.

Objetivo 3. Evaluar el fenotipo de hEPC productoras de eritropoyetina humana obtenidas con el mejor método de transducción.

Citometría de flujo

hEPC de 3, 7 y 9 días cultivadas en placas de 100 mm, fueron recuperadas con tripsina 0,15% - EDTA 0,06% (37°C, 5 minutos). De cada condición, 2×10^5 células fueron incubadas con PBS / BSA 3% por 45 minutos a temperatura ambiente, e inmediatamente con los anticuerpos anti CD34-APC (1/10, 555824, BD Biosciences) y KDR-FITC (1:2, FAB357F, RyD System) diluidos en PBS / BSA 3%, por 30 minutos a 4°C en oscuridad. Las células fueron analizadas utilizando el citómetro FACS Canto II, en el Laboratorio de Diagnóstico Molecular, Universidad Católica de la Santísima Concepción, considerando en cada adquisición un total de 10.000 eventos. Los datos fueron analizados con el *software* WinMDI 2.8 [98].

Evaluación de marcadores de diferenciación

hEPC de 5 días de cultivo fueron distribuidas en 3 placas de 100 mm (1×10^6 células/placa) y cultivadas con medio EPC SBF 30% y VEGF 30 ng/mL durante 48 horas. A los 7 días, fueron consideradas las siguientes condiciones de estudio: hEPC nativas (no transducidas), hEPC Ad-Epo y hEPC Ad-Mock, las cuales se dejaron en cultivo por 48 horas.

La extracción de ARNm fue realizada con el reactivo Trizol (Life Technologies), siguiendo las indicaciones del fabricante. De acuerdo a lo anterior, 1 mL del reactivo Trizol fue agregado a cada placa de 100 mm y fueron incubadas durante 5 minutos a 4°C. Cada lisado fue recuperado y se le adicionaron 200 μ L de cloroformo, incubando por 5 minutos a temperatura ambiente, para centrifugar a $12.000 \times g$ durante 15 minutos. Las fases acuosas fueron recuperadas en nuevos tubos, se les adicionaron 500 μ L de isopropanol, fueron incubadas por 10 minutos y centrifugadas a $12.000 \times g$ por 10 minutos a 4°C. El ARNm precipitado fue lavado con 1 mL de etanol 75% y centrifugado bajo las mismas condiciones.

El ARNm fue resuspendido en 20 μL de agua libre de DNasa/RNasa. La integridad del ARNm fue determinado mediante un gel de agarosa 1%, mientras la cuantificación fue realizada por espectrofotometría a 260 nm (1 unidad A_{260} ssRNA = 40 $\mu\text{g/mL}$)

Para sintetizar cDNA, fue utilizado el *kit* M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen), según las indicaciones del fabricante. Para ello, fue preparada una mezcla con 5,0 μg de ARNm total, 0,5 μL de oligo(dT)₁₈ primer (Thermo Scientific; 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$), 0,5 μL de Random hexamer primer (Thermo Scientific; 0.2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) y 1,0 μL de dNTPs (Fermentas; 10mM). La mezcla fue incubada a 70°C por 2 minutos y luego fue adicionado 7,0 μL de una solución que contenía: 4,0 μL de 5X First-Strand Buffer (Invitrogen), 2,0 μL de DTT (Invitrogen; 0.1M) y 1,0 μL de RNaseOUT (Invitrogen; 40 Unidades/ μL). La solución final fue incubada a 37°C durante 5 minutos y luego fue agregado 1,0 μL de la enzima MMLV-RT (Invitrogen; 200 Unidades). La mezcla fue incubada a 25°C por 10 minutos, 37°C por 50 minutos y 70°C por 15 minutos.

La reacción de PCR fue realizada con un *mix* de reacción que contenía 10 μL de 2×Brilliant II SYBR®Green QPCR Master Mix (Agilent Technologies), 0,375 μL de Rox (1:200, Agilent Technologies), 300 ng de cDNA y 400 nM de partidores específicos para 18S (*housekeeping*) y 300 nM para KDR, CD34 y CD31 (Tabla 5), obteniendo un volumen final de reacción de 20 μL . Los ensayos de qPCR fueron realizados en el sistema Ab7500 Fast Real-Time PCR System, mediante la activación de la DNA polimerasa por 10 minutos a 95°C y 40 ciclos que incluyen: denaturación a 95°C durante 30 segundos, alineamiento según Tabla 5 y extensión a 72°C por 60 segundos. Los amplicones fueron verificados mediante una electroforesis en gel de agarosa 1% y el análisis de las curvas de *melting*. La cuantificación de la expresión génica fue realizada por el método relativo del Delta Delta Ct [99].

Tabla 5. Partidores utilizados para la detección de marcadores de diferenciación de hEPC.

Gen	Secuencia de partidores	T_m (°C)	Tamaño del producto (pb)
18S	F- 5'- TAG CCT TTG CCA TCA CTG CCA -3' R- 5'- GAG TTC TCC CGC CCT CTT GG -3'	80	100
CD34	F- 5'- CAC CCT GTG TCT CAA CAT GG -3' R- 5'- GGC TTC AAG GTT GTC TCT GG -3'	77	191
KDR	F- 5'- CAA GTG GCT AAG GGC ATG GA -3' R- 5'- ATT TCA AAG GGA GGC GAG CA -3'	74	181
CD31	F- 5'- TGT CAT TGC GCT GTG GAA TTT -3' R- 5'- AGA CCT GCT CGG TTC TCT CTG -3'	81	229

F: *Forward* o sentido. R. *Reverse* o antisentido. T_m: Temperatura de *melting*.



Objetivo 4. Establecer el efecto de hEPC productoras de eritropoyetina humana obtenidas con el mejor método de transducción, en modelos de angiogénesis.

Los procedimientos detallados a continuación fueron realizados en el bioterio de la Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción, bajo la supervisión del veterinario Dr. Rafael Maura, siguiendo las directrices de las Ciencias de la Salud Animal y del Comité de Ética de la Universidad de Concepción.

Ensayo de formación de vasos sanguíneos *in vivo*

Como modelo de experimentación, fueron utilizados huevos de gallina *Gallus gallus* doméstica fecundados, obtenidos en el Instituto de Salud Pública. Los huevos fueron incubados en posición horizontal, a 37°C y 80% de humedad, durante 10 días. Luego se abrió una ventana en el lado superior y otra en el polo agudo del huevo, las que fueron selladas durante 1 hora hasta que los huevos recibieran el tratamiento.

Para la estandarización del método, se utilizó hEPC de 9 días, cultivadas bajo condiciones estándar, como se mencionó anteriormente.

Se abrió la ventana del lado superior del huevo y las siguientes condiciones fueron inoculadas: medio EPC o hEPC de 9 días en distintas cantidades (100.000, 300.000 y 500.000 células), todo lo cual fue incubado por 3 o 5 días. Los vasos sanguíneos formados fueron cuantificados mediante fotografía digital y el software Image J [100-102].

Una vez establecida la cantidad de células y el tiempo de incubación, se procedió con los ensayos con hEPC transducidas. Para ello, hEPC de 5 días fueron distribuidas en 3 placas de 100 mm (1×10^6 células / placa) y cultivadas en medio EPC SBF 30% y VEGF 30 ng/mL, durante 48 horas. Al día 7, fueron transducidas con Ad-Epo o Ad-Mock. Al día siguiente, las hEPC nativas o transducidas fueron recuperadas con tripsina 0,15% - EDTA 0,06% a 37°C por 5 minutos, luego fue realizado el recuento celular y evaluación de la viabilidad a través del método de Azul de Tripán.

En la ventana del lado superior del huevo, fueron inoculadas las siguientes condiciones: medio EPC, Epoietina α 5 UI/mL, HDL 100 μ g/mL, VEGF 150 μ g/mL, hEPC, hEPC y Epoietina α 5UI/mL, hEPC Ad-Epo y hEPC Ad-Mock. Los huevos fueron incubados por 72 horas, luego de lo cual los vasos sanguíneos fueron cuantificados, mediante fotografía digital y el *software* Image J [100-102].

Ensayo de formación de vasos sanguíneos *ex vivo*

Como ensayo preliminar, fue realizada una evaluación de los medios de cultivos de las hEPC productoras de hEpo (medios condicionados), recuperados luego de 48 horas de transducción. El modelo de experimentación consistió en anillos aórticos de ratones adultos C57BL/6 de 8–12 semanas de edad, obtenidos desde el bioterio de la Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción.

Una vez aisladas las aortas, fueron incubadas en una placa Petri de 100 mm con medio Opti-MEM (Gibco®, Invitrogen), donde fueron realizados los cortes para obtener anillos de aproximadamente 1 mm de espesor. Por cada aorta, se obtuvieron alrededor de 20-25 anillos.

En forma paralela, 50 μ L de Matrigel (BD Biosciences) fueron adicionados a cada pocillo de una placa de 96 pocillos, la cual fue incubada a 37°C durante 15 minutos. Se distribuyó un anillo aórtico por pocillo, agregando nuevamente 50 μ L/pocillo de Matrigel para cubrir los anillos. La placa fue incubada a 37°C por 15 minutos y se agregó 50 μ L/pocillo de Opti-MEM SBF 2,5% y VEGF 30 ng/mL, lo cual fue cultivado durante 24 horas.

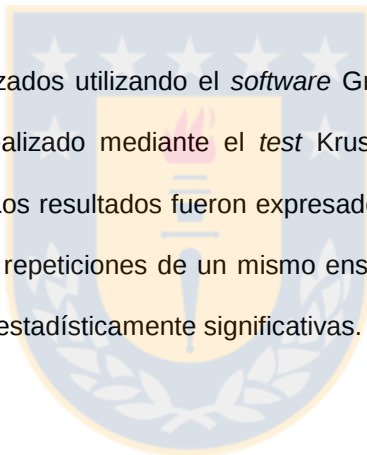
Al cabo de este tiempo, fue eliminado el medio de cultivo y adicionados los medios condicionados y el medio Opti-MEM SBF 2,5% y VEGF 30 ng/mL, en relación 1:1.

Luego de 7 días de incubación, los anillos fueron fijados con 50 μ L/pocillo de paraformaldehído 4% por 30 minutos a temperatura ambiente, permeabilizados con Tritón X-100 0,1% e incubados a temperatura ambiente durante otros 10 minutos. Finalmente, la placa fue tratada con 50 μ L/pocillo de Faloidina-Texas Red durante 1 hora en oscuridad.

Las imágenes fueron obtenidas por microscopía confocal (Olympus IX81) y las estructuras tipo capilares cuantificadas utilizando el *software* Image J [102, 103].

Análisis estadísticos

Los datos fueron analizados utilizando el *software* GraphPAD Prism. El análisis de las significancias estadísticas fue realizado mediante el *test* Kruskal Wallis y el *test* U de Mann-Whitney, según correspondiera. Los resultados fueron expresados como el promedio $\pm$ desviación estándar, siendo n el número de repeticiones de un mismo ensayo. Fue considerado un valor de $p < 0,05$ para designar diferencias estadísticamente significativas.



RESULTADOS

1. Generación del vector lentiviral

1.1 Clonamiento del vector lentiviral

Se amplificó la secuencia de la eritropoyetina humana (hEpo) de un tamaño de 582 pb, desde el vector pAdTrackEpo-CMV, mediante PCR convencional.

Paralelamente, se realizó la digestión del vector p-TARGET con las enzimas de restricción *EcoRV* y *HpaI*, donde se obtuvieron bandas de 5290 pb y 380 pb (Figura 9).

Luego se realizó la ligación entre hEpo y el vector de expresión p-TARGET, como paso intermedio antes de realizar la ligación final con el plásmido pLCW-Lgl. Se obtuvieron 8 colonias de células JM109 con el bandeo esperado, luego de la digestión las enzimas *XhoI* y *HpaI* (5290 pb y 582 pb, Figura 10).

De las colonias positivas se seleccionó la número 6 para realizar un cultivo a gran escala en bacterias *E. coli Top 10*, para obtener gran rendimiento del gen hEpo.

Por otro lado, el plásmido pLCW-FSH-Lgl fue digerido con las enzimas de restricción *XhoI* y *HpaI* para extraer el fragmento de FSH, obteniendo bandas de 9520 pb y 800 pb (Figura 11).

La ligación entre el plásmido pLCW-Lgl y hEpo fue realizada con T4 ligasa, y el plásmido pLEpo resultante fue introducido en bacterias *E. coli Top 10*. Esta etapa generó 16 colonias, las cuales fueron evaluadas con las enzimas de restricción *XhoI* y *HpaI*, que generaron bandas de 9520 pb y 582 pb (Figura 12). De ellas, se seleccionó la muestra número 6, con la cual se realizó un cultivo a gran escala. El plásmido pLEpo amplificado, se utilizó para transfectar células HEK 293-FT con el fin de producir el vector lentiviral correspondiente.

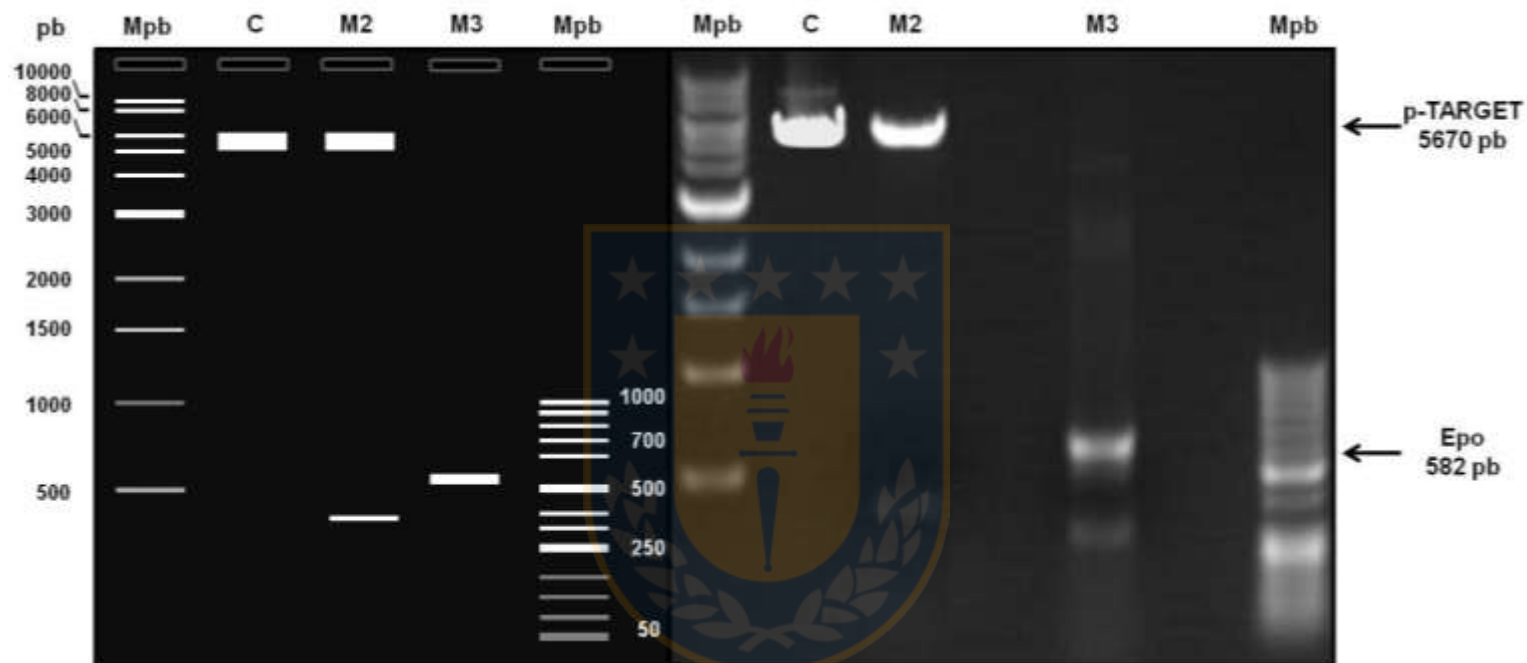


Figura 9. Amplificación por PCR convencional de hEpo desde pAdTrack-CMV-Epo y digestión de p-TARGET, utilizando las enzimas *EcoRV* y *HpaI*. En el panel izquierdo se muestra el perfil esperado y en el panel derecho el resultado obtenido. Mpb: Marcador de pares de bases, C: p-TARGET no digerido, M2: Digestión p-TARGET con endonucleasas *EcoRV* y *HpaI*, M3: producto de amplificación de hEpo.

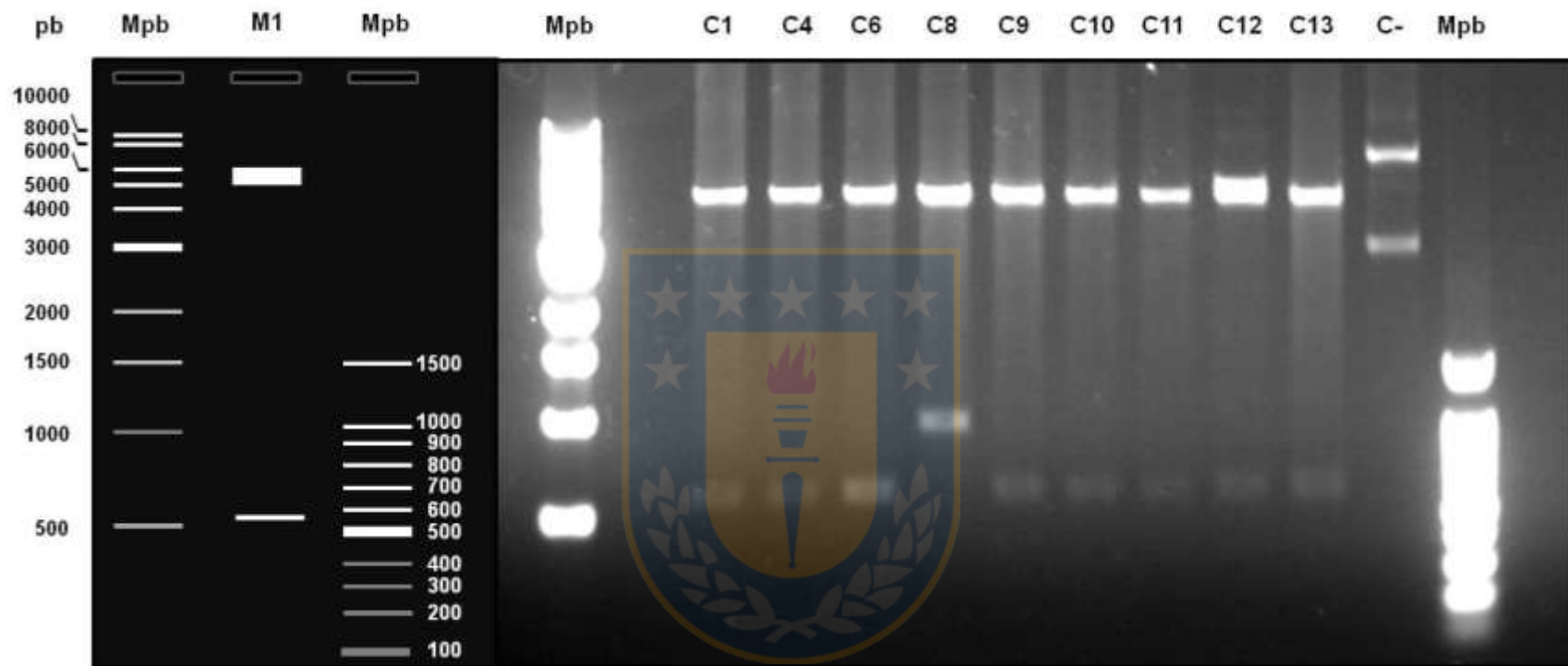


Figura 10. Ensayo de restricción del plásmido p-TARGET y hEpo, utilizando las enzimas *XhoI* y *HpaI*. En el panel izquierdo se muestra el perfil esperado y en el panel derecho el resultado obtenido. Mpb: Marcador de pares de bases, M1: Resultado esperado (5290 pb y 582 pb) luego de digestión con enzimas *XhoI* y *HpaI*, C: Colonia *E. Coli* Top 10, C-: Control negativo.

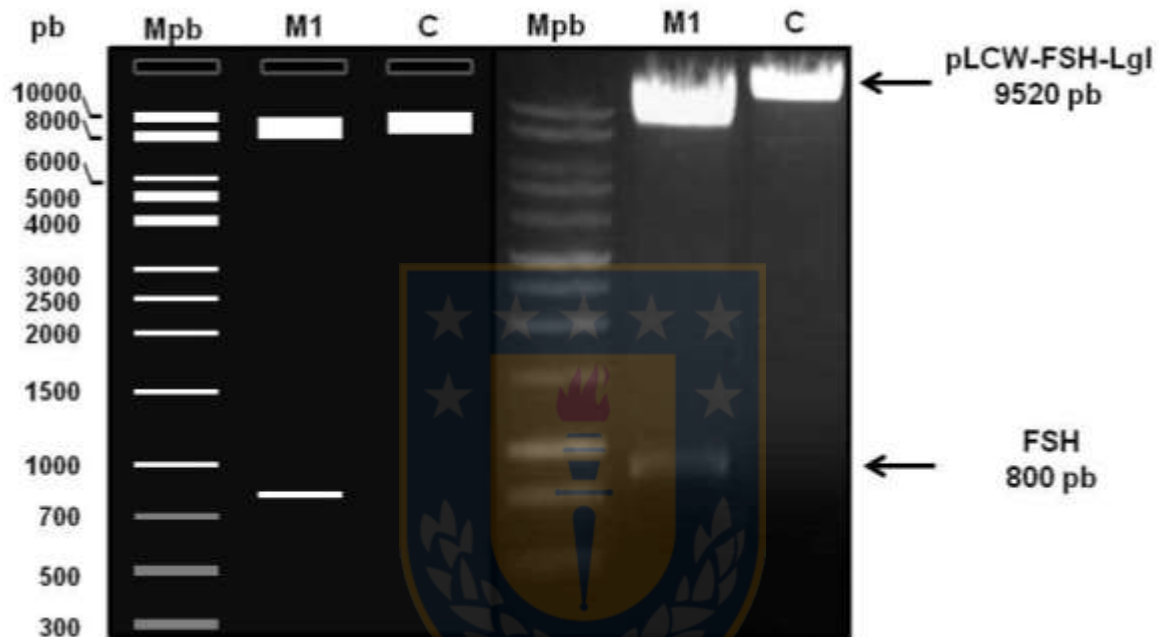


Figura 11. Ensayo de restricción del vector pLCW-FSH-Lgl, utilizando las enzimas *XhoI* y *HpaI*. En el panel izquierdo se muestra el perfil esperado y en el panel derecho el resultado obtenido. Mpb: Marcador de pares de base, M1: plásmido pLCW-FSH-Lgl digerido, C: plásmido pLCW-FSH-Lgl sin digerir.



Figura 12. Ensayo de restricción de pLEpo, utilizando las enzimas *XhoI* y *HpaI*. En el panel izquierdo se muestra el perfil esperado y en el panel derecho el resultado obtenido. Mpb: Marcador de pares de base, M1: bandeo esperado (9520 pb y 582 pb) luego de la digestión enzimática, C: Colonia, C-1: Control plásmido pLCW-FSH-Lgl digerido, C-2: Control plásmido pTARGET-Epo digerido.

1.2 Transfección de células HEK 293-FT para obtención de partículas virales

Para la obtención del vector lentiviral (LEpo) se cotransfectó el plásmido pLEpo junto con tres plásmidos ayudantes (pLP1, PLP2 y pLP/VSVG), los que proporcionaron las proteínas estructurales y de replicación necesarias para la producción del virus en la línea celular HEK 293-FT.

El seguimiento de la transfección se verificó mediante la producción de GFP y el efecto citopático producido por el virus (Figura 13). Luego de 48 horas los medios de cultivo fueron recuperados para aislar las partículas virales.

Finalmente, para confirmar que los lentivirus son capaces de generar hEpo secretada por las células, se transdujeron células HEK 293-A con LEpo. Luego 48 horas, se observó a presencia de hEpo en el sobrenadante de los cultivos de las células transducidas con el lentivirus para hEpo, mientras que no hay señal en los cultivos no transducidos (Figura 14).

Estos resultados demuestran que el lentivirus generado es capaz de infectar células de mamífero, las cuales pueden sintetizar y secretar hEpo al medio de cultivo.

2. Amplificación partículas adenovirales

Para la amplificación del vector adenoviral codificante para Epo (AdEpo), se realizó la transducción de la línea celular HEK 293-A. El seguimiento de la transfección se observó por microscopia de fluorescencia, mediante la producción GFP, y por el efecto citopático que se genera en las células al producir adenovirus (Figura 15). Luego de 48 horas, las células fueron lisadas para la obtención del virus, el cual fue posteriormente titulado.

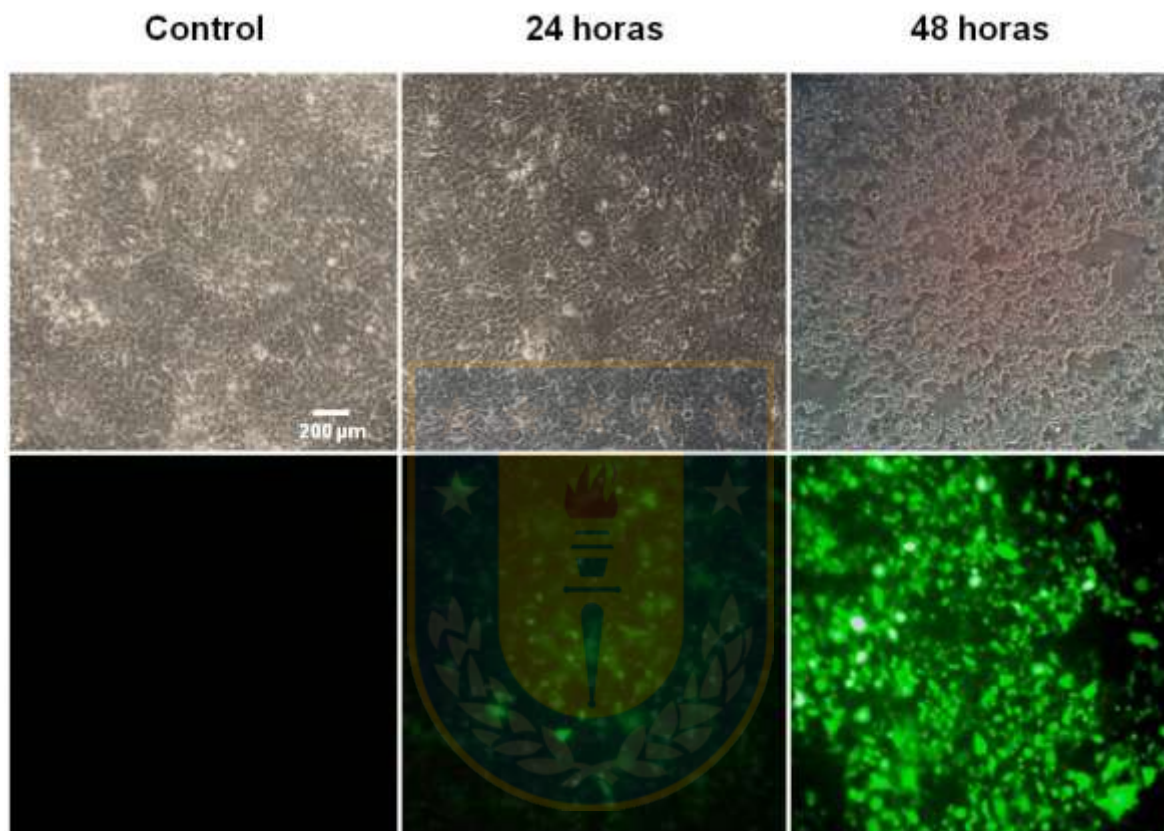


Figura 13. Producción de lentivirus LEpo-GFP en células HEK 293-FT. En los paneles superiores se observan las imágenes en contraste de fase, mientras en los paneles inferiores se presentan las imágenes de fluorescencia. Control: células HEK 293-FT sin transducir. Aumento 10x.

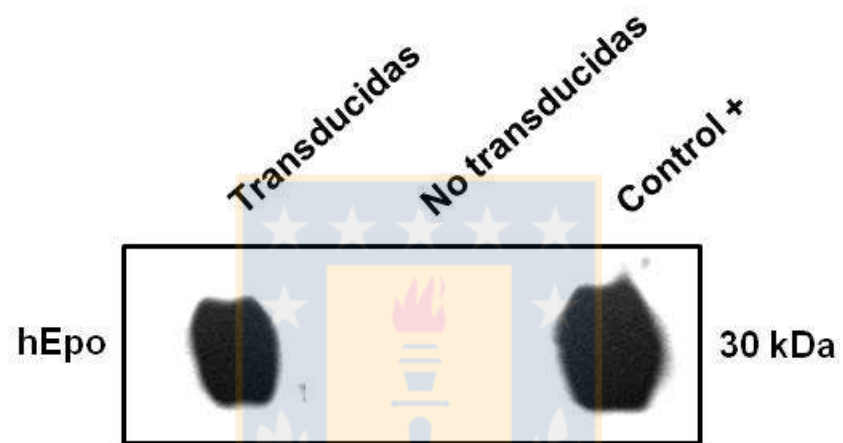


Figura 14. Verificación de la expresión de hEpo en medio de cultivo de células HEK 293-A transducidas con el lentivirus. Control +: hEpo purificada desde medio de cultivo (50 µg).

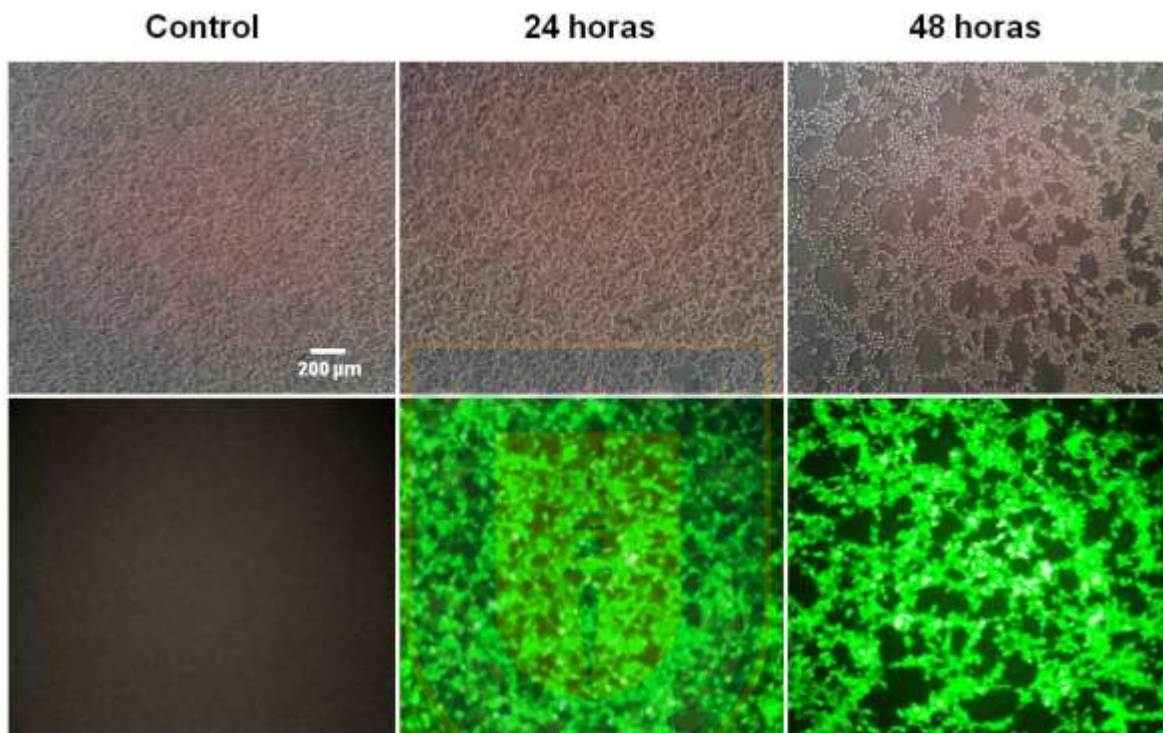


Figura 15. Producción de adenovirus AdEpo-GFP en células HEK 293-A. En los paneles superiores se observan las imágenes en contraste de fase, mientras en los paneles inferiores se presentan las imágenes de fluorescencia. Control: células HEK 293-A no transducidas. Aumento 10x.

3. Aislamiento y cultivo de hEPC

3.1 Características morfológicas

Las hEPC fueron obtenidas desde sangre periférica de sujetos sanos, y se cultivaron en placas recubiertas con fibronectina, en medio suplementados con SBF y VEGF. Bajo estas condiciones, las hEPC se diferencian hacia células endoteliales maduras, distinguiéndose distintos estadios de diferenciación, según el tiempo de cultivo. La Figura 16 muestra a las hEPC luego de 3 días de cultivo, donde se observan células de forma redondeada y aisladas, características propias de células inmaduras. Al día 7, las hEPC comienzan a formar agrupaciones o colonias y presentan una forma más alargada, lo cual se correlaciona con células comprometidas hacia un fenotipo endotelial. Al día 9 de cultivo, estas características se ven acentuadas.

3.2 Expresión de marcadores de diferenciación de hEPC

Utilizando citometría de flujo, se determinó la evolución en el tiempo de la expresión de marcadores de diferenciación de hEPC como CD34, glicoproteína que se expresa en gran porcentaje en células inmaduras y en progenitores hematopoyéticos, y KDR (receptor 2 de VEGF), el cual se expresa mayormente en células endoteliales maduras.

Al realizar los análisis de tamaño (SSC) y complejidad celular (FSC), se observan 4 subpoblaciones de hEPC, denominadas R1, R2, R3 y R4 (Figura 17). La distribución de las células en estas subpoblaciones varía según el tiempo de cultivo. Al hacer un análisis porcentual en cada tiempo, se observa que existe una tendencia a la disminución de R1 y R2 a medida que transcurren los días (3 días, 10,4% y 47%; 7 días, 13,1% y 25,1%; 9 días, 8,9% y 21,3%, respectivamente). Por otro lado, R3 presenta un aumento a los 7 días de cultivo, mientras R4 tiende al incremento a los 9 días (Figura 18). Cabe destacar que estos porcentajes corresponden al 100% de los eventos de las 4 subpoblaciones en un tiempo determinado. Sin embargo, el número absoluto de eventos disminuye conforme pasan los días. En la tabla 6 se muestran las equivalencias entre los porcentajes y el número de eventos en las 4 subpoblaciones.



Figura 16. Características morfológicas de las hEPC a distintos tiempos de cultivo. Aumento 20x.

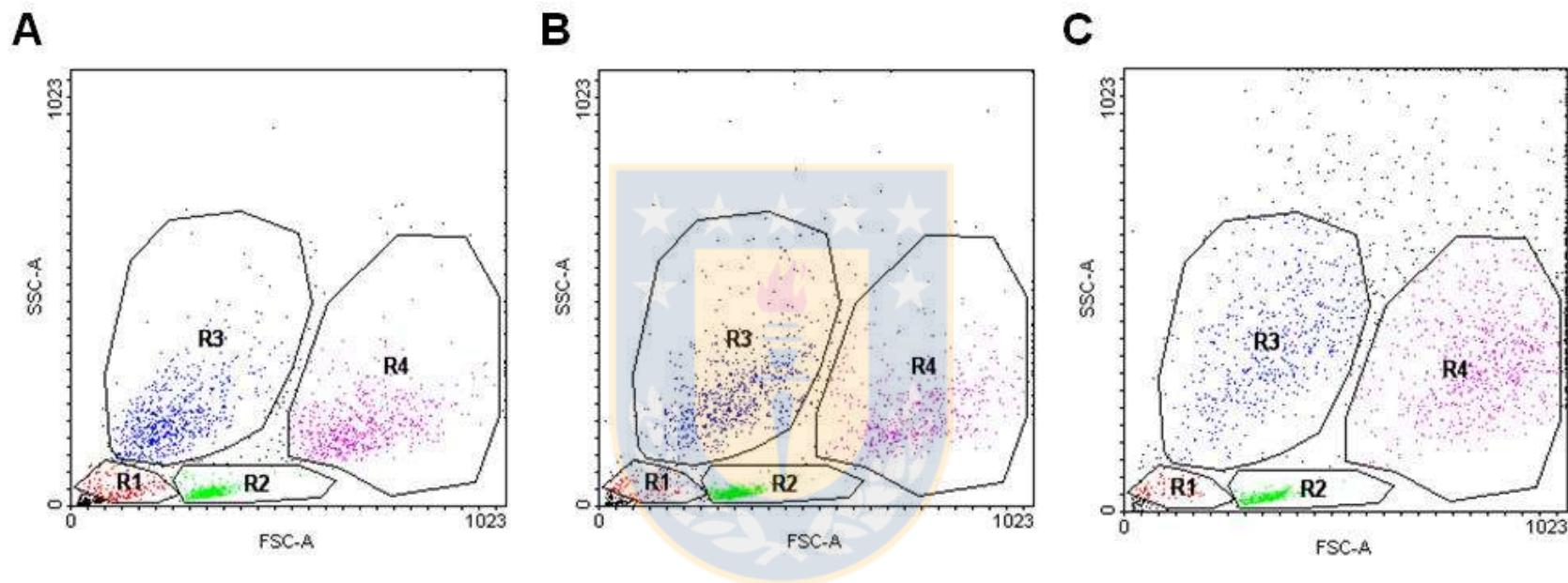


Figura 17. Caracterización fenotípica de hEPC tempranas. Las hEPC fueron analizadas de acuerdo a su tamaño (SSC) y complejidad celular (FSC), luego de 3 días (A), 7 días (B) y 9 días (C) de cultivo. Cada análisis contempla un total de 10.000 eventos. Gráficas representativas de 3 donantes distintos.

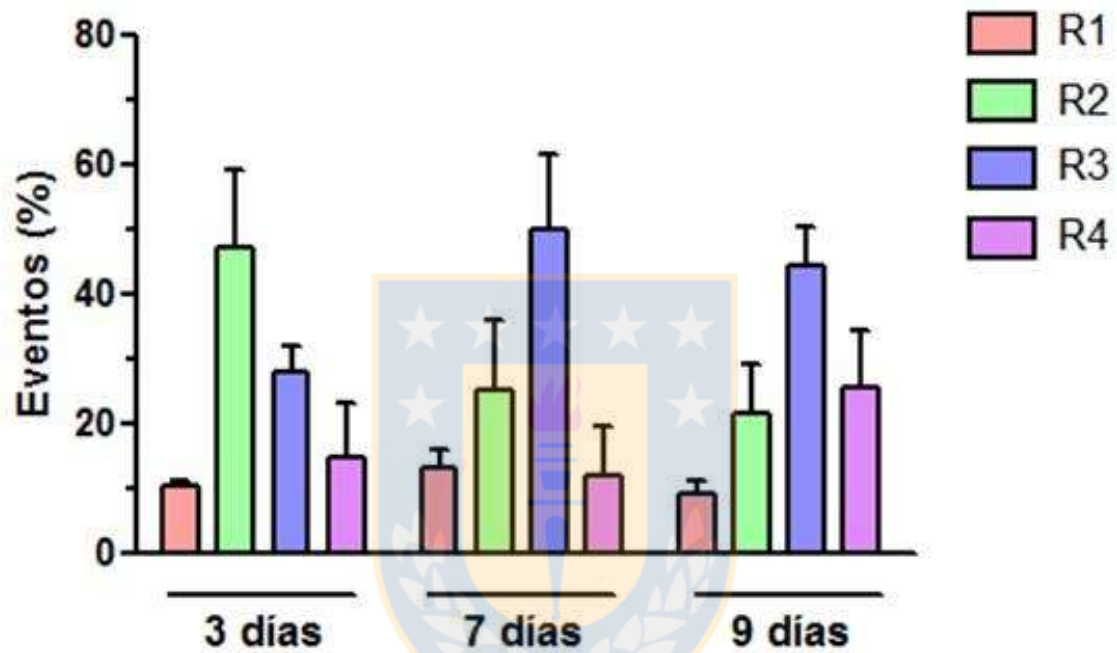


Figura 18. Distribución relativa de cada subpoblación de hEPC, según el tiempo de cultivo. La totalidad de eventos de cada tiempo fue considerada como 100% para ese día de cultivo. n=3 donantes independientes.

Tabla 6. Equivalencia entre los porcentajes y número de eventos de las 4 subpoblaciones.

Subpoblaciones	3 días		7 días		9 días	
	Porcentaje	N° de eventos	Porcentaje	N° de eventos	Porcentaje	N° de eventos
R1	10,4 ± 0,8%	918 ± 86,7	13,1 ± 5,1%	1100 ± 407,5	8,9 ± 3,6%	540 ± 138,1
R2	47 ± 20,7%	4162 ± 1890	25,1 ± 18,9%	2137 ± 1597	21,3 ± 18,6%	1434 ± 1034
R3	27,8 ± 6,9%	2444 ± 562	49,8 ± 20,4%	4190 ± 1573	44,2 ± 10,3%	2737 ± 136
R4	14,8 ± 14,2%	1285 ± 1220	12 ± 12,8%	1043 ± 1151	25,6 ± 15,3%	1680 ± 1242
Total	100 ± 8,6%	8809 ± 785,7	100 ± 7%	8470 ± 555,6	100 ± 6,5%	6391 ± 584,1

Al evaluar marcadores de diferenciación de las hEPC (CD34 y KDR), se observa que en R1 no existen diferencias significativas entre las poblaciones CD34⁺, KDR⁺ y CD34⁺ / KDR⁺, a través del tiempo, a pesar de una tendencia a la baja de CD34⁺ en pos de un aumento del simple marcaje KDR⁺ y principalmente de CD34⁺ / KDR⁺. En R2 se observan resultados similares, alcanzando estos cambios significancia estadística. R3 y R4 presentan un patrón similar entre sí, observándose una señal mínima para KDR⁺, a excepción de R3 al día 3, donde la población simple positiva para este marcador es de un 16%. En ambas subpoblaciones (R3 y R4) se observa una disminución significativa de CD34⁺ en el tiempo, la cual se correlaciona con un aumento significativo del doble marcaje CD34⁺ / KDR⁺ (Figuras 19 y 20).

3.3 Expresión del receptor de eritropoyetina en hEPC

Para verificar la expresión de EpoR en hEPC, se realizó un *western blot*, que deja en evidencia que las hEPC de 4 días presentan una mayor expresión de este receptor que las hEPC de 9 días (40% de diferencia). Además, se observa que la incubación con Epo exógena genera una tendencia al aumento en la expresión de EpoR en hEPC de 4 días, mientras a los 9 días, este efecto es significativo, con respecto a la condición basal de ese tiempo (47% de diferencia). A pesar de ello, la expresión de EpoR a los 9 días de cultivo sigue siendo menor que a los 4 días, incluso luego del estímulo con Epo exógena (Figura 21).

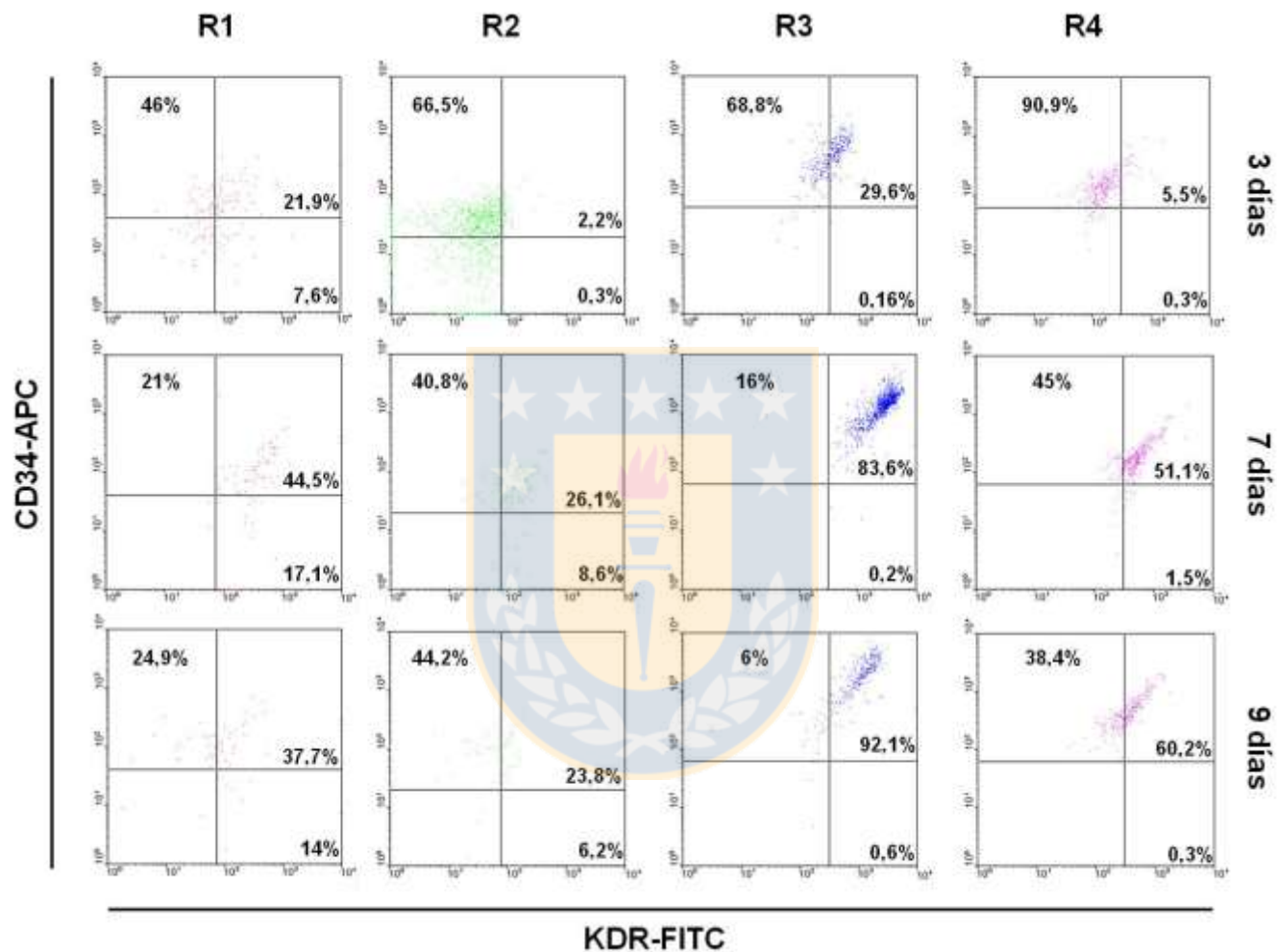


Figura 19. Detección de los marcadores de diferenciación CD34 y KDR en hEPC tempranas. Se presenta el análisis inmunofenotípico de las 4 subpoblaciones (R1, R2, R3 y R4) de hEPC a distintos tiempos de cultivo. Los porcentajes mostrados en la figura son representativos de 3 donantes independientes.

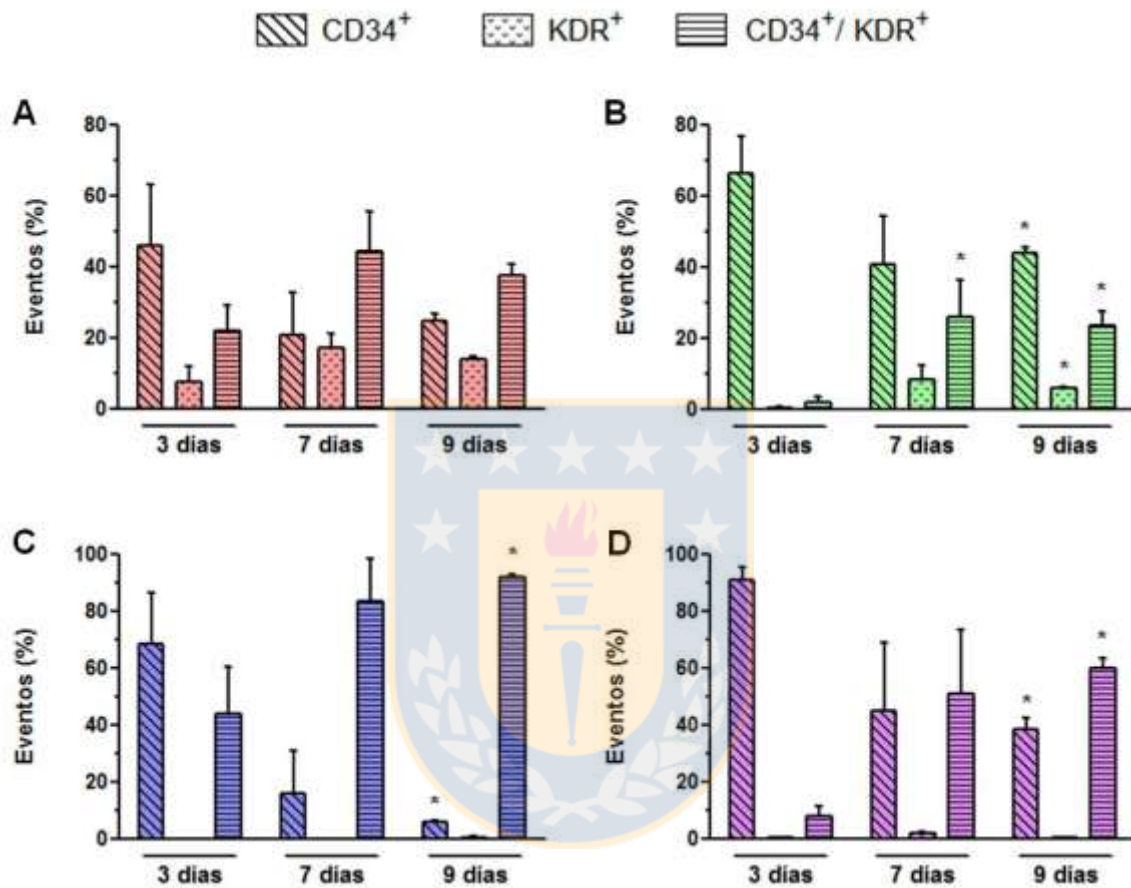


Figura 20. Comparación de marcadores de diferenciación en subpoblaciones de hEPC a través del tiempo. Subpoblación R1 (A), subpoblación R2 (B), subpoblación R3 (C) y subpoblación R4 (D). * $p < 0,05$ con respecto a hEPC de 3 días. $n=3$ donantes distintos.

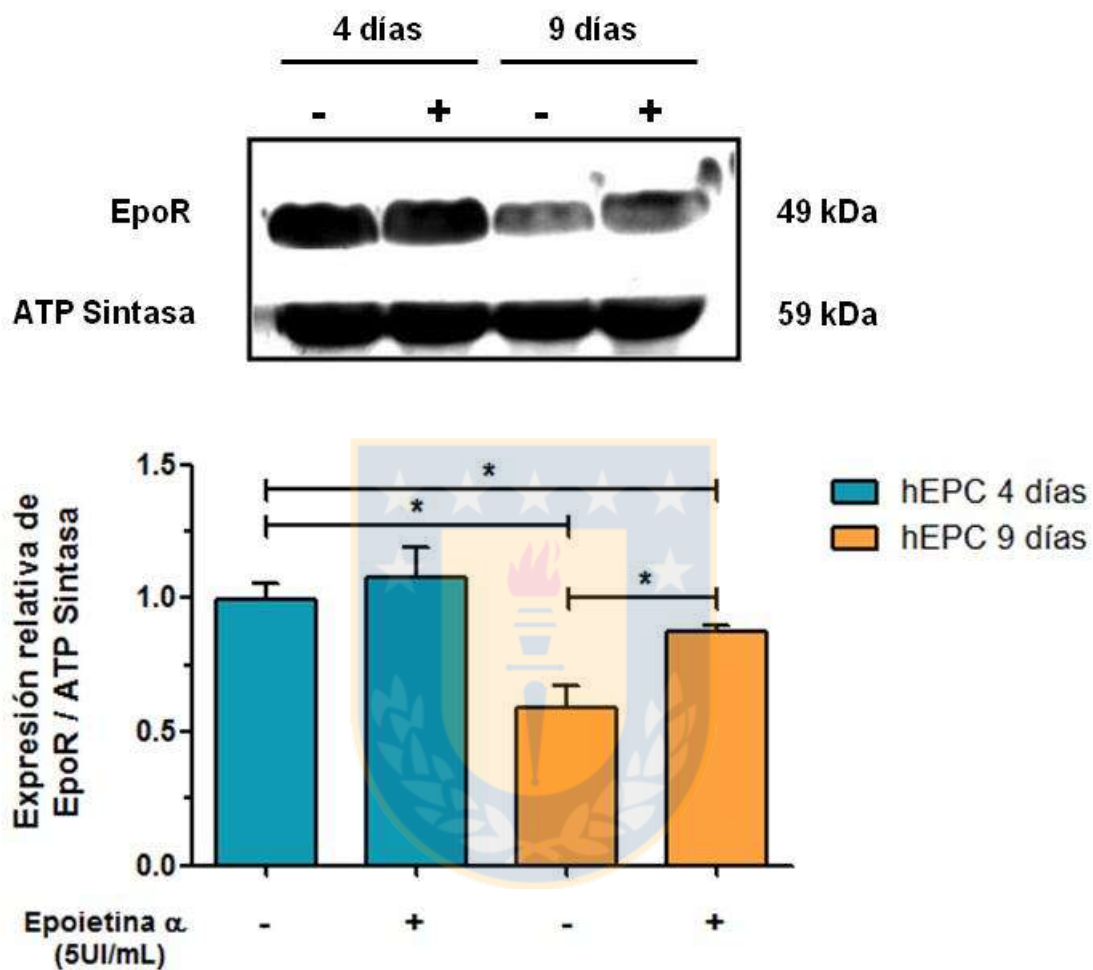


Figura 21. Expresión de EpoR en hEPC tempranas. En el recuadro superior se muestra un western blot representativo de los resultados de la expresión de EpoR, cuya cuantificación se presenta en el gráfico. Epoietina α: Epo exógena. * $p < 0,05$. n=3 experimentos independientes.

4. Transducción de hEPC tempranas con los vectores virales

Obtenidos ambos vectores virales (lentivirus y adenovirus), se realizó una evaluación de su capacidad infectiva en hEPC de 3, 7 y 10 días de cultivo. La eficiencia de la transducción se determinó mediante la expresión de GFP y el efecto citopático que las partículas virales pudieran generar en las hEPC. Al comparar ambos métodos, se observó que el vector lentiviral (LEpo) fue incapaz de transducir a las hEPC en los distintos tiempos de cultivo (Figura 22). Con respecto al adenovirus (AdEpo), a pesar que éste no logró transducir hEPC de 3 días, si las infectó a los 7 y a los 10 días de cultivo. Por lo tanto, se eligió el vector adenoviral y hEPC de 7 días para los siguientes ensayos.

Luego, se realizó la selección del MOI para la transducción de hEPC con adenovirus. La infección se realizó con 50, 100, 150 y 200 UFC/célula (Figura 23). Se observó una fuerte señal de GFP con 150 y 200 UFC/célula, sin embargo, esta última condición generó un efecto citopático importante en las hEPC, determinado por una menor cantidad de células en cultivo y una morfología alterada. Por lo tanto, se seleccionó como MOI 150 UFC/célula. Esta condición permite obtener una transducción óptima de las hEPC de 7 días, alcanzando un 80% de células infectadas.

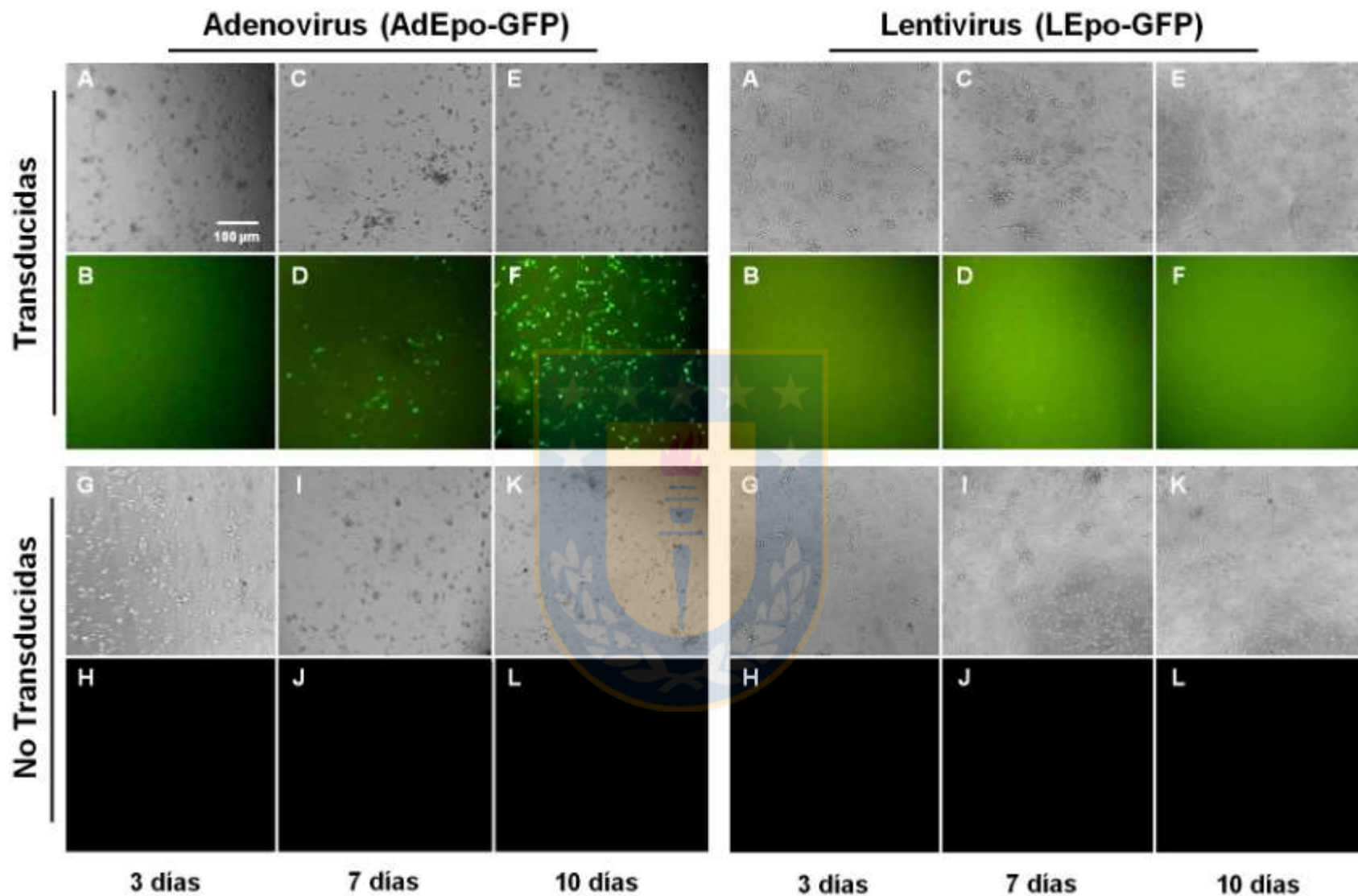


Figura 22. Comparación de la transducción de hEPC tempranas con los vectores virales. En los paneles A-F, se presentan hEPC transducidas, mientras G-L corresponden a los controles sin transducir, para los distintos tiempos de cultivo. Para cada caso, se muestra en el panel superior las imágenes con contraste de fase (A, C, E, G, I, K) y en el panel inferior las imágenes de fluorescencia (B, D, F, H, J, L). Adenovirus: 100 pv/célula y Lentivirus: 5 μ L. Aumento 20x.

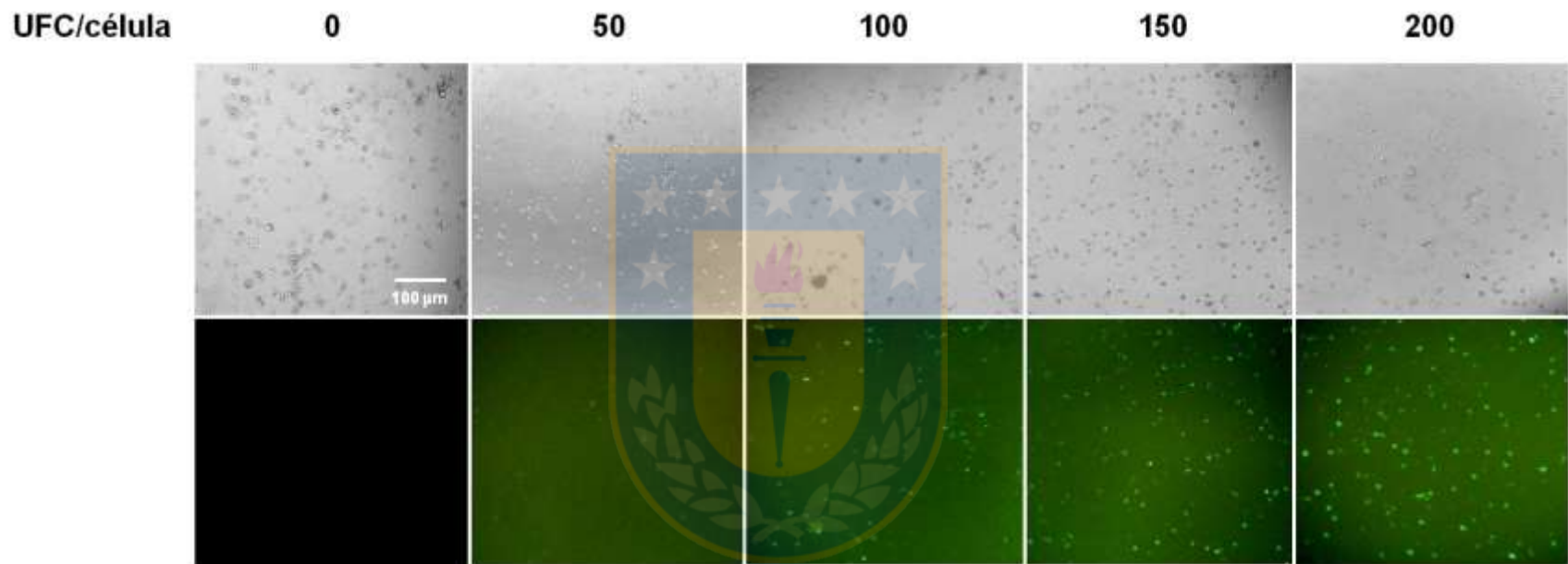


Figura 23. Determinación del MOI para el vector adenoviral. hEPC de 9 días transducidas con diferentes cantidades de partículas virales de AdEpo-GFP. En el panel superior se muestran imágenes con contraste de fase y en el panel inferior se presentan las imágenes de fluorescencia. Las imágenes fueron obtenidas luego de 48 horas de transducción. Aumento 20x.

5. Expresión de eritropoyetina por hEPC transducidas con el vector adenoviral

Para verificar que las hEPC transducidas con AdEpo generaban eritropoyetina humana (hEpo), se realizó un ensayo de western blot, utilizando lisados de estas células (Figura 24). Se observó que hEPC transducidas con AdEpo expresan hEpo (30 kDa), mientras que el control de infección (AdMock) no induce la expresión de esta proteína. Además en condiciones basales, las hEPC de 7 días no expresan hEpo. Esto confirma que la infección de hEPC tempranas con el vector adenoviral genera la expresión de hEpo.

6. Evaluación de la proliferación de hEPC transducidas con el vector adenoviral

Mediante el método de Alamar Blue, se determinó el efecto autocrino de hEpo en las hEPC transducidas con AdEpo (Figura 25).

Si bien existe un pequeño aumento de la proliferación de hEPC transducidas con AdEpo (alrededor de 8%), en comparación con las hEPC nativas y con hEPC-AdMock, este efecto no alcanza significancia estadística. Por otro lado, no se muestran diferencias entre los porcentajes de proliferación de hEPC nativas y hEPC-AdMock, por lo tanto, se demuestra que el virus propiamente tal no genera cambios en la proliferación de estas células, tampoco la hEpo secretada por las hEPC-AdEpo.

De forma sorpresiva, Epoietina α (Epo exógena) no genera cambios en la proliferación en las hEPC. Esto podría deberse a las características propias de esta isoforma sintética, ya sea porque ella no produce efecto proliferativo en estas células o porque requiere concentraciones mayores para realizarlo. La ausencia de efecto de Epoietina sobre la proliferación de hEPC se condice con lo observado por microscopía óptica (datos no mostrados), lo que respalda los resultados obtenidos por Alamar Blue y descarta algún posible error en la técnica de detección.



Figura 24. Expresión de hEpo por hEPC transducidas con adenovirus. hEPC de 7 días fueron cultivadas en condiciones estándar (basal) o transducidas ya sea con 150 UFC/célula del vector adenoviral de expresión para hEpo (AdEpo-GFP) o con el vector vacío (AdMock-GFP). Los análisis de western blot fueron realizados 48 h post-infección. Control +: Epoietina α (50 μ g).

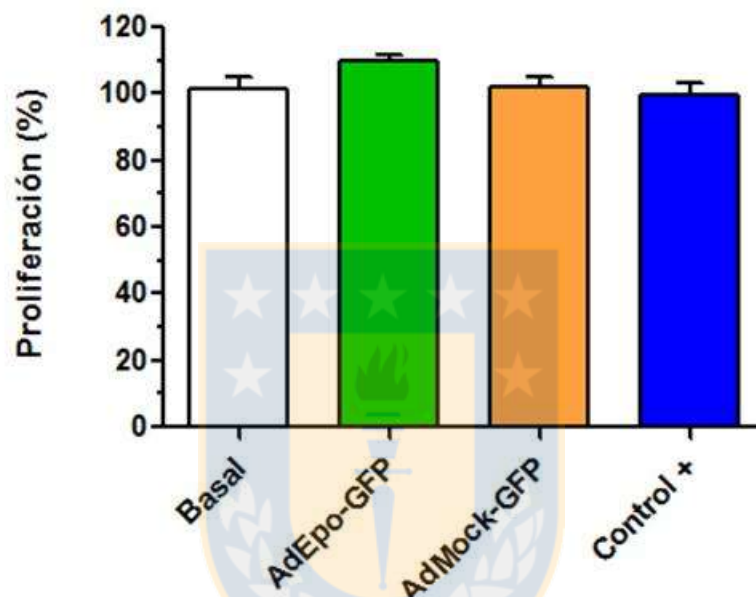


Figura 25. Efecto de la transducción con el vector adenoviral en la proliferación de hEPC. La proliferación fue cuantificada 48 horas luego del tratamiento con AdEpo-GFP o con AdMock-GFP (150 UFC/célula). Basal: hEPC nativas sin transducir, control +: hEPC tratadas con Epoietina α (5 UI/mL). n=4 experimentos independientes.

7. Evaluación de la apoptosis en hEPC transducidas con el vector adenoviral

Para verificar si la transducción con el vector adenoviral generaba algún grado de apoptosis en las hEPC de 7 días de cultivo, se evaluó la actividad de las caspasa 3, una cistein-proteasa efectora en los procesos apoptóticos.

Como se muestra en la Figura 26, la transducción con vectores virales no presenta una variación importante en el grado de apoptosis, al compararla con las células no transducidas ($0,4 \pm 3,3\%$ v/s $2,6 \pm 3,8\%$ y $3,0 \pm 3,6\%$, correspondiente al basal v/s AdEpo y AdMock). Por el contrario, células privadas de suero por 24 horas (control positivo), presentan un aumento significativo de la apoptosis (47% , $p < 0,001$), con respecto a células no transducidas, demostrando la capacidad de esta técnica para detectar apoptosis de hEPC.



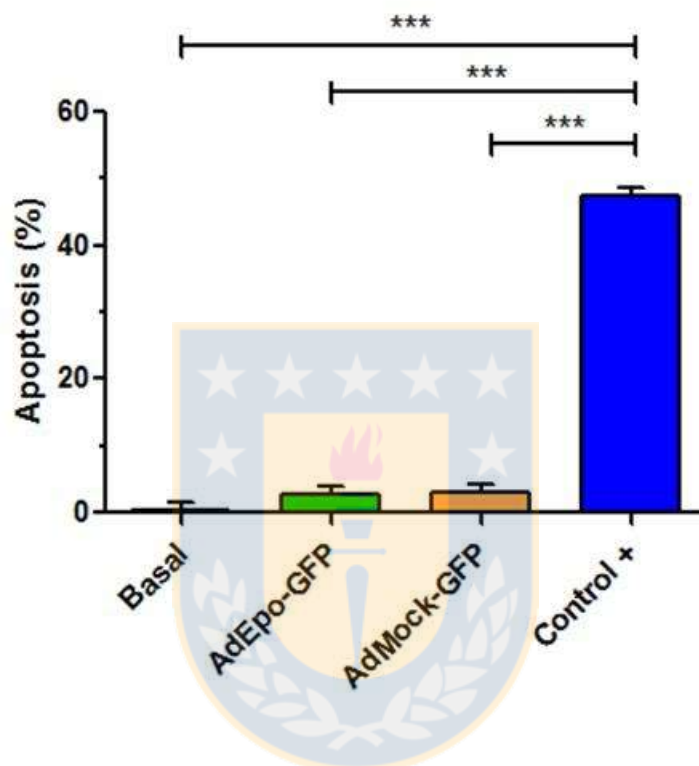


Figura 26. Efecto de la transducción con el vector adenoviral sobre la apoptosis de hEPC. La actividad de la capasa 3 fue determinada luego de 48 horas de incubación en condiciones basales (sin transducir, basal) o post-tratamiento con AdEpo-GFP o AdMock-GFP (150 UFC/célula). Como control positivo se utilizó hEPC deprivadas de suero por 24 horas. *** $p < 0,0001$. $n=3$ experimentos independientes.

8. Evaluación genotípica de marcadores de diferenciación de hEPC

Para determinar si la transducción de hEPC con adenovirus modifica la expresión de marcadores de superficie, como CD34, KDR y CD31, se realizó un análisis por RT-qPCR. Esta técnica fue escogida, puesto que la citometría de flujo utilizada en la caracterización de las hEPC tempranas, es incompatible con la expresión de GFP por las células transducidas. En la Figura 27 se muestran las curvas de eficiencia de los partidores para CD34, KDR, CD31 y 18S (gen de referencia), determinada en células endoteliales de cordón umbilical (HUVEC). Estas gráficas muestran que para los 4 genes se obtienen eficiencias cercanas a 1, las cuales se consideran aceptables y en el rango lineal de amplificación de la técnica para utilizar el método de cuantificación relativo.

Al comparar los niveles de mensajero entre hEPC nativas y hEPC transducidas con AdEpo y AdMock, no se observan cambios significativos en CD31. Sin embargo, para CD34 y KDR, se observa una disminución significativa de la expresión de mensajero al transducir las hEPC con ambos vectores virales. Para las hEPC-AdEpo, se produce una disminución de un 74,8% ($p<0,05$) para el mensajero de CD34 y de un 68,3% ($p<0,05$) para KDR, mientras para hEPC-AdMock, estas disminuciones alcanzan un 79,6% ($p<0,05$) y un 81,2% ($p<0,05$), respectivamente (Figura 28). Cabe señalar que los niveles de CD34 y KDR no difieren entre las células infectadas con AdEpo o AdMock. Por lo tanto, las diferencias encontradas con respecto a las células sin transducir se deben a la presencia del virus y no a la secreción de hEpo.

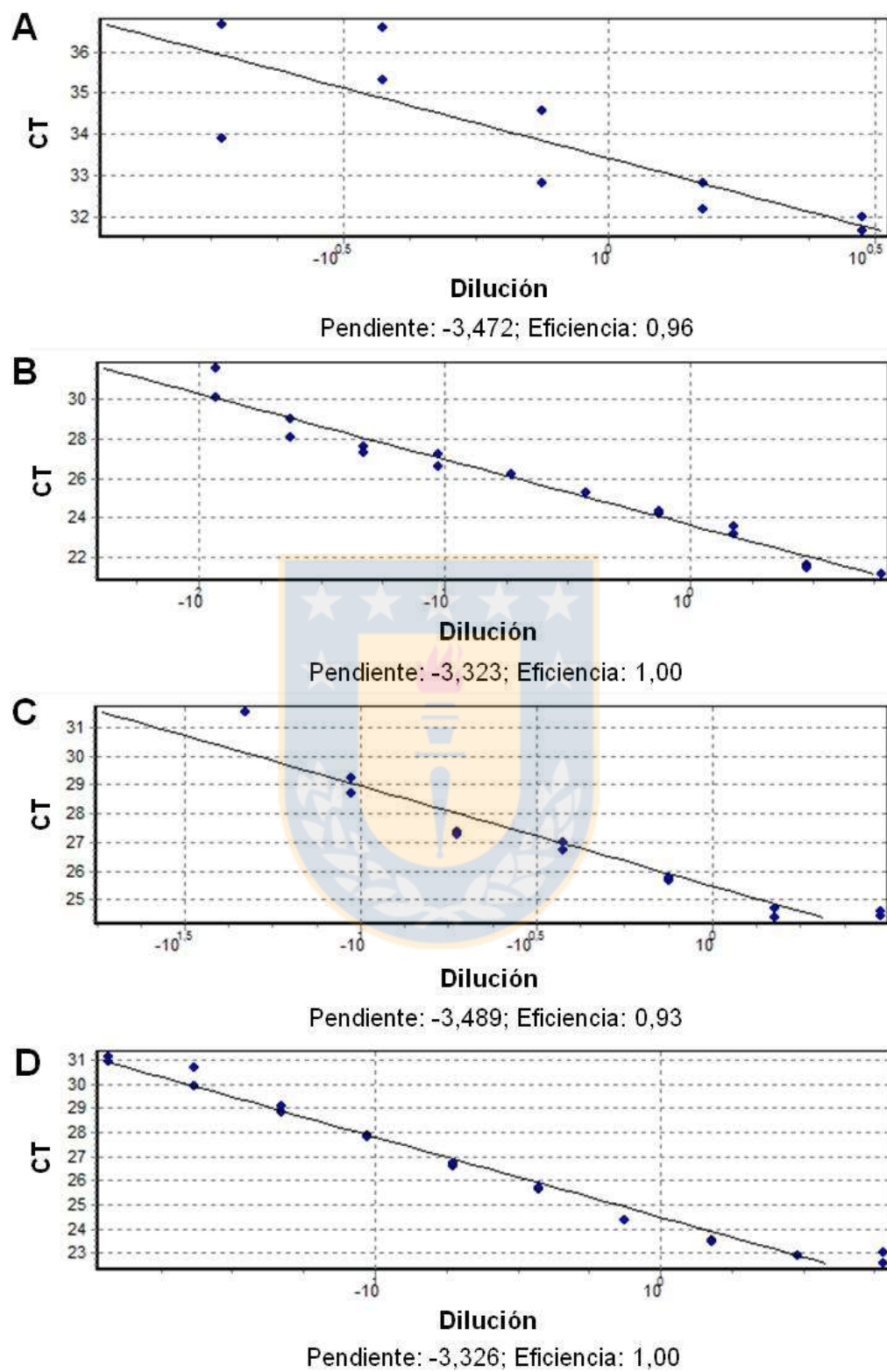


Figura 27. Curvas de eficiencia de marcadores de diferenciación de hEPC. (A) CD34, (B) KDR, (C) CD31 y (D) 18S (gen de referencia).

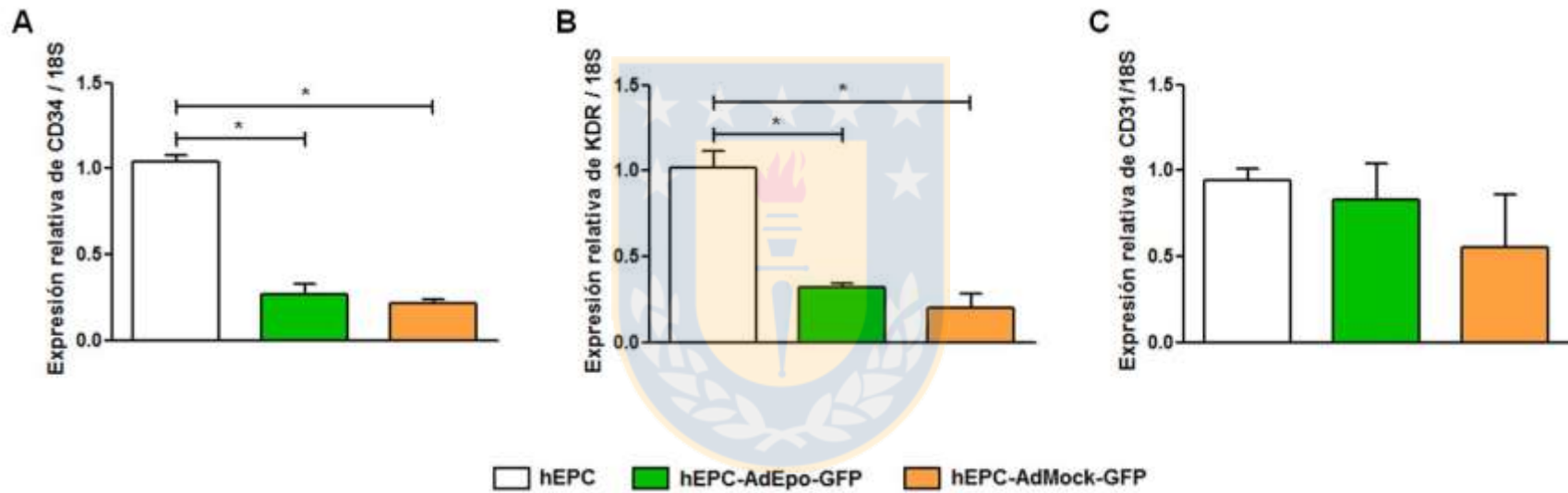


Figura 28. Niveles de expresión de ARNm de marcadores de diferenciación de hEPC de 9 días. Expresión relativa del ARNm de CD34 (A), KDR (B) y CD31 (C) con respecto a 18S (gen de referencia). * $p < 0,05$. $n=3$ experimentos independientes.

9. Determinación del potencial angiogénico de hEPC productoras de eritropoyetina humana

9.1 Evaluación de la angiogénesis en membranas corioalantoídeas

La capacidad de las hEPC para favorecer la angiogénesis fue determinada *in vivo*, mediante la inoculación de estas células en las membranas corioalantoídeas de huevos fertilizados. Se cuantificó, utilizando el *software* Image J, la longitud, el número de puntos de ramificación y el área total de los vasos sanguíneos, a partir de una imagen digital, la cual fue procesada mediante la sustracción del ruido de fondo y *thresholding*. Estos pasos permiten obtener una imagen monocromática, cuantificable.

Para llevar a cabo el ensayo, se realizó primero una estandarización, donde se evaluaron distintas cantidades de hEPC en la inoculación de las membranas corioalantoídeas y el tiempo requerido para evaluar el efecto angiogénico. Como se muestra en las Figuras 29 y 30, existe un aumento de la angiogénesis en el tiempo, luego de la inoculación de hEPC de 9 días. Sin embargo, al día 5 la detección de pequeños cambios en la angiogénesis, principalmente de aumentos, se vuelve dificultosa, debido al avance generado por el proceso normal del desarrollo embrionario del huevo (Figura 29). Por lo tanto, se selecciona el día 3 post-inoculación como la condición a utilizar en los ensayos posteriores.

De acuerdo al número de células a utilizar, no se muestran mayores cambios en cuanto a la longitud de estructuras tubulares y al número de puntos de ramificación al comparar las 3 condiciones (100.000, 300.000 y 500.000 células) en relación a la condición basal (medio EPC), pero sí se observa una tendencia al aumento con 300.000 al evaluar el área total de las estructuras tubulares ($28 \pm 12,7 \text{ mm}^2$ v/s $17,6 \pm 6,4 \text{ mm}^2$) (Figura 30), Por esto, se seleccionó la condición de 300.000 hEPC para realizar los ensayos posteriores.

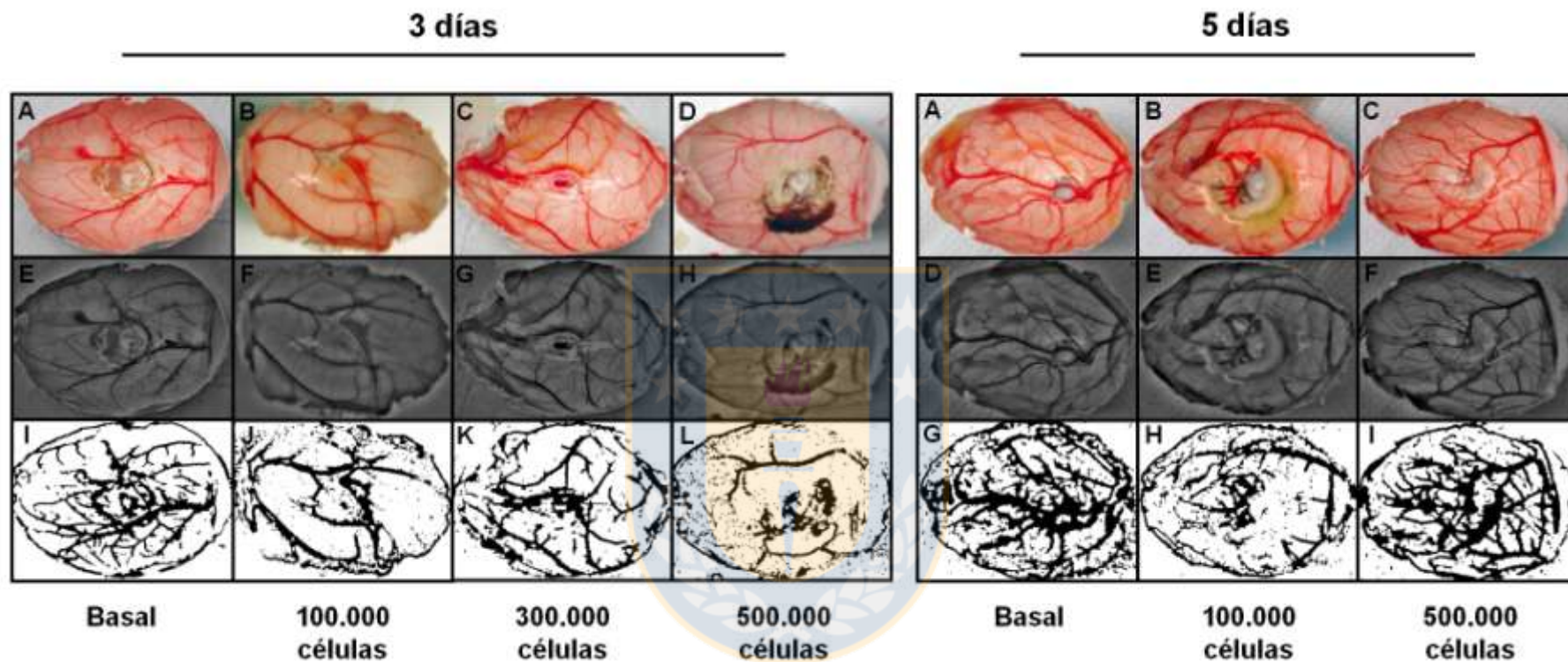


Figura 29. Estandarización del ensayo de angiogénesis *in vivo*. Imágenes representativas del tercer y quinto día post-inoculación de hEPC de 9 días en membranas corioalantoídeas de huevos fertilizados. En los paneles superiores (en colores) e intermedio (escala de grises) se muestran las imágenes representativas de fotografías digitales. Los paneles inferiores (blanco y negro) corresponden a imágenes procesadas con el *software* Image J. Condición basal: medio EPC sin suero ni factores de crecimiento.

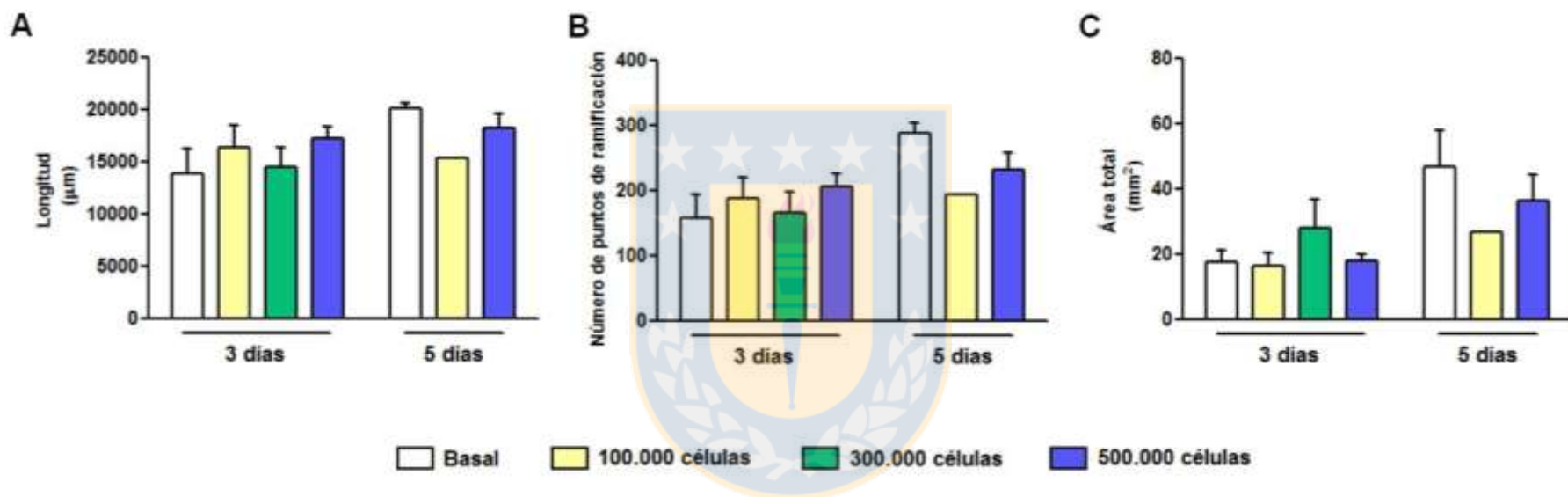


Figura 30. Cuantificación de la angiogénesis *in vivo*. Se cuantificó la formación de vasos sanguíneos en membranas corioalantoideas de embriones de pollo al tercer y quinto día post-inoculación de hEPC de 9 días. Condición basal: medio EPC sin suero ni factores de crecimiento. n=2 experimentos independientes.

Luego de seleccionar las condiciones, se procedió a realizar el ensayo, utilizando distintas moléculas que pudieran servir como controles positivos. Como se muestran en las Figuras 31 y 32, VEGF (150 $\mu\text{g/mL}$) fue la molécula que generó la mayor tendencia al aumento en todos los parámetros angiogénicos evaluados, al compararlo con la condición basal (longitud: 18.066 ± 3.919 μm v/s 13.376 ± 4.022 μm ; número de puntos ramificación: 188 ± 41 v/s $154 \pm 81,4$; área total: $41,2 \pm 11,4$ mm^2 v/s $30,6 \pm 1,5$ mm^2). Por lo tanto, fue escogido como control positivo para los ensayos posteriores. En relación a HDL (100 $\mu\text{g/mL}$), se observó igualmente una tendencia al aumento de la angiogénesis, en comparación con la condición basal; sin embargo, esto ocurrió sólo en la longitud (16.138 ± 3.236 μm v/s 13.376 ± 4.022 μm) y en el número de puntos de ramificación ($204 \pm 53,6$ v/s $154 \pm 81,4$). Similar a ensayos anteriores, Epoietina α no produjo cambios en la angiogénesis, en el modelo de huevos fertilizados.

Luego de estandarizar, se evaluó el potencial angiogénico de las hEPC de 9 días productoras de eritropoyetina humana. En las Figuras 33 y 34, se muestra que las hEPC-AdEpo favorecen la angiogénesis en este modelo *in vivo*, generando un aumento significativo de la longitud (94,2%), número de puntos de ramificación (162,8%) y área total (189,6%) de los vasos sanguíneos, con respecto al efecto de hEPC no transducidas (longitud: 20.561 ± 6.498 μm v/s 10.583 ± 2.837 μm , $p < 0,001$; números de puntos ramificación: $249 \pm 96,7$ v/s $94 \pm 35,2$, $p < 0,001$; área total: $47,5 \pm 9,8$ mm^2 v/s $16,4 \pm 12,5$ mm^2 , $p < 0,01$). Al inocular las membranas corioalantoideas con hEPC-AdMock, no se observan diferencias con respecto a las hEPC no transducidas. Por lo tanto, queda en evidencia que el virus propiamente tal no influye en la formación de vasos sanguíneos en este modelo de estudio. En cuanto a las hEPC coincubadas con Epoietina α , se observó una tendencia al aumento en la longitud (29,2%) y en el número de puntos de ramificación (59,4%), con respecto a las hEPC (longitud: 13.677 ± 3.827 μm v/s 10.583 ± 2.837 μm ; número de puntos ramificación: $151 \pm 57,1$ v/s $94 \pm 35,2$), no así al evaluar el área total de los vasos sanguíneos, donde no se observan diferencias con las hEPC no transducidas.

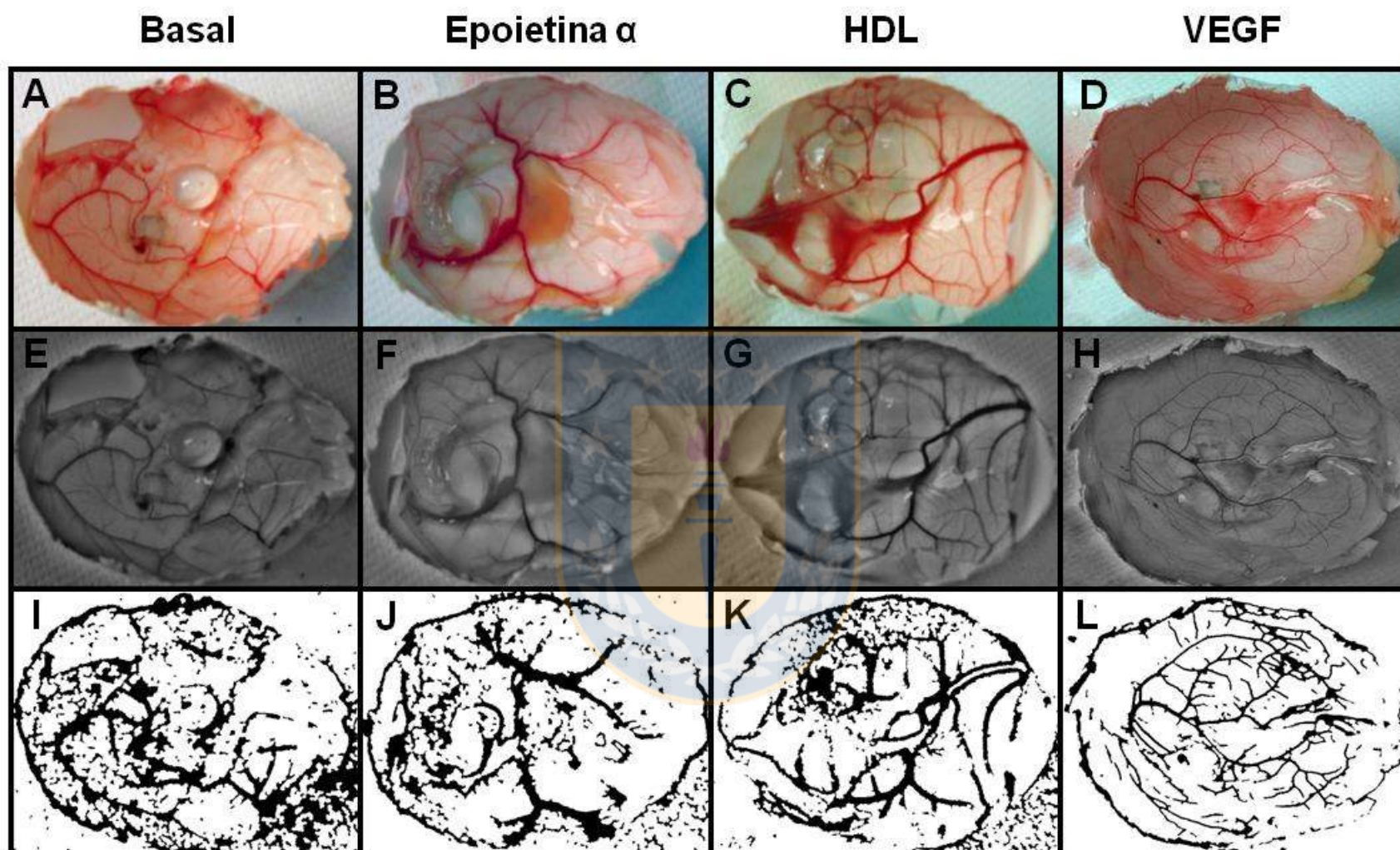


Figura 31. Evaluación de controles positivos, para los ensayos de angiogénesis *in vivo*. Imágenes representativas del tercer día post-inoculación en membranas corioalantoideas de huevos fertilizados. En los paneles superiores (A-D) e intermedios (E-H) se muestran las imágenes representativas de fotografías digitales y en los paneles inferiores (I-L) se presentan las imágenes procesadas con el software Image J. Condición basal: Medio EPC sin suero ni factores de crecimiento, Epoietina α 5 UI/mL, HDL 100 μ g/mL, VEGF 150 μ g/mL.

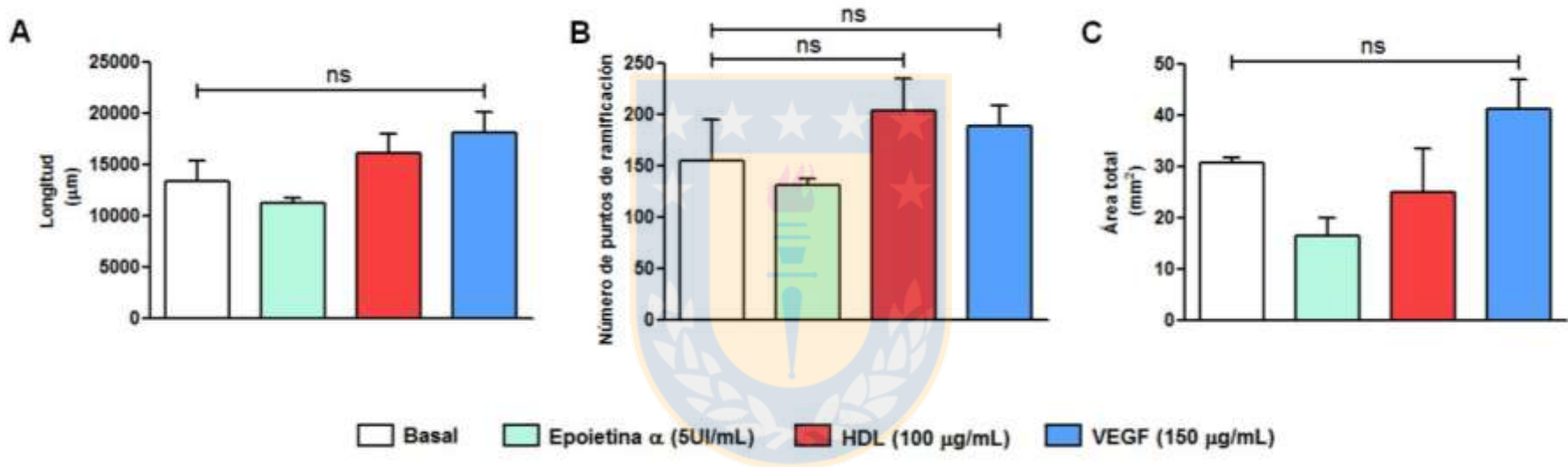


Figura 32. Cuantificación de la angiogénesis *in vivo*, utilizando distintos controles positivos. Se cuantificó la formación de vasos sanguíneos en membranas corioalantoídeas de embriones de pollo, al tercer día post-inoculación. Condición basal: medio EPC sin suero ni factores de crecimiento. n=3 experimentos independientes.

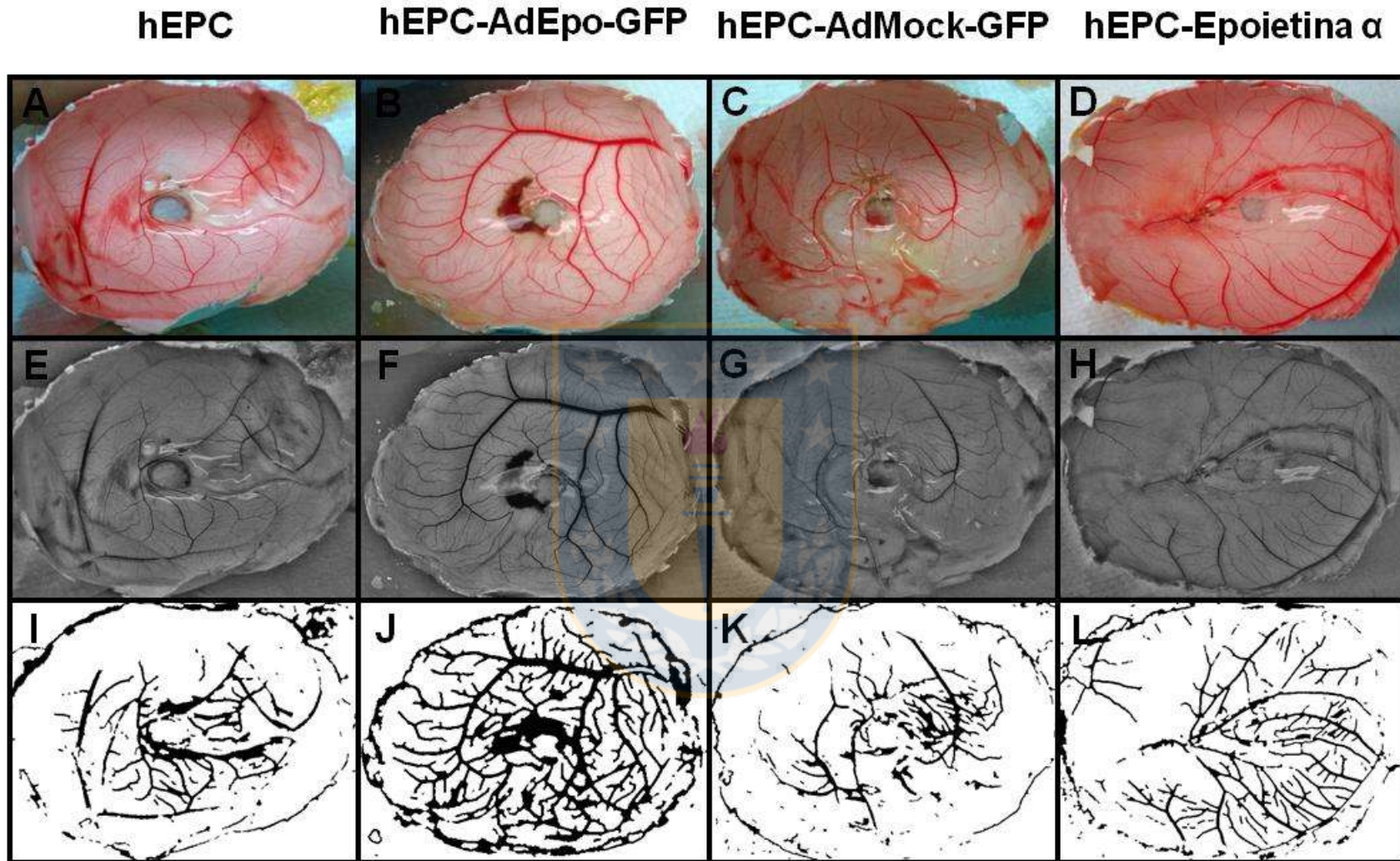


Figura 33. Evaluación del efecto de hEPC de 9 días transducidas en la angiogénesis *in vivo*. Imágenes representativas del tercer día post-inoculación. En los paneles superiores (A-D) e intermedios (E-H) se muestran imágenes representativas de fotografías digitales y en los paneles inferiores (I-L) se presentan las imágenes procesadas con el *software* Image J. hEPC: células no transducidas, hEPC-Epoietina α : células inoculadas con Epoietina α (5 UI/mL).

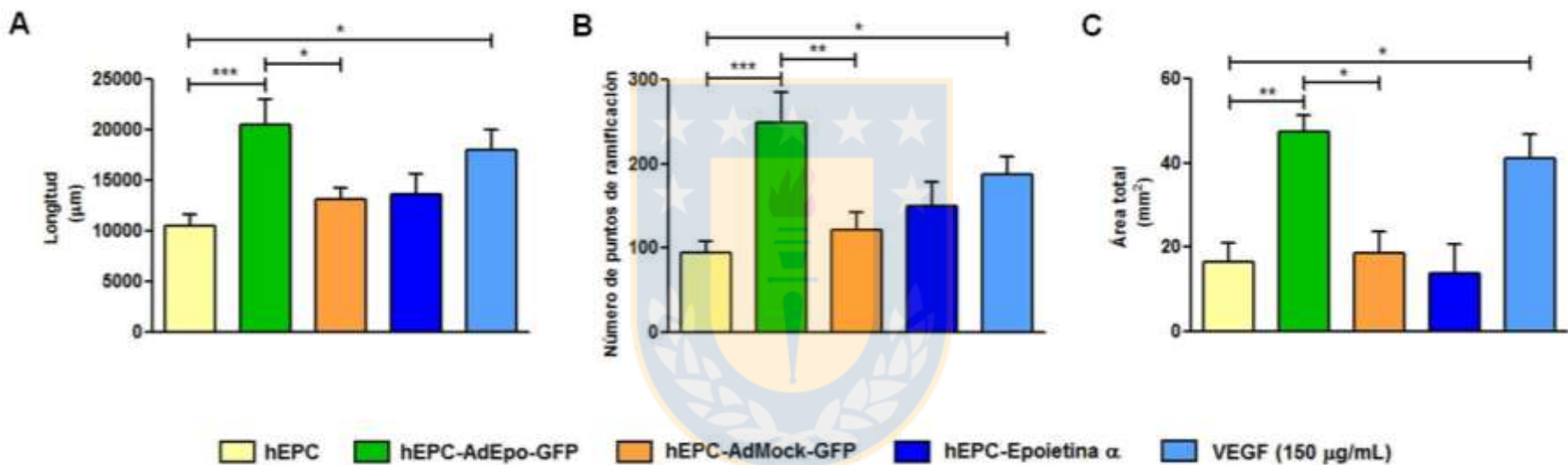


Figura 34. Cuantificación del efecto de hEPC de 9 días transducidas en la angiogénesis *in vivo*. Se cuantificó la formación de vasos sanguíneos en membranas corioalantoideas de embriones de pollo, al tercer día post-inoculación. hEPC: células no transducidas, hEPC-Epoietina α: células incubadas con Epoietina α (5 UI/mL). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. $n = 3$ experimentos independientes.

9.2 Evaluación de la angiogénesis en anillos aórticos

Para determinar si el efecto angiogénico que se observó con hEPC-AdEpo es dependiente de las hEPC o de las citoquinas que ellas secretan (VEGF, IL-8 o la propia hEpo producida por las células transducidas), se realizó un ensayo preliminar, utilizando los medios de cultivo de las células transducidas (medios condicionados) en anillos aórticos de ratón. En este modelo se cuantificaron los vasos sanguíneos que emergen del anillo aórtico, evaluando parámetros de longitud, número de ramificaciones y área.

A modo de estandarizar la técnica, se utilizaron distintos controles, tales como: condición basal (anillos incubados con medio Opti-MEM), medio EPC, Epoietina α (5 y 10 UI/mL), ApoA-I (100 μ g/mL) y VEGF (150 μ g/mL) para comprobar que este modelo es capaz de responder a estímulos angiogénicos. Como resultado se observó que existe una tendencia al aumento con todos los controles, con respecto a la condición basal, en los 3 parámetros angiogénicos evaluados. Sin embargo, Epoietina α (10 UI/mL) muestra el mayor aumento (longitud: 4,4 veces, número de puntos de ramificación: 21 veces y área total: 5 veces). Por lo tanto, Epoietina α (10 UI/mL) fue escogido como control positivo para este ensayo (Figura 35 y 36).

Luego de evaluar la respuesta del modelo frente a moléculas angiogénicas, se analizaron los medios condicionados sin concentrar y concentrados a la mitad, de cultivos de hEPC nativas, hEPC coincubadas con Epoietina α (5 UI/mL), hEPC transducidas con AdEpo o con AdMock; todas ellas de 9 días de cultivo. Al evaluar los medios condicionados sin concentrar, se observa un aumento en la longitud (1,6 veces), en el número de puntos de ramificación (7,6 veces) y en el área total (1 vez), en la condición hEPC-AdEpo con respecto a las hEPC sin transducir (Figuras 37 y 38). Este efecto es dependiente de la presencia de hEpo, puesto que la angiogénesis realizada en presencia del medio condicionado de hEPC-AdMock no difiere de la correspondiente a hEPC sin transducir.

Finalmente, al evaluar los medios condicionados concentrados, se observa un mayor aumento de la angiogénesis con el medio hEPC-AdEpo, en relación al medio de hEPC no transducidas (longitud: 2,8 veces, número de puntos de ramificación: 12,4 veces y área total: 23,3 veces). Estos efectos son dependientes de la presencia de hEpo, ya que el medio condicionado de hEPC-AdMock no genera estos cambios. También se observa un aumento con el medio condicionado de hEPC-Epoietina α , aunque menor a la condición anterior, en los 3 parámetros evaluados (1,6; 7,6 y 10 veces, respectivamente) (Figuras 39 y 40).

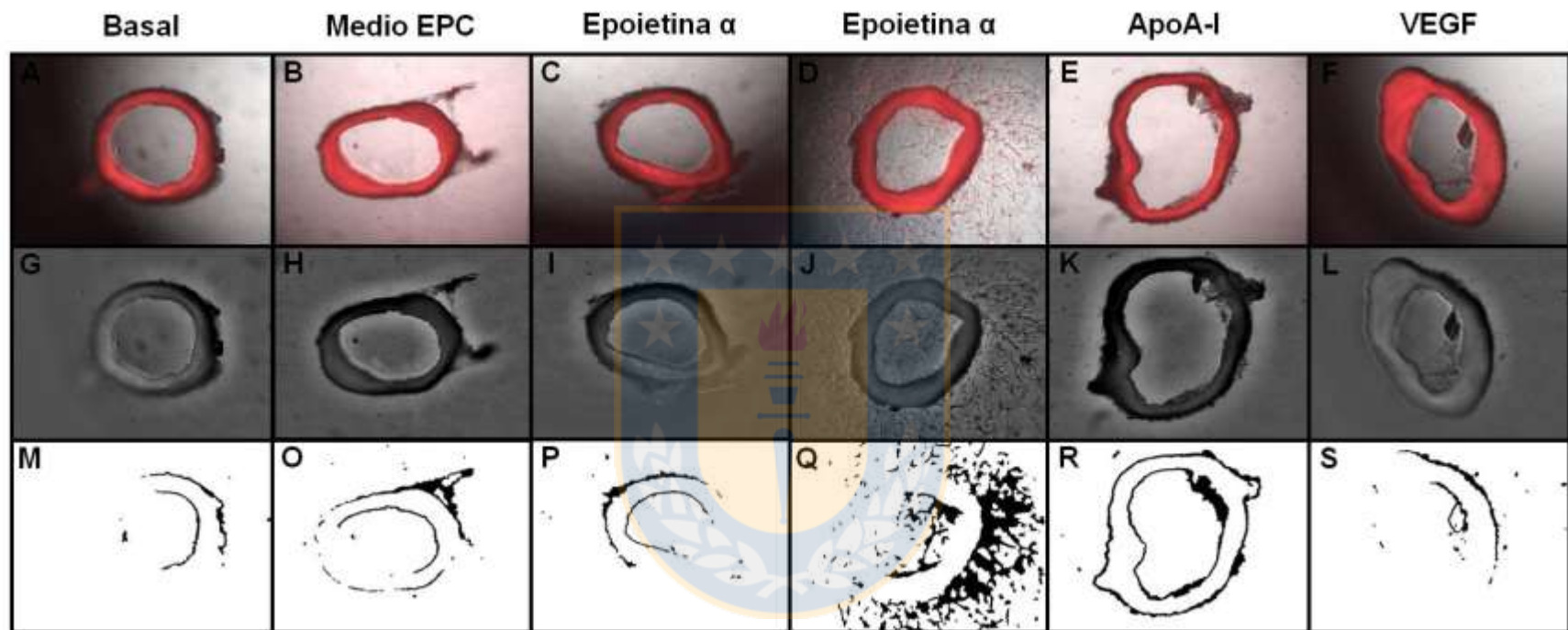


Figura 35. Evaluación de moléculas angiogénicas, para los ensayos de angiogénesis *ex vivo*. Imágenes representativas de anillos aórticos de ratón, al séptimo día de incubación con los estímulos. En los paneles superiores (A-F) e intermedios (G-L) se muestran imágenes representativas de fotografías digitales, en los paneles inferiores (M-S) se presentan las imágenes luego del procesamiento con el *software* Image J. Condición basal: medio EPC sin suero ni factores de crecimiento, Epoietina α 5 (C, I, P) y 10 UI/mL (D, J, Q), ApoA-I 100 μ g/mL, VEGF 150 μ g/mL.

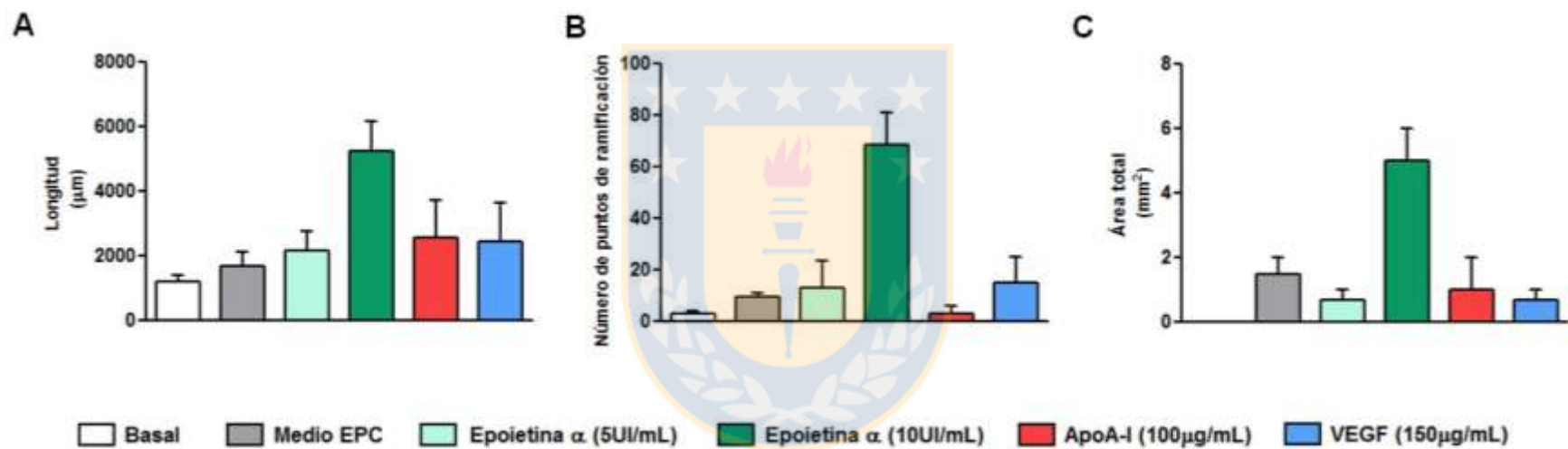


Figura 36. Cuantificación de la angiogénesis *ex vivo*, utilizando distintas moléculas angiogénicas. Se cuantificó la formación de vasos sanguíneos en anillos aórticos de ratón, al séptimo día de incubación con los estímulos. n=1 experimento independiente.

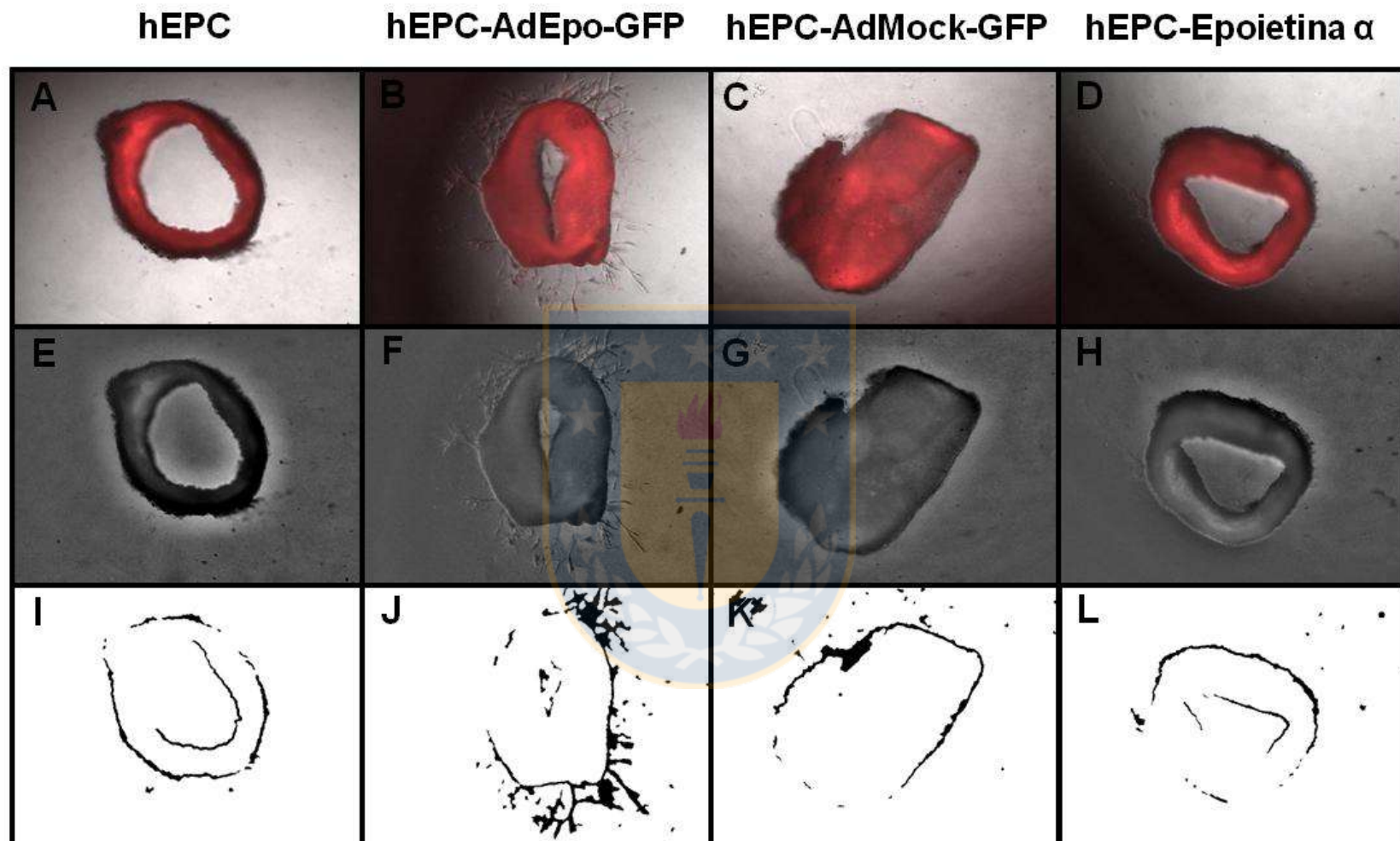


Figura 37. Evaluación del efecto de medios condicionados sin concentrar, en la angiogénesis *ex vivo*. Imágenes representativas del séptimo día de incubación con los medios condicionados, en anillos aórticos de ratón. En los paneles superiores (A-D) e intermedios (E-H) se muestran imágenes representativas de fotografías digitales y en los paneles inferiores (I-L) se presentan las imágenes procesadas con el *software* Image J. hEPC: medio de cultivo de células no transducidas, hEPC-Epoietina α : medio de cultivo de hEPC incubadas con Epoietina α (5 UI/mL).

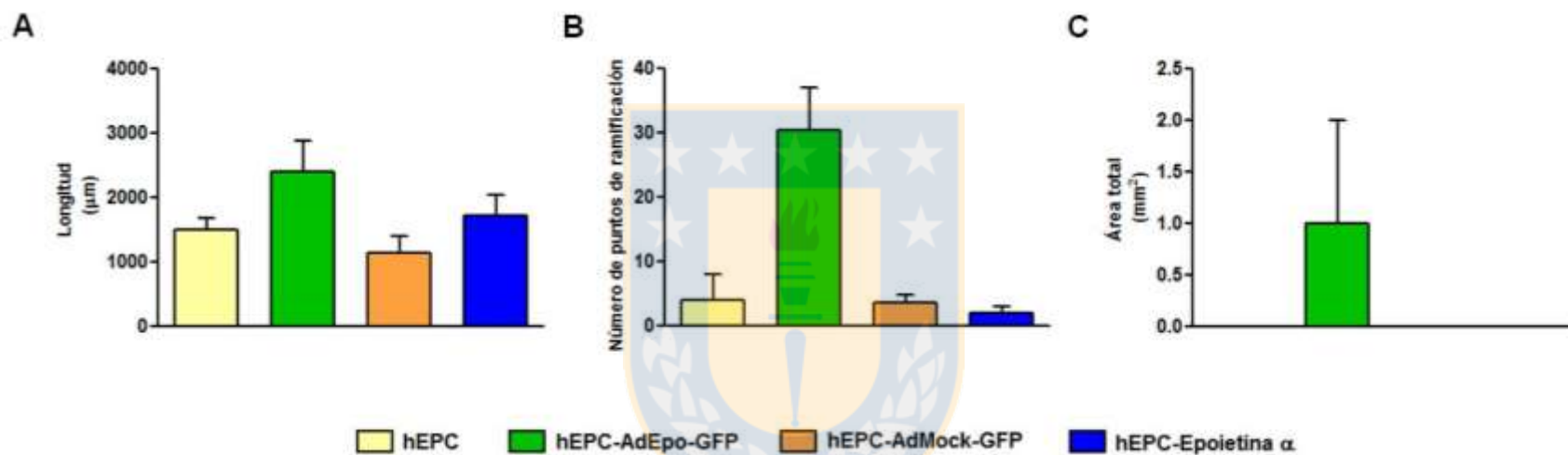


Figura 38. Cuantificación del efecto de medios condicionados sin concentrar, en la angiogénesis *ex vivo*. Se cuantificó la formación de vasos sanguíneos en anillos aórticos de ratón, al séptimo día de incubación con medios condicionados. hEPC: medio de cultivo de células no transducidas, hEPC-Epoietina α: medio de cultivo de células incubadas con Epoietina α (5 UI/mL). n=1 experimento independiente.

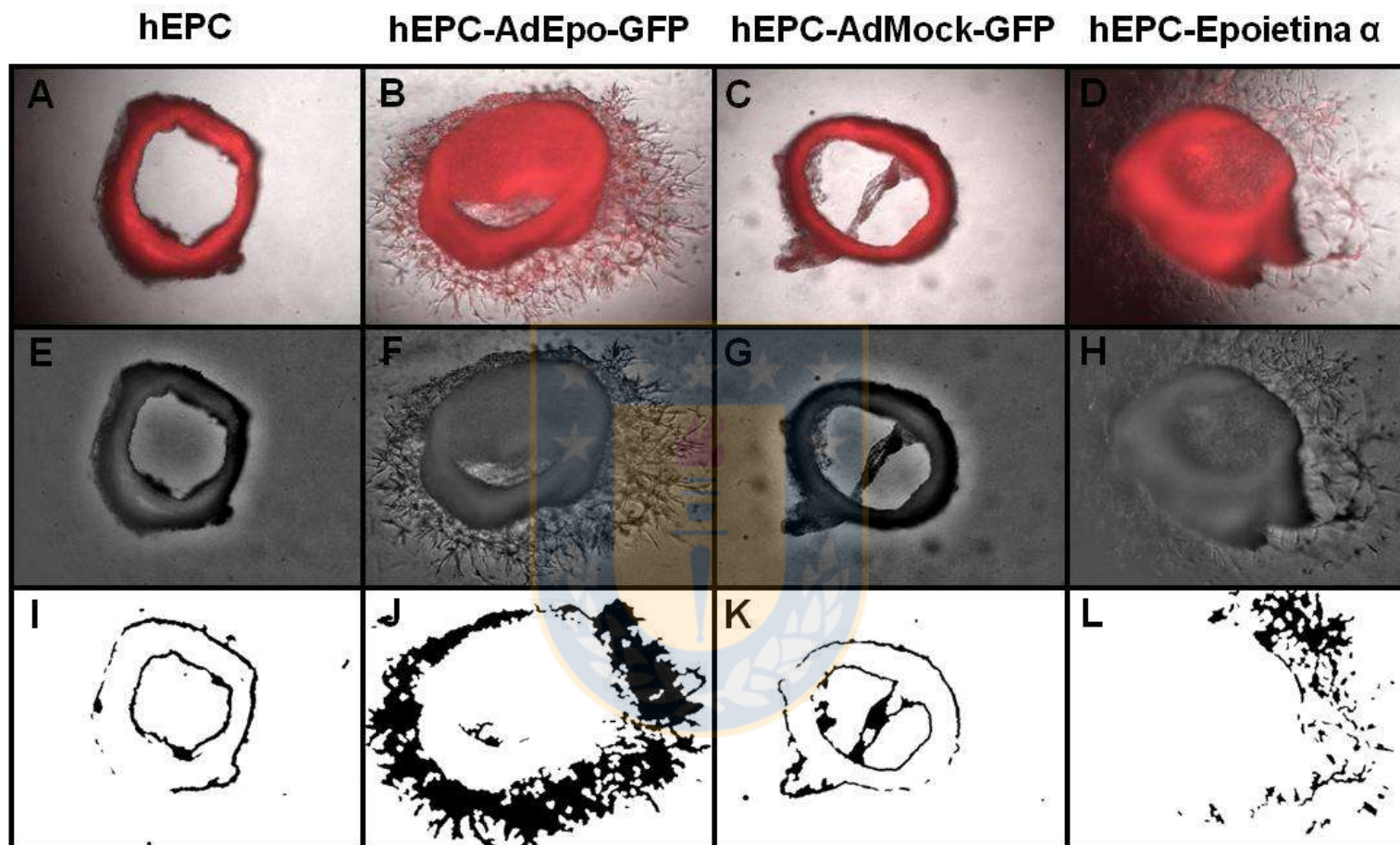


Figura 39. Evaluación del efecto de medios condicionados concentrados, en la angiogénesis *ex vivo*. Imágenes representativas del séptimo día de incubación con los medios condicionados, en anillos aórticos de ratón. En los paneles superiores (A-D) e intermedios (E-H) se muestran imágenes representativas de fotografías digitales, y en los paneles inferiores (I-L) se presentan las imágenes luego del procesamiento con el *software* Image J. hEPC: medio de cultivo de células no transducidas, hEPC-Epoietina α : medio de cultivo de células incubadas con Epoietina α (5 UI/mL).

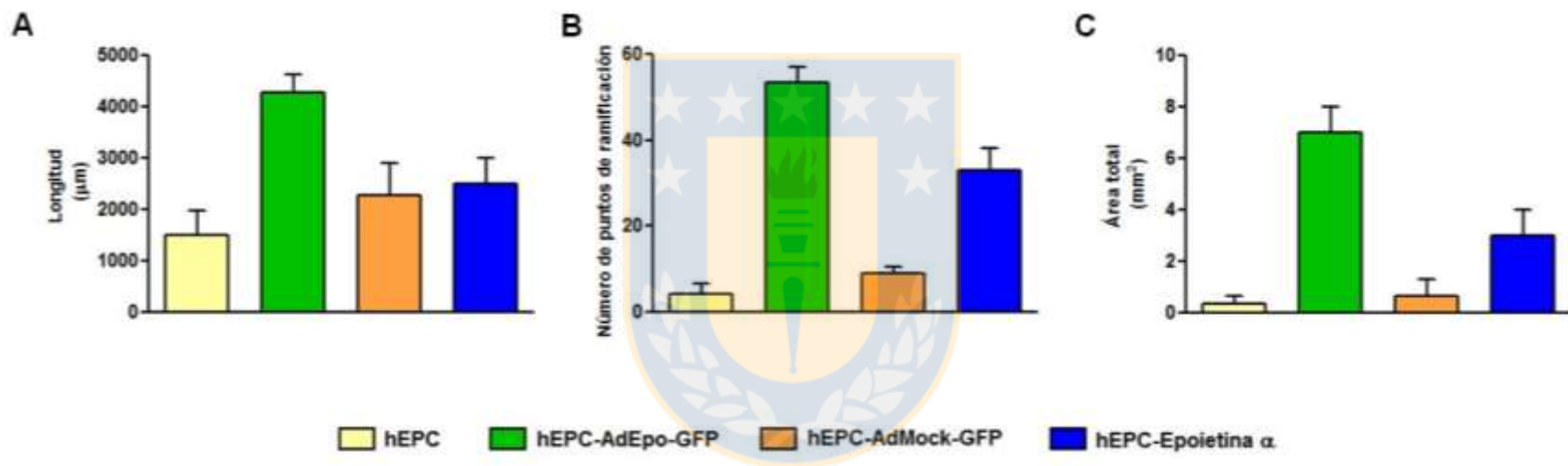


Figura 40. Cuantificación del efecto de medios condicionados concentrados, en la angiogénesis *ex vivo*. Se cuantificó la formación de vasos sanguíneos en anillos aórticos de ratón, al séptimo día post-incubación con medios condicionados. hEPC: medio de cultivo de células no transducidas, hEPC-Epoietina α: medio de cultivo de células incubadas con Epoietina α (5 UI/mL). n=1 experimento independiente.

DISCUSIÓN

Las enfermedades cardiovasculares (ECV) son mundialmente conocidas por ser una fuente importante de morbilidad y discapacidad, y constituir la primera causa de muerte. En Chile, el MINSAL ha informado que alrededor de un 30% de la población fallece anualmente a causa de esta enfermedad [104].

Actualmente las terapias utilizadas para combatir las ECV incluyen cambios en el estilo de vida del paciente, fármacos para controlar los factores de riesgo y cirugía. Sin embargo, estas estrategias no son capaces de controlar la enfermedad, lo cual queda demostrado debido al aumento de la prevalencia de las ECV [104].

Las ECV comienzan a desarrollarse como consecuencia de una serie de factores de riesgo, los cuales pueden ser locales (estrés por flujo, injuria vascular, entre otros) o sistémicos (hipercolesterolemia, tabaquismo, hipertensión, diabetes mellitus, síndrome metabólico, entre otros) [105]. El primer evento temprano que se genera en el curso de las ECV es la disfunción endotelial, la cual está relacionada con alteraciones en el tono vascular, disfunción trombótica, adhesión de leucocitos, proliferación y migración de células musculares lisas [106]. Todos estos eventos juegan un rol fundamental en el desarrollo y progresión de la placa ateromatosa y sus posteriores complicaciones.

Dentro de los mecanismos fisiológicos que posee nuestro organismo para contrarrestar estas alteraciones encontramos a las células progenitoras endoteliales humanas (hEPC), las cuales forman parte de un *pool* heterogéneo de células mononucleares de sangre periférica [17], y pueden diferenciarse a células endoteliales maduras, participando de los procesos de reendotelización y neovascularización, los cuales contribuyen a la restauración de la integridad de la función endotelial en los vasos injuriados [14, 15].

Estas células pueden ser moduladas positivamente con diversos factores, como las lipoproteínas de alta densidad (HDL) [107], el uso de estatinas [97] y eritropoyetina [91, 92], entre

otros. Sin embargo, las hEPC se encuentran disminuidas en cuanto a número y funcionalidad en pacientes que presentan factores de riesgo cardiovascular y/o ECV [41]. Por este motivo, se necesita desarrollar nuevas herramientas que permitan potenciar la funcionalidad de las hEPC y/o conferirles nuevas características, con el propósito de que sean más resistentes en ambientes adversos, como los que se encuentran en pacientes con ECV.

Es por ello que el objetivo de este trabajo fue generar hEPC productoras de eritropoyetina humana (hEpo), mediante el uso de vectores virales.

Los principales resultados obtenidos son los siguientes:

- Se desarrollaron dos herramientas moleculares (vector adenoviral y lentiviral) con información genética para la producción de hEpo.
- Se demostró que el mejor método para transducir a hEPC tempranas es el adenovirus.
- Las hEPC transducidas (hEPC-AdEpo) producen eritropoyetina humana.
- La producción de hEpo y el virus propiamente tal, no generan cambios significativos en la proliferación, apoptosis. Sin embargo, se observó una disminución en la expresión de los marcadores de diferenciación CD34 y KDR a nivel de mensajero en hEPC transducidas.
- Se demostró que las hEPC productoras de eritropoyetina promueven la angiogénesis *in vivo*, en huevos fecundados. Estos efectos dependerían de factores presentes en el medio de cultivo de las hEPC transducidas, como la hEpo u otra citoquina cuya expresión se vea aumentada por la secreción de hEpo.

Características morfológicas y fenotípicas de hEPC

Para el desarrollo de este trabajo, se aislaron hEPC desde sangre periférica, las cuales sufrieron cambios morfológicos en el transcurso de los días. Es así como al tercer día de cultivo se observan células aisladas de forma redondeada, características de células indiferenciadas. Sin embargo, ya al séptimo día de cultivo, las células comienzan a adquirir una forma más alargada o de huso y a formar agrupaciones, lo cual queda aún más en evidencia al día 9 (Figuras 16 y 17).

Estos cambios son indicadores de una transformación hacia el linaje endotelial, como se ha descrito en literatura [10, 22].

En cuanto a su fenotipo, se pudo verificar que esta población es heterogénea, ya que al realizar la citometría de flujo se detectó la presencia de 4 subpoblaciones de hEPC tempranas, similar a lo descrito por González-Pecchi y *col.* [98]. Cada una de ellas expresa los marcadores CD34⁺ y KDR⁺ en distinta magnitud. A medida que transcurren los días de cultivo, las subpoblaciones de hEPC muestran una disminución del marcaje de CD34⁺, mientras KDR⁺ y/o el doble marcaje CD34⁺ / KDR⁺ aumenta (Figuras 19 y 20).

Estos cambios sugieren una diferenciación hacia el linaje endotelial, y coinciden con la información encontrada en bibliografía [10, 19, 22].

Además de la expresión de estos marcadores, se evaluó la expresión del receptor de eritropoyetina (EpoR) en hEPC de 4 y 9 días. Urao y *col.* el año 2006 muestra mediante RT-PCR que células EPC Sca-1⁺ / Flk-1⁺ aisladas desde sangre periférica de ratón expresan EpoR [91]. En nuestros ensayos, se observó que a medida que aumenta el tiempo de cultivo disminuye la expresión de este receptor, sin embargo, éste aún sigue presente a los 9 días (Figura 21), lo cual es importante si se considera que las hEPC transducidas con AdEpo generan eritropoyetina en este estadio de diferenciación, por lo tanto, pudiera ejercer un efecto autocrino sobre las propias células secretoras de hEpo.

Al estimular a las hEPC con Epoietina α (Eritropoyetina recombinante) se generó un aumento en la expresión del receptor de Epo sólo en las hEPC de 9 días. Este hecho, podría indicarnos que existe una expresión máxima de este receptor en las hEPC de 4 días, la cual no puede incrementarse en respuesta a Epo, sin embargo, a los 9 días la expresión basal de EpoR disminuye, por lo que al coincubar con Epoietina α es posible aumentar nuevamente la expresión de este receptor, obteniéndose niveles cercanos a la expresión a los 4 días de cultivo.

En literatura se ha descrito, que poblaciones de hEPC tempranas aisladas desde cordón umbilical o desde sangre periférica, seleccionadas por *cell sorting* o *microbeads* asociados a anticuerpos específicos contra moléculas de superficie, expresan EpoR [91, 108, 109]. Sin embargo, no hay estudios que muestren la expresión del receptor de eritropoyetina en una población de hEPC tempranas heterogénea, seleccionada sólo mediante la adhesión a fibronectina, y a distintos tiempos de cultivo, como se realizó en este trabajo.

Eritropoyetina y hEPC

Para obtener hEPC productoras de eritropoyetina se utilizaron 2 herramientas moleculares (adenovirus y lentivirus). Ambos vectores virales son capaces de infectar células superiores, como se demostró utilizando células HEK (Figuras 13 y 15).

Al evaluar la capacidad infectiva de ambos vectores en las hEPC, se observaron diferencias sustanciales. Las hEPC de 3 días no lograron ser transducidas con adenovirus, como lo demuestra la ausencia de expresión de GFP (Figura 22). Se ha descrito que para la transducción, el adenovirus debe ser endocitado por las células, lo cual requiere de la expresión del receptor coxsakie-adenovirus (CAR) y las integrinas $\alpha\beta 3$ y $\alpha\beta 5$ [110-112]. Las células madre hematopoyéticas CD34⁺ presentes en médula ósea y en sangre periférica presentan menos de un 5% de expresión de CAR y entre 3-5% de integrinas $\alpha\beta$ [113], por lo tanto, podría ser ésta una causa de la transducción ineficiente con AdEpo. Por el contrario, la transducción de hEPC con el adenovirus fue positiva tanto al día 7 como al día 10 de cultivo (Figura 22), lo que coincide con una diferenciación hacia el linaje endotelial [114, 115] y, posiblemente, a la expresión de moléculas de superficie requeridas para la endocitosis del virus.

En relación al lentivirus, las células no fueron transducidas en ningún tiempo evaluado (Figura 22). Según Stocksclaeder y col. en el año 2010, para obtener una transducción óptima y eficiente de hEPC con vectores lentivirales y retrovirales, se requiere una alta capacidad proliferativa celular, la cual se encuentra principalmente en hEPC tardías [116]. Esto se correlaciona con nuestros resultados, debido a que las hEPC tempranas, poseen baja capacidad

proliferativa, lo cual dificulta su transducción. Además, existe la posibilidad que los medios de cultivos obtenidos a partir de las HEK 293-FT transducidas con pLEpo, utilizados para infectar a las hEPC tempranas presentaran un título bajo, lo cual disminuiría aún más la posibilidad de infección de éstas células. Estudios muestran que para obtener una transducción de EPC con lentivirus del 70% aprox. se deben infectar con un MOI de 10-20 UFC/célula [70, 116]. Sin embargo, cabe destacar que los medios de cultivos obtenidos de las células HEK 293-FT transducidas con pLEpo, fueron capaces de infectar un cultivo de células HEK 293-A, las cuales se caracterizan por tener una alta tasa metabólica y proliferativa, por lo tanto, la principal razón por la cual las hEPC no pudieron ser transducidas por LEpo, sería su baja capacidad proliferativa.

De acuerdo a los resultados anteriores, se decidió trabajar con el vector adenoviral al día 7 de cultivo de las hEPC, y se determinó que 150 UFC/célula como MOI para este modelo (Figura 23).

Al transducir a las hEPC con el adenovirus no se pudo comprobar directamente la presencia de hEpo en el medio de cultivo por *western blots*, debido a la baja concentración de esta proteína en el medio de cultivo. Como estrategia para visualizar la presencia de hEpo, se concentró el medio de cultivo, pero debido al gran porcentaje de suero (30%) con el que deben ser cultivadas las hEPC, sólo se logró concentrar a la mitad, condición con la cual tampoco se logró detectar esta proteína.

Dado lo anterior, se realizaron *western blots* utilizando el lisado de las células hEPC-AdEpo. Con esta aproximación, se comprobó que las células transducidas eran capaces de expresar hEpo en el interior celular (Figura 24). Sin embargo, estos ensayos no demuestran que la proteína puede ser exportada hacia el exterior de la célula, lo cual debiera ser confirmado con técnicas más sensibles que los *western blots*. A pesar de ello, las células transducidas con AdEpo y sus sobrenadantes producen un aumento de la angiogénesis *in vivo* (Figuras 33 y 34) y *ex vivo* (Figuras 37-40), lo cual sugeriría que hEpo estaría siendo secretada por las células.

Parámetros fisiológicos de las hEPC transducidas

Al conocer que hEPC-AdEpo expresan hEpo, se evaluó el efecto tanto del virus como de la proteína sobre la proliferación, apoptosis y expresión de marcadores de diferenciación en estas células.

Como se observa en las Figuras 25 y 26, la presencia del adenovirus no genera cambios significativos en la proliferación ni en la apoptosis de las hEPC transducidas, al compararlas con las hEPC nativas (no transducidas). Estos hallazgos se condicen con la observación de las hEPC por microscopía óptica, ya que no se detectaron cambios significativos en la morfología ni en el número de células antes y después de la transducción (datos no mostrados). Estudios en EPC transducidas con adenovirus que codifican para VEGF o HIF-1 muestran resultados coincidentes con los que se obtuvieron en este trabajo, ya que al evaluar la proliferación y viabilidad celular, no existen cambios significativos con respecto a las células no transducidas (condición basal) [65, 71]. En cuanto al efecto de hEpo sobre las hEPC, sólo se obtuvo una tendencia al aumento la cual no alcanza significancia estadística. La causa de este resultado puede radicar en la baja cantidad de hEpo que pudieran estar secretando las células, la cual se diluye en el medio de cultivo; no generando una concentración óptima para aumentar significativamente este parámetro. Estudios realizados mediante la coincubación de EPC junto con Epo muestran un aumento de la proliferación en estas células, sin embargo, las concentraciones de Epo utilizadas se encuentran desde 1-10 UI/mL [90, 117].

Como se mencionó anteriormente, en literatura se ha descrito que al incubar hEPC con Epo (1-1,2 UI/mL) existe un aumento en el número de células por campo en el cultivo celular [118], y que la proliferación de estas células es dependiente de la vía Akt [90, 119]. Es por esta razón que se utilizó como control positivo de proliferación Epo recombinante (Epoietina α) a concentración de 5 UI/mL. Sin embargo, queda en evidencia en estos ensayos que este estímulo no genera cambios en la proliferación (Figura 25). Esto puede ocurrir debido a que existen diferentes isoformas de Epo

recombinantes, las cuales se diferencian en actividad y afinidad por el receptor, de acuerdo a sus modificaciones post-transduccionales [81, 120, 121].

Al evaluar la expresión de marcadores de diferenciación por RT-qPCR, se observó que no hubo diferencias significativas en la expresión de CD31, al comparar hEPC nativas, hEPC-AdEpo y hEPC-AdMock. Por el contrario, se observa una disminución significativa de la expresión de CD34 y KDR, en las células transducidas con ambos vectores adenovirales, comparado con las hEPC no transducidas. Debido a que este efecto ocurre con ambos vectores adenovirales, se puede descartar que dependa de la producción de hEpo, y podría corresponder a un efecto de la presencia del virus en la célula. Sin embargo, no existe necesariamente una correlación entre la disminución del mensajero y la expresión y funcionalidad de estos marcadores de diferenciación. En este sentido, al observar a las células morfológicamente en óptimas condiciones y comprometidas con el linaje endotelial, es posible que la expresión y funcionalidad de los marcadores de diferenciación no estén afectados por la presencia del virus en la célula. No se han descrito estudios que evalúen marcadores de diferenciación de EPC post-transducción adenoviral, sino los evalúan al momento de aislar las EPC a modo de caracterizarlas previa transducción. Cabe destacar, que el mejor método para evaluar los marcadores de diferenciación de EPC hubiera sido la citometría de flujo, la cual no se pudo realizar debido a la incompatibilidad de los fluoróforos acoplados a los marcadores con la producción de GFP por hEPC.

Transducción de hEPC y angiogénesis

Uno de los objetivos de transducir las hEPC con AdEpo es generar células que ejerzan efectos positivos en su función biológica, más allá que las células nativas. *In vivo*, las hEPC participan de los procesos de angiogénesis y reendotelización, los cuales favorecen la reparación de endotelios injuriados [14, 15]. Basados en estos antecedentes, una forma de comprobar que hEPC transducidas con el vector adenoviral y productoras de hEpo poseen una mayor funcionalidad en comparación con las hEPC nativas, fue la evaluación de la angiogénesis, tanto *in vivo* como *ex vivo*.

Angiogenesis *in vivo*: Se utilizó el modelo de membranas corioalantoideas de huevos fertilizados, la cual es una membrana extraembrionaria que se usa comúnmente para estudiar tanto efectos angiogénicos como anti-angiogénicos [100, 122]. Este modelo posee varias ventajas tales como, permitir ensayos *in vivo*, su bajo costo, reproducibilidad, simpleza y confiabilidad de los resultados [100]. Esta membrana nace aproximadamente entre el día 4 y 10 de incubación del embrión de pollo, donde se produce la fusión entre alantoides y la capa mesodermal del corión. Desarrolla una enriquecida red vascular, la cual está conectada con la circulación embrionaria a través de la arteria y vena alantoideas [100, 122]. Aproximadamente al día 10 de incubación, es posible inocular la membrana corioalantoidea y se debe esperar entre 3-4 días para evaluar una respuesta angiogénica o anti-angiogénica [100].

La estandarización de estos ensayos consideró la inoculación de las membranas corioalantoideas con distintas cantidades de hEPC, las cuales se dejaron por distintos tiempos de incubación. Nuestros resultados arrojaron que 300.000 células y 3 días de incubación constituían las mejores condiciones para los ensayos posteriores (Figuras 29 y 30). Estos parámetros son similares a los descritos en literatura [66, 123, 124].

Los ensayos con hEPC productoras de hEpo mostraron que estas células promueven un aumento significativo de la longitud, número de ramificaciones y del área de los vasos sanguíneos formados, en comparación con las membranas tratadas con hEPC nativas (Figuras 33 y 34). Por el contrario, queda en evidencia que las células transducidas con el vector AdMock, se comportan como el control basal (hEPC nativas), por lo tanto, no es el virus el que estaría mediando este aumento de los parámetros angiogénicos, sino hEpo secretada por hEPC. Este hallazgo resulta ser novedoso, ya que sólo se han publicado estudios realizados mediante la coincubación de Epo con hEPC *in vitro*, mostrando un aumento en la formación de estructuras tubulares en un ensayo de invasión en una matriz [118, 119], e *in vivo*, donde se observa un aumento en la reparación vascular en modelos murinos de injuria endotelial [91, 92].

Angiogénesis *ex vivo*: Con los resultados obtenidos anteriormente, surge la interrogante si son las hEPC productoras de Epo o las citoquinas secretadas por estas células, las responsables del aumento de la angiogénesis *in vivo*. Para responder esta pregunta, se realizó un ensayo preliminar, utilizando medios de cultivos (medios condicionados) de hEPC productoras de hEpo, los cuales fueron adicionados a cultivos de anillos de aorta de ratón durante 7 días. Este modelo es capaz de responder a estímulos angiogénicos, como se demostró utilizando distintas moléculas descritas en literatura (Figuras 35 y 36). Con los medios condicionados de hEPC-AdEpo sin concentrar, se observa un aumento de la angiogénesis, lo cual queda aún más en evidencia al realizar estos ensayos con los medios condicionados concentrados a la mitad (Figuras 37-40). En ambos casos, los medios condicionados de hEPC-AdMock se comportan como la condición de hEPC no transducidas, lo que apoya la hipótesis que las hEPC infectadas con AdEpo secretan moléculas que afectan positivamente a la angiogénesis.

En el año 2009, Di Santo *y col.* estudiaron los efectos de EPC nativas expuestas a una condición de hipoxia y sus medios condicionados, observando resultados similares en ambas condiciones, las cuales promueven un aumento de viabilidad celular *in vitro*, de la formación de capilares en anillos aórticos y de la perfusión de las extremidades posteriores de ratas y su función muscular [125]. Este estudio se correlaciona con lo observado en este trabajo, sin embargo, se deben realizar más ensayos para determinar si el efecto de las células o sus medios condicionados son los mismos, para ello, se deben evaluar en un mismo modelo *in vivo* ambas condiciones. Además, deberían ser evaluados otros aspectos de la funcionalidad de las hEPC, como es la migración y adhesión de estas células, ya que se ha descrito que Epo influye en estos aspectos [90, 92]. También puede ser importante evaluar el efecto que pueden tener las células propiamente tal, más allá de la secreción de citoquinas, en la incorporación a estructuras tipo tubulares (estudio *in vitro*) o a vasos sanguíneos injuriados (estudio *in vivo*), utilizando la producción de GFP como indicador de hEPC.

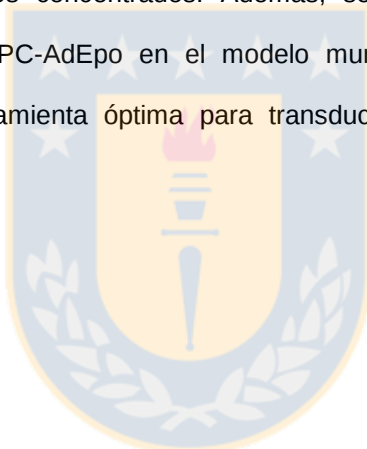
CONCLUSIONES Y PROYECCIONES

Como conclusión de este trabajo, se logró generar hEPC productoras de hEpo, las cuales son capaces de ejercer efectos positivos en dos modelos de angiogénesis. Sin embargo, quedan aún distintas interrogantes por responder, para las cuales se proponen los siguientes ensayos complementarios:

- Confirmar los resultados obtenidos con medios condicionados concentrados de las hEPC transducidas con el vector adenoviral, para verificar si promueven un aumento de la angiogénesis en el modelo de anillo aórtico de ratón. Sin embargo, la evaluación de estos experimentos debiera ser realizada al día 4 post-inoculación, debido a que en los ensayos preliminares ya se observaban cambios a este tiempo de incubación y se disminuirían resultados inespecíficos. Además, se deberían agregar condiciones en donde se pueda evaluar el efecto de VEGF, citoquina secretada por hEPC, y hEpo, mediante la coincubación de los medios condicionados concentrados con anticuerpos anti-VEGF y anti-Epo. De esta forma se confirmaría si es un efecto combinado, si depende de alguna de las dos moléculas o de otras citoquinas diferentes a hEpo y VEGF.
- Evaluar en conjunto hEPC y sus medios condicionados concentrados en un mismo modelo *in vivo*, para dilucidar si son las células, el medio con citoquinas o ambos en conjunto los que promueven el aumento de la angiogénesis. Al igual que lo propuesto anteriormente, se deberían agregar condiciones donde se pre-incube un anticuerpo anti-VEGF y anti-Epo con los medios condicionados concentrados, para dilucidar la participación de estas citoquinas en los efectos observados.
- Caracterizar la secreción de Epo por hEPC de 9 días transducidas, determinando la concentración en el medio de cultivo, a través de un ELISA o seleccionando y concentrando la proteína mediante una columna de afinidad. Además, determinar la funcionalidad de Epo en otros tipos celulares.
- Realizar experimentos complementarios de funcionalidad de hEPC luego de la transducción de AdEpo y AdMock. Ellos debieran contemplar ensayos de migración, mediante el uso de

transwells, y de adhesión, utilizando una matriz como fibronectina. Estos experimentos permitirían ampliar la caracterización del efecto del adenovirus y de la síntesis de Epo en la funcionalidad de las hEPC transducidas y, de esta manera, aportar en la comprensión de los efectos ejercidos *in vivo* por estas células.

- Continuar con los estudios *in vivo* para evaluar el comportamiento de hEPC transducidas con el vector adenoviral y sus medios condicionados en angiogénesis, en modelos de mayor complejidad, como los modelos murinos. Para llevar a cabo estos experimentos, se requiere de un modelo murino de injuria vascular, donde se debería exponer la zona injuriada a las hEPC transducidas y a los medios condicionados de éstas. De esta forma, sería posible evaluar y comparar el efecto reparador y angiogénico de las células versus los medios condicionados concentrados. Además, sería importante evaluar el efecto inmunológico de las hEPC-AdEpo en el modelo murino, ya que a pesar de que el adenovirus es una herramienta óptima para transducir hEPC, se caracteriza por ser altamente inmunogénico.



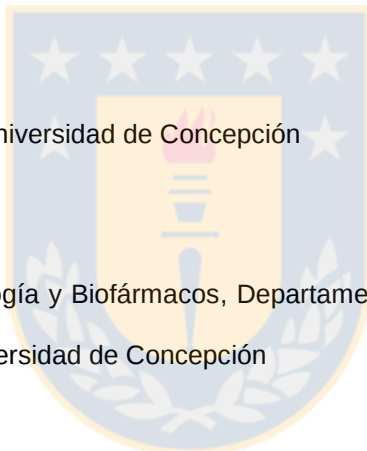
FINANCIAMIENTO

- Proyecto Innova Bío Bío 13.1289 apoyo de tesis de postgrado
- Beca de Magíster otorgada por la Comisión Nacional de Investigación Científica y Tecnológica (CONICYT)
- Proyecto FONDECYT de Iniciación n°11121575



AGRADECIMIENTOS

- A todos los donantes del Departamento de Bioquímica Clínica e Inmunología, del Departamento de Fisiopatología y de la carrera de Bioquímica que participaron de este trabajo voluntariamente, especialmente a *Paula Honorato, Paola Jara, Nicol Parada, Jorge Orias, Luis Neira, Nicolás Gutiérrez, Luis Briceño, Freddy Briceño, Andrea Sánchez*
- Magíster en Bioquímica Clínica e Inmunología, Universidad de Concepción
- Departamento de Bioquímica Clínica e Inmunología, Facultad de Farmacia, Universidad de Concepción
- Escuela de graduados, Universidad de Concepción
- Laboratorio de Biotecnología y Biofármacos, Departamento de Fisiopatología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción
- Dr. Marcelo Bustamante y MsC. Héctor Contreras del Laboratorio de Diagnóstico Molecular, Universidad Católica de la Santísima Concepción, Concepción



BIBLIOGRAFÍA

1. World Health Organization: **Cardiovascular Diseases**. In.; 2012.
2. Ministerio de Salud: **Indicadores Básicos de Salud en Chile 2013**. In.; 2013.
3. Ministerio de Salud: **Boletín del Ministerio de Salud: Objetivos Sanitarios para Chile 2000 – 2010**. In.; 2000.
4. Mizuno Y, Jacob RF, Mason RP: **Inflammation and the development of atherosclerosis**. *Journal of atherosclerosis and thrombosis* 2011, **18**(5):351-358.
5. Tabas I, Williams KJ, Boren J: **Subendothelial lipoprotein retention as the initiating process in atherosclerosis: update and therapeutic implications**. *Circulation* 2007, **116**(16):1832-1844.
6. Pentikainen MO, Oorni K, Ala-Korpela M, Kovanen PT: **Modified LDL - trigger of atherosclerosis and inflammation in the arterial intima**. *Journal of internal medicine* 2000, **247**(3):359-370.
7. Businaro R, Tagliani A, Buttari B, Profumo E, Ippoliti F, Di Cristofano C, Capoano R, Salvati B, Rigano R: **Cellular and molecular players in the atherosclerotic plaque progression**. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2012, **1262**:134-141.
8. Nakashima Y, Fujii H, Sumiyoshi S, Wight TN, Sueishi K: **Early human atherosclerosis: accumulation of lipid and proteoglycans in intimal thickenings followed by macrophage infiltration**. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 2007, **27**(5):1159-1165.
9. Rhee JW, Wu JC: **Advances in nanotechnology for the management of coronary artery disease**. *Trends in cardiovascular medicine* 2013, **23**(2):39-45.
10. Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, Witzenbichler B, Schatteman G, Isner JM: **Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis**. *Science* 1997, **275**(5302):964-967.
11. Khan SS, Solomon MA, McCoy JP, Jr.: **Detection of circulating endothelial cells and endothelial progenitor cells by flow cytometry**. *Cytometry Part B, Clinical cytometry* 2005, **64**(1):1-8.

12. Urbich C, Dimmeler S: **Endothelial progenitor cells: characterization and role in vascular biology.** *Circulation research* 2004, **95**(4):343-353.
13. Mayr M, Niederseer D, Niebauer J: **From bench to bedside: what physicians need to know about endothelial progenitor cells.** *The American journal of medicine* 2011, **124**(6):489-497.
14. Miller-Kasprzak E, Jagodzinski PP: **Endothelial progenitor cells as a new agent contributing to vascular repair.** *Archivum immunologiae et therapiae experimentalis* 2007, **55**(4):247-259.
15. Capobianco S, Chennamaneni V, Mittal M, Zhang N, Zhang C: **Endothelial progenitor cells as factors in neovascularization and endothelial repair.** *World journal of cardiology* 2010, **2**(12):411-420.
16. Ankeny RF, Ankeny CJ, Nerem RM, Jo H: **Maturing EPCs into endothelial cells: may the force be with the EPCs: focus on "Fluid shear stress induces differentiation of circulating phenotype endothelial progenitor cells".** *American journal of physiology Cell physiology* 2012, **303**(6):C589-591.
17. Sen S, McDonald SP, Coates PT, Bonder CS: **Endothelial progenitor cells: novel biomarker and promising cell therapy for cardiovascular disease.** *Clinical science* 2011, **120**(7):263-283.
18. Mukai N, Akahori T, Komaki M, Li Q, Kanayasu-Toyoda T, Ishii-Watabe A, Kobayashi A, Yamaguchi T, Abe M, Amagasa T et al: **A comparison of the tube forming potentials of early and late endothelial progenitor cells.** *Experimental cell research* 2008, **314**(3):430-440.
19. Yoon CH, Hur J, Park KW, Kim JH, Lee CS, Oh IY, Kim TY, Cho HJ, Kang HJ, Chae IH 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* 2005, **112**(11):1618-1627.
20. Liu P, Zhou B, Gu D, Zhang L, Han Z: **Endothelial progenitor cell therapy in atherosclerosis: a double-edged sword?** *Ageing research reviews* 2009, **8**(2):83-93.
21. Steinmetz M, Nickenig G, Werner N: **Endothelial-regenerating cells: an expanding universe.** *Hypertension* 2010, **55**(3):593-599.

22. Hur J, Yoon CH, Kim HS, Choi JH, Kang HJ, Hwang KK, Oh BH, Lee MM, Park YB: **Characterization of two types of endothelial progenitor cells and their different contributions to neovasclogenesis.** *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 2004, **24**(2):288-293.
23. Lenk K, Uhlemann M, Schuler G, Adams V: **Role of endothelial progenitor cells in the beneficial effects of physical exercise on atherosclerosis and coronary artery disease.** *J Appl Physiol* 2011, **111**(1):321-328.
24. Lenk K, Uhlemann M, Schuler G, Adams V: **Role of endothelial progenitor cells in the beneficial effects of physical exercise on atherosclerosis and coronary artery disease.** *Journal of applied physiology* 2011, **111**(1):321-328.
25. Heiss C, Keymel S, Niesler U, Ziemann J, Kelm M, Kalka C: **Impaired progenitor cell activity in age-related endothelial dysfunction.** *Journal of the American College of Cardiology* 2005, **45**(9):1441-1448.
26. Rauscher FM, Goldschmidt-Clermont PJ, Davis BH, Wang T, Gregg D, Ramaswami P, Pippen AM, Annex BH, Dong C, Taylor DA: **Aging, progenitor cell exhaustion, and atherosclerosis.** *Circulation* 2003, **108**(4):457-463.
27. Vasa M, Fichtlscherer S, Aicher A, Adler K, Urbich C, Martin H, Zeiher AM, Dimmeler S: **Number and migratory activity of circulating endothelial progenitor cells inversely correlate with risk factors for coronary artery disease.** *Circulation research* 2001, **89**(1):E1-7.
28. Kondo T, Hayashi M, Takeshita K, Numaguchi Y, Kobayashi K, Iino S, Inden Y, Murohara T: **Smoking cessation rapidly increases circulating progenitor cells in peripheral blood in chronic smokers.** *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 2004, **24**(8):1442-1447.
29. Hill JM, Zalos G, Halcox JP, Schenke WH, Waclawiw MA, Quyyumi AA, Finkel T: **Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk.** *The New England journal of medicine* 2003, **348**(7):593-600.
30. Xia WH, Li J, Su C, Yang Z, Chen L, Wu F, Zhang YY, Yu BB, Qiu YX, Wang SM *et al*: **Physical exercise attenuates age-associated reduction in endothelium-reparative capacity of endothelial progenitor cells by increasing CXCR4/JAK-2 signaling in healthy men.** *Aging cell* 2012, **11**(1):111-119.

31. Laufs U, Werner N, Link A, Endres M, Wassmann S, Jurgens K, Mische E, Bohm M, Nickenig G: **Physical training increases endothelial progenitor cells, inhibits neointima formation, and enhances angiogenesis.** *Circulation* 2004, **109**(2):220-226.
32. Strehlow K, Werner N, Berweiler J, Link A, Dirnagl U, Priller J, Laufs K, Ghaeni L, Milosevic M, Bohm M *et al*: **Estrogen increases bone marrow-derived endothelial progenitor cell production and diminishes neointima formation.** *Circulation* 2003, **107**(24):3059-3065.
33. Iwakura A, Shastri S, Luedemann C, Hamada H, Kawamoto A, Kishore R, Zhu Y, Qin G, Silver M, Thorne T *et al*: **Estradiol enhances recovery after myocardial infarction by augmenting incorporation of bone marrow-derived endothelial progenitor cells into sites of ischemia-induced neovascularization via endothelial nitric oxide synthase-mediated activation of matrix metalloproteinase-9.** *Circulation* 2006, **113**(12):1605-1614.
34. Zhang Q, Yin H, Liu P, Zhang H, She M: **Essential role of HDL on endothelial progenitor cell proliferation with PI3K/Akt/cyclin D1 as the signal pathway.** *Experimental biology and medicine* 2010, **235**(9):1082-1092.
35. Petoumenos V, Nickenig G, Werner N: **High-density lipoprotein exerts vasculoprotection via endothelial progenitor cells.** *Journal of cellular and molecular medicine* 2009, **13**(11-12):4623-4635.
36. Massa M, Rosti V, Ferrario M, Campanelli R, Ramajoli I, Rosso R, De Ferrari GM, Ferlini M, Goffredo L, Bertolotti A *et al*: **Increased circulating hematopoietic and endothelial progenitor cells in the early phase of acute myocardial infarction.** *Blood* 2005, **105**(1):199-206.
37. Glowinska-Olszewska B, Moniuszko M, Hryniewicz A, Jeznach M, Rusak M, Dabrowska M, Luczynski W, Bodzenta-Lukaszyk A, Bossowski A: **Relationship between circulating endothelial progenitor cells and endothelial dysfunction in children with type 1 diabetes: a novel paradigm of early atherosclerosis in high-risk young patients.** *European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies* 2013, **168**(2):153-161.
38. Schmidt-Lucke C, Fichtlscherer S, Aicher A, Tschope C, Schultheiss HP, Zeiher AM, Dimmeler S: **Quantification of circulating endothelial progenitor cells using the modified ISHAGE protocol.** *PLoS one* 2010, **5**(11):e13790.

39. Jialal I, Devaraj S, Singh U, Huet BA: **Decreased number and impaired functionality of endothelial progenitor cells in subjects with metabolic syndrome: implications for increased cardiovascular risk.** *Atherosclerosis* 2010, **211**(1):297-302.
40. Westerweel PE, Visseren FL, Hajer GR, Olijhoek JK, Hoefer IE, de Bree P, Rafii S, Doevendans PA, Verhaar MC: **Endothelial progenitor cell levels in obese men with the metabolic syndrome and the effect of simvastatin monotherapy vs. simvastatin/ezetimibe combination therapy.** *European heart journal* 2008, **29**(22):2808-2817.
41. Siddique A, Shantsila E, Lip GY, Varma C: **Endothelial progenitor cells: what use for the cardiologist?** *Journal of angiogenesis research* 2010, **2**:6.
42. Chen JZ, Zhang FR, Tao QM, Wang XX, Zhu JH: **Number and activity of endothelial progenitor cells from peripheral blood in patients with hypercholesterolaemia.** *Clinical science* 2004, **107**(3):273-280.
43. Tepper OM, Galiano RD, Capla JM, Kalka C, Gagne PJ, Jacobowitz GR, Levine JP, Gurtner GC: **Human endothelial progenitor cells from type II diabetics exhibit impaired proliferation, adhesion, and incorporation into vascular structures.** *Circulation* 2002, **106**(22):2781-2786.
44. li M, Takenaka H, Asai J, Ibusuki K, Mizukami Y, Maruyama K, Yoon YS, Wecker A, Luedemann C, Eaton E et al: **Endothelial progenitor thrombospondin-1 mediates diabetes-induced delay in reendothelialization following arterial injury.** *Circulation research* 2006, **98**(5):697-704.
45. Shantsila E, Watson T, Lip GY: **Statins and inflammation: reciprocal effectors to endothelial progenitors?** *Thrombosis research* 2008, **123**(1):1-4.
46. Shantsila E, Watson T, Lip GY: **Antioxidant protection: yet another function of endothelial progenitor cells?** *Journal of human hypertension* 2007, **21**(5):343-346.
47. Shantsila E, Watson T, Lip GY: **Endothelial progenitor cells in cardiovascular disorders.** *Journal of the American College of Cardiology* 2007, **49**(7):741-752.
48. Gutierrez-Grobe Y, Gavilanes-Espinar JG, Masso-Rojas FA, Sanchez-Valle V, Paez-Arenas A, Ponciano-Rodriguez G, Chavez-Tapia NC, Uribe M, Mendez-Sanchez N:

Metabolic syndrome and nonalcoholic fatty liver disease. The role of endothelial progenitor cells. *Annals of hepatology* 2013, **12**(6):908-914.

49. Anderson WF: **Human gene therapy.** *Science* 1992, **256**(5058):808-813.
50. Mountain A: **Gene therapy: the first decade.** *Trends in biotechnology* 2000, **18**(3):119-128.
51. Walther W, Stein U: **Viral vectors for gene transfer: a review of their use in the treatment of human diseases.** *Drugs* 2000, **60**(2):249-271.
52. Vannucci L, Lai M, Chiuppesi F, Ceccherini-Nelli L, Pistello M: **Viral vectors: a look back and ahead on gene transfer technology.** *The new microbiologica* 2013, **36**(1):1-22.
53. Somia N, Verma IM: **Gene therapy: trials and tribulations.** *Nature reviews Genetics* 2000, **1**(2):91-99.
54. Pfeifer A, Verma IM: **Gene therapy: promises and problems.** *Annual review of genomics and human genetics* 2001, **2**:177-211.
55. Romano G, Pacilio C, Giordano A: **Gene transfer technology in therapy: current applications and future goals.** *Stem cells* 1999, **17**(4):191-202.
56. Rollins SA, Birks CW, Setter E, Squinto SP, Rother RP: **Retroviral vector producer cell killing in human serum is mediated by natural antibody and complement: strategies for evading the humoral immune response.** *Human gene therapy* 1996, **7**(5):619-626.
57. Sen D, Balakrishnan B, Jayandharan GR: **Cellular unfolded protein response against viruses used in gene therapy.** *Frontiers in microbiology* 2014, **5**:250.
58. Lentz TB, Gray SJ, Samulski RJ: **Viral vectors for gene delivery to the central nervous system.** *Neurobiology of disease* 2012, **48**(2):179-188.
59. Anderson RJ, Galatowicz G, Macdonald ID, Lowdell MW, Corbett TJ, Prentice HG: **Detection of adeno-associated virus type 2 in sorted human bone marrow progenitor cells.** *Experimental hematology* 1997, **25**(3):256-262.
60. Berns KI: **Parvovirus replication.** *Microbiological reviews* 1990, **54**(3):316-329.

61. Weitzman MD, Kyostio SR, Kotin RM, Owens RA: **Adeno-associated virus (AAV) Rep proteins mediate complex formation between AAV DNA and its integration site in human DNA.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1994, **91**(13):5808-5812.
62. Skubis-Zegadlo J, Stachurska A, Malecki M: **Vectrology of adeno-associated viruses (AAV).** *Medycyna wieku rozwojowego* 2013, **17**(3):202-206.
63. Cui B, Huang L, Fang Y, Guo R, Yin Y, Zhao X: **Transplantation of endothelial progenitor cells overexpressing endothelial nitric oxide synthase enhances inhibition of neointimal hyperplasia and restores endothelium-dependent vasodilatation.** *Microvascular research* 2011, **81**(1):143-150.
64. Marrotte EJ, Chen DD, Hakim JS, Chen AF: **Manganese superoxide dismutase expression in endothelial progenitor cells accelerates wound healing in diabetic mice.** *The Journal of clinical investigation* 2010, **120**(12):4207-4219.
65. Iwaguro H, Yamaguchi J, Kalka C, Murasawa S, Masuda H, Hayashi S, Silver M, Li T, Isner JM, Asahara T: **Endothelial progenitor cell vascular endothelial growth factor gene transfer for vascular regeneration.** *Circulation* 2002, **105**(6):732-738.
66. Yu JX, Huang XF, Lv WM, Ye CS, Peng XZ, Zhang H, Xiao LB, Wang SM: **Combination of stromal-derived factor-1alpha and vascular endothelial growth factor gene-modified endothelial progenitor cells is more effective for ischemic neovascularization.** *Journal of vascular surgery* 2009, **50**(3):608-616.
67. Meng QY, Li XQ, Yu XB, Lei FR, Jiang K, Li CY: **Transplantation of VEGF165-gene-transfected endothelial progenitor cells in the treatment of chronic venous thrombosis in rats.** *Chinese medical journal* 2010, **123**(4):471-477.
68. Schuh A, Kroh A, Konschalla S, Liehn EA, Sobota RM, Biessen EA, Bot I, Tolga Taha S, Schober A, Marx N *et al*: **Myocardial regeneration by transplantation of modified endothelial progenitor cells expressing SDF-1 in a rat model.** *Journal of cellular and molecular medicine* 2012, **16**(10):2311-2320.
69. Kong D, Melo LG, Mangi AA, Zhang L, Lopez-Illasaca M, Perrella MA, Liew CC, Pratt RE, Dzau VJ: **Enhanced inhibition of neointimal hyperplasia by genetically engineered endothelial progenitor cells.** *Circulation* 2004, **109**(14):1769-1775.

70. Chen X, Gu M, Zhao X, Zheng X, Qin Y, You X: **Deterioration of cardiac function after acute myocardial infarction is prevented by transplantation of modified endothelial progenitor cells overexpressing endothelial NO synthases.** *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology* 2013, **31**(2-3):355-365.
71. Jiang M, Wang B, Wang C, He B, Fan H, Shao Q, Gao L, Liu Y, Yan G, Pu J: **In vivo enhancement of angiogenesis by adenoviral transfer of HIF-1alpha-modified endothelial progenitor cells (Ad-HIF-1alpha-modified EPC for angiogenesis).** *The international journal of biochemistry & cell biology* 2008, **40**(10):2284-2295.
72. Wognum AW, Lam V, Goudsmit R, Krystal G: **A specific in vitro bioassay for measuring erythropoietin levels in human serum and plasma.** *Blood* 1990, **76**(7):1323-1329.
73. Jelkmann W: **Regulation of erythropoietin production.** *The Journal of physiology* 2011, **589**(Pt 6):1251-1258.
74. Elliott S, Sinclair AM: **The effect of erythropoietin on normal and neoplastic cells.** *Biologics : targets & therapy* 2012, **6**:163-189.
75. Fisher JW: **Erythropoietin: physiology and pharmacology update.** *Experimental biology and medicine* 2003, **228**(1):1-14.
76. Marzo F, Lavorgna A, Coluzzi G, Santucci E, Tarantino F, Rio T, Conti E, Autore C, Agati L, Andreotti F: **Erythropoietin in heart and vessels: focus on transcription and signalling pathways.** *Journal of thrombosis and thrombolysis* 2008, **26**(3):183-187.
77. Lacombe C, Mayeux P: **The molecular biology of erythropoietin.** *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* 1999, **14** Suppl 2:22-28.
78. Noguchi CT, Wang L, Rogers HM, Teng R, Jia Y: **Survival and proliferative roles of erythropoietin beyond the erythroid lineage.** *Expert reviews in molecular medicine* 2008, **10**:e36.
79. Jelkmann W: **Physiology and pharmacology of erythropoietin.** *Transfusion medicine and hemotherapy : offizielles Organ der Deutschen Gesellschaft fur Transfusionsmedizin und Immunhamatologie* 2013, **40**(5):302-309.

80. Montesino R, Toledo JR, Sanchez O, Sanchez A, Harvey DJ, Royle L, Dwek RA, Rudd PM, Gerwig GJ, Kamerling JP *et al*: **Monosialylated biantennary N-glycoforms containing GalNAc-GlcNAc antennae predominate when human EPO is expressed in goat milk.** *Archives of biochemistry and biophysics* 2008, **470**(2):163-175.
81. Mattio M, Ceaglio N, Oggero M, Perotti N, Amadeo I, Orozco G, Forno G, Kratje R, Etcheverrigaray M: **Isolation and characterization of a subset of erythropoietin glycoforms with cytoprotective but minimal erythropoietic activity.** *Biotechnology progress* 2011, **27**(4):1018-1028.
82. Jones SS, D'Andrea AD, Haines LL, Wong GG: **Human erythropoietin receptor: cloning, expression, and biologic characterization.** *Blood* 1990, **76**(1):31-35.
83. Jelkmann W, Bohlius J, Hallek M, Sytkowski AJ: **The erythropoietin receptor in normal and cancer tissues.** *Critical reviews in oncology/hematology* 2008, **67**(1):39-61.
84. Watowich SS: **Activation of erythropoietin signaling by receptor dimerization.** *The international journal of biochemistry & cell biology* 1999, **31**(10):1075-1088.
85. Wojchowski DM, Gregory RC, Miller CP, Pandit AK, Pircher TJ: **Signal transduction in the erythropoietin receptor system.** *Experimental cell research* 1999, **253**(1):143-156.
86. Jegalian AG, Wu H: **Differential roles of SOCS family members in EpoR signal transduction.** *Journal of interferon & cytokine research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research* 2002, **22**(8):853-860.
87. Verdier F, Walrafen P, Hubert N, Chretien S, Gisselbrecht S, Lacombe C, Mayeux P: **Proteasomes regulate the duration of erythropoietin receptor activation by controlling down-regulation of cell surface receptors.** *The Journal of biological chemistry* 2000, **275**(24):18375-18381.
88. Shuai K: **Regulation of cytokine signaling pathways by PIAS proteins.** *Cell research* 2006, **16**(2):196-202.
89. Krebs DL, Hilton DJ: **SOCS proteins: negative regulators of cytokine signaling.** *Stem cells* 2001, **19**(5):378-387.
90. George J, Goldstein E, Abashidze A, Wexler D, Hamed S, Shmilovich H, Deutsch V, Miller H, Keren G, Roth A: **Erythropoietin promotes endothelial progenitor cell proliferative**

and adhesive properties in a PI 3-kinase-dependent manner. *Cardiovascular research* 2005, **68**(2):299-306.

91. Urao N, Okigaki M, Yamada H, Aadachi Y, Matsuno K, Matsui A, Matsunaga S, Tateishi K, Nomura T, Takahashi T *et al*: **Erythropoietin-mobilized endothelial progenitors enhance reendothelialization via Akt-endothelial nitric oxide synthase activation and prevent neointimal hyperplasia.** *Circulation research* 2006, **98**(11):1405-1413.
92. Cheng Y, Hu R, Lv L, Ling L, Jiang S: **Erythropoietin improves the efficiency of endothelial progenitor cell therapy after myocardial infarction in mice: effects on transplanted cell survival and autologous endothelial progenitor cell mobilization.** *The Journal of surgical research* 2012, **176**(1):e47-55.
93. Sharma RC, Schimke RT: **Preparation of electrocompetent E. coli using salt-free growth medium.** *BioTechniques* 1996, **20**(1):42-44.
94. Sambrook J, FEF, Maniatis T.: **Molecular cloning. A laboratory manual.** In. Edited by Cold Spring Harbor Laboratory Press e. New York; 1989.
95. Boussif O, Lezoualc'h F, Zanta MA, Mergny MD, Scherman D, Demeneix B, Behr JP: **A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1995, **92**(16):7297-7301.
96. Toledo JR, Prieto Y, Oramas N, Sanchez O: **Polyethylenimine-based transfection method as a simple and effective way to produce recombinant lentiviral vectors.** *Applied biochemistry and biotechnology* 2009, **157**(3):538-544.
97. Vasa M, Fichtlscherer S, Adler K, Aicher A, Martin H, Zeiher AM, Dimmeler S: **Increase in circulating endothelial progenitor cells by statin therapy in patients with stable coronary artery disease.** *Circulation* 2001, **103**(24):2885-2890.
98. Gonzalez-Pecchi V, Valdes S, Pons V, Honorato P, Martinez LO, Lamperti L, Aguayo C, Radojkovic C: **Apolipoprotein A-I enhances proliferation of human endothelial progenitor cells and promotes angiogenesis through the cell surface ATP synthase.** *Microvascular research* 2014, **98C**:9-15.
99. Livak KJ, Schmittgen TD: **Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method.** *Methods* 2001, **25**(4):402-408.

100. Ribatti D, Nico B, Vacca A, Roncali L, Burri PH, Djonov V: **Chorioallantoic membrane capillary bed: a useful target for studying angiogenesis and anti-angiogenesis in vivo.** *The Anatomical record* 2001, **264**(4):317-324.
101. Ribatti D, Presta M, Vacca A, Ria R, Giuliani R, Dell'Era P, Nico B, Roncali L, Dammacco F: **Human erythropoietin induces a pro-angiogenic phenotype in cultured endothelial cells and stimulates neovascularization in vivo.** *Blood* 1999, **93**(8):2627-2636.
102. Gonzalez-Chavarria I, Cerro RP, Parra NP, Sandoval FA, Zuniga FA, Omazabal VA, Lamperti LI, Jimenez SP, Fernandez EA, Gutierrez NA *et al*: **Lectin-like oxidized LDL receptor-1 is an enhancer of tumor angiogenesis in human prostate cancer cells.** *PloS one* 2014, **9**(8):e106219.
103. Baker M, Robinson SD, Lechertier T, Barber PR, Tavora B, D'Amico G, Jones DT, Vojnovic B, Hodivala-Dilke K: **Use of the mouse aortic ring assay to study angiogenesis.** *Nature protocols* 2012, **7**(1):89-104.
104. Ministerio de Salud: **Implementación del enfoque del riesgo en el programa de Salud Cardiovascular.** In.; 2010.
105. Matsuzawa Y, Guddeti RR, Kwon TG, Lerman LO, Lerman A: **Secondary Prevention Strategy of Cardiovascular Disease Using Endothelial Function Testing.** *Circulation journal : official journal of the Japanese Circulation Society* 2015.
106. Ramsey SA, Gold ES, Aderem A: **A systems biology approach to understanding atherosclerosis.** *EMBO molecular medicine* 2010, **2**(3):79-89.
107. Feng Y, Jacobs F, Van Craeyveld E, Brunaud C, Snoeys J, Tjwa M, Van Linthout S, De Geest B: **Human ApoA-I transfer attenuates transplant arteriosclerosis via enhanced incorporation of bone marrow-derived endothelial progenitor cells.** *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 2008, **28**(2):278-283.
108. Hu LM, Lei X, Ma B, Zhang Y, Yan Y, Wu YL, Xu GZ, Ye W, Wang L, Xu GX *et al*: **Erythropoietin receptor positive circulating progenitor cells and endothelial progenitor cells in patients with different stages of diabetic retinopathy.** *Chinese medical sciences journal = Chung-kuo i hsueh k'o hsueh tsa chih / Chinese Academy of Medical Sciences* 2011, **26**(2):69-76.

109. Satoh K, Kagaya Y, Nakano M, Ito Y, Ohta J, Tada H, Karibe A, Minegishi N, Suzuki N, Yamamoto M *et al*: **Important role of endogenous erythropoietin system in recruitment of endothelial progenitor cells in hypoxia-induced pulmonary hypertension in mice.** *Circulation* 2006, **113**(11):1442-1450.
110. Excoffon KJ, Bowers JR, Sharma P: **1. Alternative splicing of viral receptors: A review of the diverse morphologies and physiologies of adenoviral receptors.** *Recent research developments in virology* 2014, **9**:1-24.
111. Nemerow GR, Pache L, Reddy V, Stewart PL: **Insights into adenovirus host cell interactions from structural studies.** *Virology* 2009, **384**(2):380-388.
112. Russell WC: **Adenoviruses: update on structure and function.** *The Journal of general virology* 2009, **90**(Pt 1):1-20.
113. Marini FC, 3rd, Yu Q, Wickham T, Kovesdi I, Andreeff M: **Adenovirus as a gene therapy vector for hematopoietic cells.** *Cancer gene therapy* 2000, **7**(6):816-825.
114. Carson SD, Hobbs JT, Tracy SM, Chapman NM: **Expression of the coxsackievirus and adenovirus receptor in cultured human umbilical vein endothelial cells: regulation in response to cell density.** *Journal of virology* 1999, **73**(8):7077-7079.
115. Lemarchand P, Jones M, Yamada I, Crystal RG: **In vivo gene transfer and expression in normal uninjured blood vessels using replication-deficient recombinant adenovirus vectors.** *Circulation research* 1993, **72**(5):1132-1138.
116. Stocksclaeder M, Shardakova O, Weber K, Stoldt VR, Fehse B, Giers G, Scharf RE: **Highly efficient lentiviral transduction of phenotypically and genotypically characterized endothelial progenitor cells from adult peripheral blood.** *Blood coagulation & fibrinolysis : an international journal in haemostasis and thrombosis* 2010, **21**(5):464-473.
117. Heeschen C, Aicher A, Lehmann R, Fichtlscherer S, Vasa M, Urbich C, Mildner-Rihm C, Martin H, Zeiher AM, Dimmeler S: **Erythropoietin is a potent physiologic stimulus for endothelial progenitor cell mobilization.** *Blood* 2003, **102**(4):1340-1346.
118. Bahlmann FH, DeGroot K, Duckert T, Niemczyk E, Bahlmann E, Boehm SM, Haller H, Fliser D: **Endothelial progenitor cell proliferation and differentiation is regulated by erythropoietin.** *Kidney international* 2003, **64**(5):1648-1652.

119. Bahlmann FH, De Groot K, Spandau JM, Landry AL, Hertel B, Duckert T, Boehm SM, Menne J, Haller H, Fliser D: **Erythropoietin regulates endothelial progenitor cells**. *Blood* 2004, **103**(3):921-926.
120. Gokana A, Winchenne JJ, Ben-Ghanem A, Ahaded A, Cartron JP, Lambin P: **Chromatographic separation of recombinant human erythropoietin isoforms**. *Journal of chromatography A* 1997, **791**(1-2):109-118.
121. Caldini A, Moneti G, Fanelli A, Bruschetti A, Mercurio S, Pieraccini G, Cini E, Ognibene A, Luceri F, Messeri G: **Epoetin alpha, epoetin beta and darbepoetin alfa: two-dimensional gel electrophoresis isoforms characterization and mass spectrometry analysis**. *Proteomics* 2003, **3**(6):937-941.
122. Ausprunk DH: **Distribution of hyaluronic acid and sulfated glycosaminoglycans during blood-vessel development in the chick chorioallantoic membrane**. *The American journal of anatomy* 1986, **177**(3):313-331.
123. Fu SS, Li FJ, Wang YY, You AB, Qie YL, Meng X, Li JR, Li BC, Zhang Y, Da Li Q: **Kallikrein gene-modified EPCs induce angiogenesis in rats with ischemic hindlimb and correlate with integrin alphavbeta3 expression**. *PloS one* 2013, **8**(9):e73035.
124. Kalka C, Masuda H, Takahashi T, Kalka-Moll WM, Silver M, Kearney M, Li T, Isner JM, Asahara T: **Transplantation of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization**. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2000, **97**(7):3422-3427.
125. Di Santo S, Yang Z, Wyler von Ballmoos M, Voelzmann J, Diehm N, Baumgartner I, Kalka C: **Novel cell-free strategy for therapeutic angiogenesis: in vitro generated conditioned medium can replace progenitor cell transplantation**. *PloS one* 2009, **4**(5):e5643.