



VNIVERSIDAD
D SALAMANCA

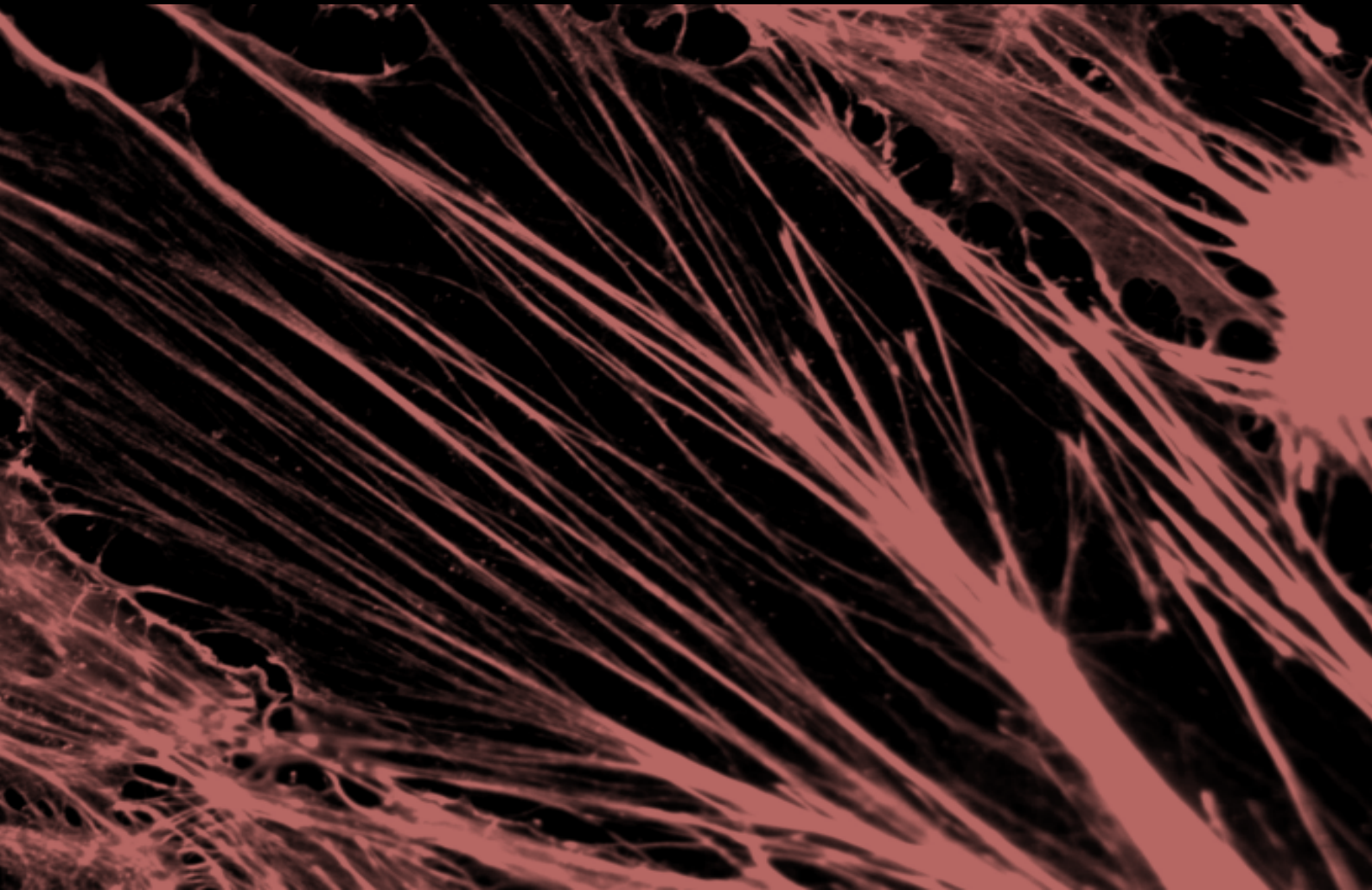
CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL

Departamento de Fisiología y Farmacología

· TESIS DOCTORAL ·
Mención "Doctorado Internacional"

Las isoformas de endoglina en la regulación de la angiogénesis

Elena Núñez Gómez



Salamanca,
20 de febrero de 2016



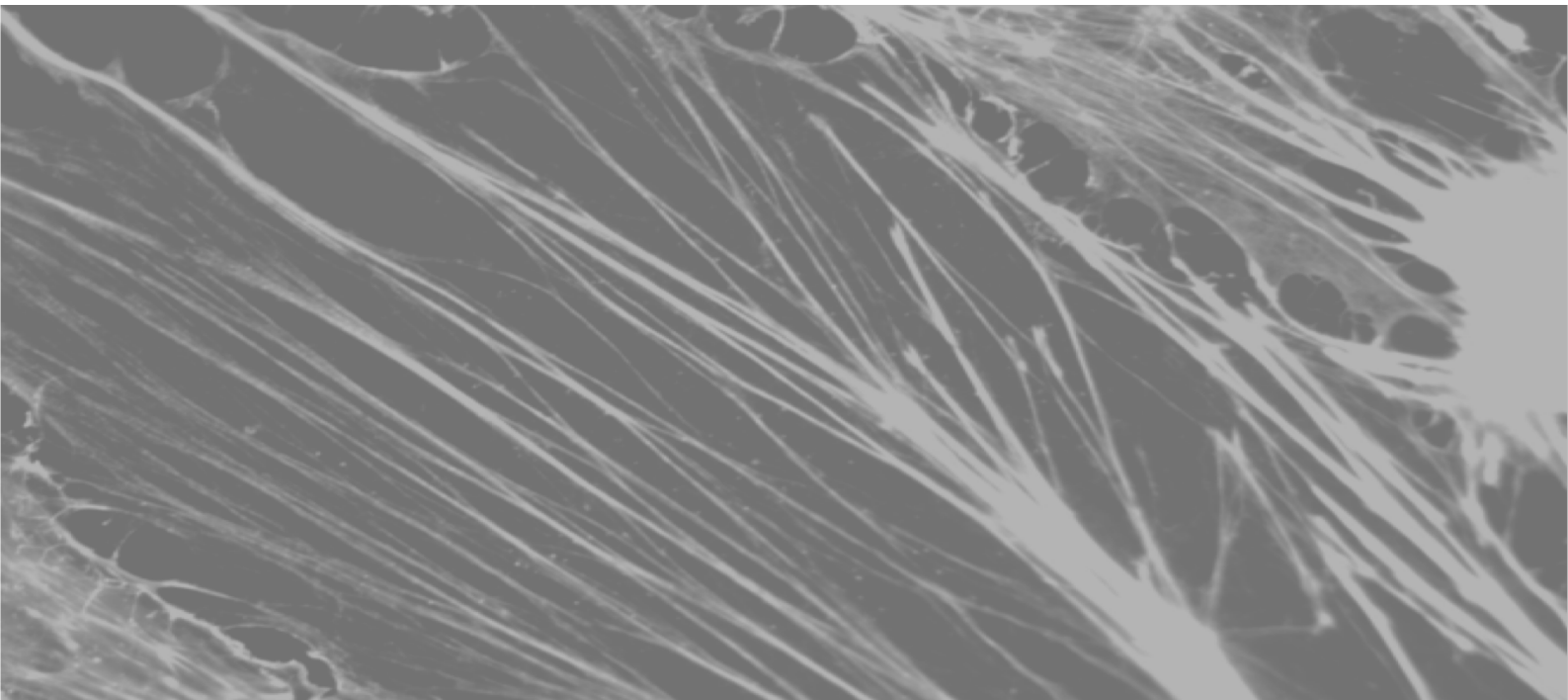
VNIVERSIDAD
D SALAMANCA

CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL

·TESIS DOCTORAL·

Mención "Doctorado Internacional"

Las isoformas de endogлина en la regulación de la angiogénesis



Elena Núñez Gómez

Salamanca, a 14 de enero de 2016



VNIVERSIDAD
D SALAMANCA

CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL

·TESIS DOCTORAL·

Las isoformas de endogлина en la regulación de la angiogénesis

Memoria presentada por **Elena Núñez Gómez**

para optar al Grado de Doctor

por la Universidad de Salamanca.

Mención "Doctorado Internacional".

Elena Núñez Gómez

Salamanca, a 14 de enero de 2016

LA DOCTORA DÑA. MARÍA JESÚS MONTE RÍO, DIRECTORA DEL DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA Y FARMACOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

CERTIFICA:

Que el presente trabajo, elaborado por Dña. Elena Núñez Gómez para optar al Grado de Doctor por la Universidad de Salamanca, con el título “Las isoformas de endoglina en la regulación de la angiogénesis”, ha sido realizado bajo la dirección conjunta del Doctor D. José Miguel López Novoa y el Doctor D. Miguel Pericacho Bustos, en el Área de Fisiología del Departamento de Fisiología y Farmacología de la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste, expido y firmo el presente certificado, en Salamanca, a 14 de enero de 2016.

Dra. Dña. María Jesús Monte Río

EL DOCTOR D. JOSÉ MIGUEL LÓPEZ NOVOA, CATEDRÁTICO DEL DEPARTAMENTO DE FISIOLOGÍA Y FARMACOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA, Y EL DOCTOR D. MIGUEL PERICACHO BUSTOS, PROFESOR AYUDANTE DOCTOR DEL DEPARTAMENTO DE FISIOLOGÍA Y FARMACOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

CERTIFICAN:

Que el presente trabajo, titulado “Las isoformas de endoglin en la regulación de la angiogénesis”, presentado por Dña. Elena Núñez Gómez para optar al Grado de Doctor por la Universidad de Salamanca, ha sido realizado bajo su dirección en el Área de Fisiología del Departamento de Fisiología y Farmacología de la Universidad de Salamanca, y considerando que cumple las condiciones necesarias, lo consideran finalizado y autorizan su presentación a fin de que pueda ser defendido ante el tribunal correspondiente.

Y para que así conste, expiden y firman el presente certificado, en Salamanca, a 14 de enero de 2016.

Dr. D. José Miguel López Novoa

Dr. D. Miguel Pericacho Bustos

Esta Tesis Doctoral ha sido financiada con una
Ayuda para la Formación del Personal Investigador,
financiada por el Ministerio de Economía y Competitividad,
e inicialmente concedida por el Ministerio de Ciencia e Innovación
(FPI-MICINN 2011).

Índice

“If you start me up I'll never stop.”

The Rolling Stones

| | |
|---|------|
| Índice | I |
| Índice de figuras | IX |
| Índice de tablas | XI |
| Abreviaturas y glosario | XV |
| Abreviaturas | XVII |
| Glosario de términos en inglés | XX |
| Introducción | 1 |
| 1. El sistema vascular | 4 |
| 1.1. Anatomía y fisiología de los vasos sanguíneos | 4 |
| 1.1.1. Estructura del árbol vascular | 4 |
| 1.1.2. El endotelio | 5 |
| 1.2. Formación de los vasos sanguíneos | 6 |
| 2. Angiogénesis | 8 |
| 2.1. Factor de Crecimiento Endotelial Vascular (VEGF) | 9 |
| 2.1.1. Isoformas de VEGF | 10 |
| 2.1.2. Receptores de VEGF | 11 |
| 2.2. Hipoxia y HIF-1 α | 12 |
| 2.2.1. HIF-1 α en la respuesta a hipoxia | 12 |
| 2.2.2. Genes de respuesta a hipoxia | 13 |
| 2.3. Inicio de la angiogénesis: <i>sprouting</i> o gemación | 14 |
| 2.3.1. Células <i>tipy stalk</i> : selección por inhibición lateral | 15 |
| 2.4. Crecimiento del <i>sprout</i> | 16 |
| 2.4.1. La familia de FGF | 17 |
| 2.4.2. Degradación y síntesis de la MEC | 18 |
| 2.5. Resolución de la angiogénesis: anastomosis y tubulogénesis | 19 |
| 2.6. Participación de células precursoras endoteliales en la angiogénesis | 21 |
| 2.7. Maduración del vaso: recubrimiento mural | 21 |
| 3. La superfamilia de TGF- β en la angiogénesis | 22 |
| 3.1. El Factor de Crecimiento Transformante β | 22 |
| 3.2. El complejo de receptores de TGF- β | 23 |
| 3.3. Señalización intracelular de TGF- β y BMP9 en las células endoteliales | 24 |

| | | |
|--------|--|-----------|
| 4 | Endoglina (CD105) | 27 |
| 4.1. | Expresión y distribución celular | 27 |
| 4.2. | Estructura | 28 |
| 4.2.1. | El dominio extracelular de endoglina | 29 |
| 4.2.2. | El dominio intracelular de endoglina | 29 |
| 4.2.3. | Isoformas de endoglina | 32 |
| 4.2.4. | Endoglina en el ratón | 33 |
| 4.3. | Niveles de endoglina y angiogénesis | 34 |
| 4.4. | Funciones celulares de endoglina que participan en la angiogénesis | 34 |
| 4.4.1. | Papel de endoglina en la especificación arterial y venosa | 34 |
| 4.4.2. | Expresión de endoglina en respuesta a hipoxia | 35 |
| 4.4.3. | Endoglina modula la liberación de factores proangiogénicos | 36 |
| 4.4.4. | Endoglina en relación con los precursores endoteliales | 37 |
| 4.4.5. | Endoglina modula la integridad de la barrera endotelial | 38 |
| 4.4.6. | Endoglina interacciona con proteínas de citoesqueleto y las adhesiones focales durante la migración celular | 40 |
| 4.4.7. | Endoglina regula la señalización de TGF- β y BMP9 en el endotelio | 40 |
| 4.4.8. | Endoglina puede participar en el reclutamiento de células murales | 42 |
| 4.5. | Función diferencial de las isoformas de endoglina en la angiogénesis | 44 |
| | Objetivos | 49 |
| | Materiales y métodos | 55 |
| 1. | Materiales | 57 |
| 2. | Ratones que sobreexpresan endoglina larga (<i>L-ENG^{fl}</i>) y corta (<i>S-ENG^{fl}</i>) | 57 |
| 2.1. | Mantenimiento y manipulación de los animales | 58 |
| 2.2. | Determinación del genotipo de los ratones | 59 |
| 3. | Isquemia-reperfusión femoral | 60 |
| 3.1. | Cirugía: isquemia femoral | 61 |
| 3.2. | Determinación de la perfusión con láser Doppler | 62 |
| 4. | Análisis de la vascularización de la retina | 64 |
| 4.1. | Aislamiento de retinas y estudio de la vasculatura por microscopía | 64 |
| 4.1.1. | Preparación de las retinas para su visualización microscópica | 64 |
| 4.1.2. | Análisis estructural de la vasculatura de la retina | 65 |
| 4.2. | Aislamiento de retinas para el estudio de la expresión génica | 66 |

| | |
|--|----|
| 5. Ensayo Directo de Angiogénesis <i>In Vivo</i> (EDAIV) | 67 |
| 5.1. Elaboración, implantación y extracción de los angiorreactores | 67 |
| 5.2. Distancia invadida por vasos en los angiorreactores | 68 |
| 5.3. Cuantificación de la invasión endotelial | 69 |
| 5.4. Preparación e implantación de <i>plugs</i> de Matrigel® | 69 |
| 5.5. Análisis de la expresión génica de las células de los <i>plugs</i> | 70 |
| 6. Ensayo de <i>sprouting</i> a partir anillos de aorta | 71 |
| 6.1. Iniciación del <i>sprouting</i> | 72 |
| 6.2. Análisis del volumen ocupado por <i>sprouts</i> con microscopía confocal | 73 |
| 6.3. Análisis de la expresión génica de los <i>sprouts</i> | 74 |
| 7. Métodos de cultivo celular | 75 |
| 7.1. Cultivo primario de células endoteliales de pulmón de ratón (MLEC) | 75 |
| 7.1.1. Cultivo de las células pulmonares | 75 |
| 7.1.2. Retirada de eritrocitos y macrófagos | 77 |
| 7.1.3. Selección de células endoteliales | 77 |
| 7.1.4. Mantenimiento de las MLEC | 78 |
| 7.2. Línea de células endoteliales EA.hy926 | 78 |
| 7.2.1. Mantenimiento de las EA.hy926 | 79 |
| 7.3. Técnicas básicas en cultivos celulares | 79 |
| 7.3.1. Tripsinización celular | 79 |
| 7.3.2. Recuento celular | 80 |
| 7.3.3. Congelación y descongelación de las líneas celulares | 80 |
| 7.3.4. Generación de clones estables de EA.hy926 | 81 |
| 7.4. Ensayos de proliferación celular | 81 |
| 7.4.1. Recuento directo del número de células | 81 |
| 7.4.2. ELISA de BrdU | 81 |
| 7.5. Ensayos de migración e invasión celular | 82 |
| 7.5.1. Ensayo de cierre de herida o <i>scratch</i> | 82 |
| 7.5.2. Ensayo de migración a través de <i>transwell</i> | 84 |
| 7.6. Ensayo de formación de estructuras similares a capilares <i>in vitro</i> | 85 |
| 7.6.1. Siembra de las células en Matrigel® para la formación de “pseudocapilares” | 85 |
| 7.6.2. Análisis y cuantificación de las imágenes | 85 |
| 7.7. Análisis de la expresión de proteínas mediante inmunofluorescencia de células en cultivo | 86 |
| 7.8. Análisis de la expresión de proteínas mediante citometría de flujo | 87 |

| | | |
|-------------------------|---|-----|
| 8. | Análisis del nivel de expresión de proteínas por <i>Western blot</i> _____ | 87 |
| 8.1. | Obtención de extractos de proteínas de tejidos y células _____ | 88 |
| 8.2. | Determinación de la concentración de proteínas _____ | 88 |
| 8.3. | Preparación de las muestras y electroforesis _____ | 89 |
| 8.4. | Transferencia _____ | 89 |
| 8.5. | Bloqueo e incubación con los anticuerpos _____ | 89 |
| 8.6. | Revelado _____ | 90 |
| 9. | Análisis del nivel de expresión génica por qPCR _____ | 91 |
| 9.1. | Extracción de ARN _____ | 91 |
| 9.1.1. | Extracción de ARN de células en cultivo _____ | 91 |
| 9.1.2. | Extracción de ARN de <i>plugs</i> y anillos de aorta _____ | 91 |
| 9.1.3. | Extracción de ARN de retina y otros tejidos _____ | 91 |
| 9.2. | Obtención de ADNc _____ | 92 |
| 9.3. | Preamplificación del ADNc _____ | 92 |
| 9.4. | Reacción de PCR para muestras preamplificadas _____ | 94 |
| 9.5. | Diseño de cebadores para qPCR _____ | 94 |
| 9.6. | PCR cuantitativa, qPCR o PCR a tiempo real _____ | 95 |
| 10. | Tratamiento de los datos y análisis estadísticos _____ | 97 |
| Resultados _____ | | 107 |
| 1. | Estudio de la sobreexpresión de las isoformas de endogлина humana en el modelo animal desarrollado para el estudio _____ | 109 |
| 2. | Descripción general comparativa de las líneas de ratones utilizadas _____ | 111 |
| 3. | Estudio del efecto de la sobreexpresión de endogлина en la reperusión post-isquémica _____ | 112 |
| 4. | Estudio del efecto de la sobreexpresión de endogлина en la angiogénesis <i>in vivo</i> _____ | 113 |
| 4.1. | Estudio del efecto de la sobreexpresión de endogлина en la respuesta angiogénica fisiológica en retina _____ | 114 |
| 4.1.1. | Análisis de la vasculatura de la retina _____ | 114 |
| 4.1.2. | Análisis de la expresión génica de marcadores endoteliales en retina _____ | 118 |
| 4.2. | Estudio del papel de la sobreexpresión de endogлина en el Ensayo Directo de Angiogénesis <i>In Vivo</i> _____ | 119 |
| 4.2.1. | Análisis de invasión endotelial en el Ensayo Directo de Angiogénesis <i>In Vivo</i> _____ | 119 |
| 4.2.2. | Análisis de la expresión génica en un ensayo de angiogénesis <i>in vivo</i> _____ | 121 |
| 5. | Estudio del efecto de la sobreexpresión de endogлина en el proceso de <i>sprouting</i> _____ | 123 |
| 5.1. | Análisis de la expresión marcadores de <i>sprouting</i> en retina _____ | 125 |

| | |
|---|-----|
| 5.2. Análisis de la expresión de marcadores de <i>sprouting</i> en <i>plugs</i> _____ | 127 |
| 5.3. Utilización de un modelo <i>ex vivo</i> de <i>sprouting</i> : anillos de aorta en Matrigel® _____ | 127 |
| 5.3.1. Evaluación del crecimiento de <i>sprouts</i> a partir de anillos de aorta _____ | 127 |
| 5.3.2. Análisis de la expresión génica de marcadores de <i>sprouting</i> en anillos de aorta _____ | 129 |
| 6. Generación de modelos celulares para el estudio del efecto de la sobreexpresión de las isoformas de endoglina en la angiogénesis _____ | 132 |
| 6.1. Células endoteliales de pulmón (MLEC) de ratones <i>WT</i> , <i>L-ENG⁺</i> y <i>S-ENG⁺</i> _____ | 132 |
| 6.2. Línea de células endoteliales humanas que sobreexpresan L-endoglina o S-endoglina _____ | 132 |
| 7. Análisis de la proliferación celular de células endoteliales en cultivo en respuesta a la sobreexpresión de endoglina _____ | 135 |
| 8. Análisis de la motilidad y la invasividad de células endoteliales en cultivo en respuesta a la sobreexpresión de endoglina _____ | 136 |
| 9. Análisis del efecto de la sobreexpresión de endoglina en la formación de estructuras similares a capilares <i>in vitro</i> _____ | 141 |
| 10. Estudio del efecto de la sobreexpresión de endoglina sobre la maduración vascular en la angiogénesis _____ | 141 |
| Discusión _____ | 151 |
| 1. Efecto de la sobreexpresión de endoglina en la reperusión post-isquémica _____ | 153 |
| 2. Efecto de la sobreexpresión de endoglina en la angiogénesis <i>in vivo</i> _____ | 154 |
| 3. Efecto de la sobreexpresión de endoglina en la regulación génica del <i>sprouting</i> _____ | 161 |
| 4. Efecto de la sobreexpresión de endoglina en la fisiología de la célula endotelial _____ | 162 |
| 5. Efecto de la sobreexpresión de endoglina sobre la cobertura mural del vaso en angiogénesis _____ | 168 |
| 6. Modelo: posible papel de endoglina durante la angiogénesis _____ | 170 |
| Conclusions _____ | 175 |
| Bibliografía _____ | 181 |
| Summary _____ | 211 |

Índice de figuras

| | |
|--|-----|
| Figura 1. Estructura de la pared vascular | 5 |
| Figura 2. Mecanismos de formación de vasos sanguíneos | 7 |
| Figura 3. Inducción de la angiogénesis por hipoxia | 9 |
| Figura 4. Complejo receptor de VEGF | 12 |
| Figura 5. Mecanismo celular de respuesta a hipoxia | 13 |
| Figura 6. Selección de células <i>tipy stalk</i> durante el <i>sprouting</i> | 17 |
| Figura 7. Anastomosis y tubulogénesis | 20 |
| Figura 8. Estructura molecular del dímero de endogлина | 30 |
| Figura 9. Dominio intracelular de las isoformas de endogлина de membrana | 31 |
| Figura 10. Procesamiento alternativo del ARNm de endogлина | 32 |
| Figura 11. Localización de endogлина en caveolas y relación con eNOS y VE-cadherina | 39 |
| Figura 12. Papel de endogлина en la señalización de TGF- β 1 y BMP9 en el endotelio | 41 |
| Figura 13. Construcción genética para la generación de los ratones <i>L-ENG^f</i> y <i>S-ENG^f</i> | 58 |
| Figura 14. Región del gen de endogлина humana amplificada en el genotipado | 60 |
| Figura 15. Anatomía de las extremidades posteriores del ratón | 62 |
| Figura 16. Sistema de adquisición de imágenes de flujo sanguíneo | 63 |
| Figura 17. Herramienta de cuantificación de las estructuras vasculares en retina | 66 |
| Figura 18. Ensayo Directo de Angiogénesis <i>In Vivo</i> | 68 |
| Figura 19. Anillos de aorta en Matrigel® | 72 |
| Figura 20. Iniciación del <i>sprouting</i> en anillos de aorta en Matrigel® | 73 |
| Figura 21. Imágenes de microscopía confocal de anillos de aorta en Matrigel® | 74 |
| Figura 22. Esquema del protocolo de cultivo de MLEC | 76 |
| Figura 23. Células utilizadas para este trabajo, creciendo en cultivo | 79 |
| Figura 24. Ensayo de cierre de herida o <i>scratch</i> | 83 |
| Figura 25. Esquema del experimento con <i>transwell</i> | 84 |
| Figura 26. Análisis digital de los pseudocapilares en Matrigel® | 85 |
| Figura 27. Kit de extracción de ARN: NucleoSpin® RNA | 92 |
| Figura 28. Modelo animal utilizado en el trabajo | 109 |
| Figura 29. Expresión de endogлина humana en tejido | 110 |
| Figura 30. Tamaño de las camadas y peso de los ratones | 111 |
| Figura 31. Reperfusión post-isquémica de la extremidad del ratón | 112 |
| Figura 32. Expresión de endogлина en los vasos de la retina en angiogénesis | 115 |
| Figura 33. Grado de vascularización de la retina | 116 |

| | |
|---|-----|
| Figura 34. Estructura de la vasculatura de la retina normal y efecto de la sobreexpresión de las isoformas de endoglina _____ | 116 |
| Figura 35. Expresión de marcadores endoteliales en retina _____ | 119 |
| Figura 36. Distancia invadida por los vasos en los angiorreactores _____ | 120 |
| Figura 37. Cantidad de células endoteliales que invaden los angiorreactores _____ | 121 |
| Figura 38. Expresión de marcadores endoteliales en los <i>plugs</i> de Matrigel® _____ | 122 |
| Figura 39. Expresión de marcadores de <i>sprouting</i> en retina _____ | 124 |
| Figura 40. Expresión de marcadores de precursores endoteliales en retina _____ | 125 |
| Figura 41. Expresión de marcadores de <i>sprouting</i> en <i>plugs</i> de Matrigel® _____ | 126 |
| Figura 42. <i>Sprouting</i> de anillos de aorta en Matrigel® tras 2,5 días _____ | 128 |
| Figura 43. Volumen de <i>sprouts</i> formados a partir de anillos de aorta en Matrigel® _____ | 129 |
| Figura 44. Expresión de marcadores endoteliales en anillos de aorta en Matrigel® _____ | 130 |
| Figura 45. Expresión de marcadores de <i>sprouting</i> en anillos de aorta en Matrigel® _____ | 131 |
| Figura 46. Expresión de L-endoglina y S-endoglina humanas en MLEC _____ | 133 |
| Figura 47. Expresión de L-endoglina y S-endoglina humanas en células EA.hy926 _____ | 134 |
| Figura 48. Número de células EA.hy926 tras 72 horas en cultivo _____ | 135 |
| Figura 49. Incorporación de BrdU por las células endoteliales en cultivo _____ | 136 |
| Figura 50. Distancia migrada por las células EA.hy926 en el ensayo de <i>scratch</i> _____ | 137 |
| Figura 51. Transmigración de células endoteliales en un gradiente de VEGF _____ | 139 |
| Figura 52. Transmigración de células endoteliales a través de Matrigel® _____ | 140 |
| Figura 53. Análisis de las estructuras similares a capilares formadas por células endoteliales en Matrigel® _____ | 142 |
| Figura 54. Expresión de un marcador de células murales en retina _____ | 144 |
| Figura 55. Expresión de marcadores de células murales en <i>plugs</i> de Matrigel® _____ | 145 |
| Figura 56. Expresión de marcadores de células murales relativizados por la expresión de marcadores endoteliales, en <i>plugs</i> de Matrigel® _____ | 146 |
| Figura 57. Expresión de citoquinas atrayentes de células murales en <i>plugs</i> de Matrigel® _____ | 147 |
| Figura 58. Expresión de citoquinas atrayentes de células murales en anillos de aorta en Matrigel® _____ | 148 |
| Figura 59. Hipótesis sobre la dinámica de expresión de endoglina durante la angiogénesis _____ | 171 |

Índice de tablas

| | |
|---|-----|
| Tabla 1. Cebadores para genotipado y condiciones de PCR | 60 |
| Tabla 2. Marcaje fluorescente de la vasculatura de la retina | 65 |
| Tabla 3. Anticuerpos para la obtención del cultivo primario de MLEC | 78 |
| Tabla 4. Condiciones inmunofluorescencia de células en cultivo | 86 |
| Tabla 5. Condiciones citometría de flujo | 87 |
| Tabla 6. Anticuerpos y condiciones de <i>Western blot</i> | 90 |
| Tabla 7. Cebadores comerciales para preamplificación | 93 |
| Tabla 8. Cebadores comerciales para qPCR | 94 |
| Tabla 9. Cebadores de diseño propio y condiciones de PCR | 96 |
| Tabla 10. Relación de reactivos y productos utilizados | 99 |
| Tabla 11. Relación de anticuerpos utilizados | 102 |
| Tabla 12. Relación de equipos / aparatos utilizados | 103 |
| Tabla 13. Relación de fabricantes y casas comerciales | 104 |
| Tabla 14. Relación de marcadores endoteliales analizados por qPCR | 114 |
| Tabla 15. Relación de marcadores de <i>sprouting</i> analizados mediante qPCR | 123 |
| Tabla 16. Relación de marcadores de células murales analizados mediante qPCR | 143 |
| Tabla 17. Posible papel de endoglina en las diferentes fases de la angiogénesis | 171 |

Abreviaturas y glosario

“ Como siempre, lo urgente no deja tiempo para lo importante. ”

Mafalda

Abreviaturas

| | |
|-------------|--|
| AcM | Anticuerpo monoclonal |
| AcP | Anticuerpo policlonal |
| ActRII | Receptor de tipo II de activina |
| ADN | Ácido desoxirribonucleico |
| ADNc | Ácido desoxirribonucleico complementario o copia |
| ALK | Receptor de tipo I de TGF- β (<i>Activin receptor-Like Kinase</i>) |
| ANGPT | Angiopoyetina |
| ARNm | Ácido ribonucleico mensajero |
| Asn | Aminoácido asparagina |
| BMP | Proteínas morfogénicas del hueso (<i>Bone Morphogenetic Proteins</i>) |
| BMPRII | Receptor de tipo II de BMP |
| BOEC | Células endoteliales aisladas de sangre (<i>Blood Outgrowth Endothelial Cells</i>) |
| BrdU | 5-bromo-2-desoxiuridina |
| BSA | Albúmina de suero bovino (<i>Bovine Serum Albumina</i>) |
| Cav-1 | Caveolina 1 |
| CD | Cluster de diferenciación (<i>Cluster of Differentiation</i>) |
| CMLV | Células de músculo liso vascular |
| Dll4 | Ligando de Notch (<i>Delta-Like Ligand 4</i>) |
| DMEM | <i>Dulbecco Modified Eagle Medium</i> |
| dNTP | Desoxirribonucleótidos trifosfato |
| ECFC | C. endoteliales formadoras de colonias (<i>Endothelial Colonies Forming Cells</i>) |
| ECGS | Suplemento para células endoteliales (<i>Endothelial Cell Growth Supplement</i>) |
| EDAIV/DIVAA | Ensayo Directo de Angiogénesis <i>In Vivo</i> / <i>Direct In Vivo Angiogenesis Assay</i> |
| EDTA | Ácido etilendiaminotetraacético |
| ELISA | Ensayo de inmunoadsorción enzimática (<i>Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay</i>) |
| ENG | Endoglina |
| eNOS | Óxido nítrico sintasa endotelial (<i>endothelial Nitric Oxide Synthase</i>) |
| EPC | Células progenitoras endoteliales (<i>Endothelial Progenitor Cells</i>) |
| ERK | <i>Extracellular-signal-regulated Kinase</i> |
| FBS | Suero bovino fetal (<i>Foetal Bovine Serum</i>) |
| FGF | Factor de crecimiento de fibroblastos (<i>Fibroblast Growth Factor</i>) |

| | |
|--------------------------|--|
| FGFR | Receptores de FGF (<i>FGF Receptors</i>) |
| FTTC | Isotiocianato de fluoresceína (<i>Fluorescein IsoThioCyanate</i>) |
| FLK | Receptor 2 de VEGF (<i>Fetal Liver Kinase-1</i>) |
| FLT | Receptor 1 de VEGF (<i>Fms-Like Tyrosine kinase-1</i>) |
| GAPDH | Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (<i>GlycerAldehyde 3-Phosphate DeHydrogenase</i>) |
| HA | Hemaglutinina de <i>Influenzza</i> |
| HHT | Telangiectasia Hemorrágica Hereditaria (<i>Haemorrhagic Hereditary Telangectasia</i>) |
| HIF | Factor inducible por hipoxia (<i>Hypoxia-Inducible Factor</i>) |
| HRE | Elemento de respuesta a hipoxia (<i>Hypoxia Response Element</i>) |
| HRP | Peroxidasa de rábano picante (<i>HorseRadish Peroxidase</i>) |
| Hsp90 | <i>Heat shock protein 90</i> |
| HUVEC | C. endoteliales de vena umbilical humana (<i>Human Umbilical Vein Endothelial Cells</i>) |
| JNK | <i>Jun N-terminal Kinase</i> |
| KDR | Receptor 2 de VEGF (<i>Kinase insert Domain Receptor</i>) |
| <i>L-ENG⁺</i> | Genotipo de ratón empleado en este trabajo, que sobreexpresa L-endogлина humana |
| MAPK | Proteínas kinasas activadas por mitógeno (<i>Mitogen Activated Protein Kinases</i>) |
| MEC | Matriz extracelular |
| MEEC | C. endoteliales embrionarias de ratón (<i>Mouse Embryonic Endothelial Cells</i>) |
| MLEC | C. endoteliales de pulmón de ratón (<i>Mouse Lung Endothelial Cells</i>) |
| NO | Óxido nítrico (<i>Nitric oxide</i>) |
| NRP | Neuropilinas |
| OIR | Retinopatía inducida por oxígeno (<i>Oxygen Induced Retinopathy</i>) |
| Oligo(dT) | Cebador de desoxitimas |
| PAGE | Electroforesis en gel de poliacrilamida (<i>PolyAcrlamide Gel Electrophoresis</i>) |
| PAI-1 | Inhibidor del activador del plasminógeno 1 (<i>Plasminogen Activator Inhibitor 1</i>) |
| pb | Pares de bases |
| PBS | Salino con tampón fosfato (<i>Phosphate-Buffered Saline</i>) |
| PCR | Reacción en cadena de la polimerasa (<i>Polimerase Chain Reaction</i>) |
| PDGF-B | Factor de crecimiento derivado de plaquetas B (<i>Platelet-Derived Growth Factor B</i>) |
| PDGFR- β | Receptor β de PDGF |
| PECAM | Molécula endotelial de adhesión a plaquetas (<i>Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule</i>) |
| PI3K | Fosfatidilinositol-3-kinasa (<i>phosphoinositide-3-kinase</i>) |
| PKC | Proteína kinasa C |
| PlGF | Factor de crecimiento de placenta (<i>Placental Growth Factor</i>) |

| | |
|--------------------------|---|
| PVDF | Difluoruro de polivinilideno (<i>PolyVinylidene Fluoride</i>) |
| pVHL | Factor von Hippel-Lindau |
| qPCR | PCR cuantitativa |
| RGD | Tripéptido arginina – glicina – aspartato |
| RPS13 | Proteína Ribosomal S13 (<i>Ribosomal Protein S13</i>) |
| RTK | Receptor tirosina kinasa |
| <i>S-ENG⁺</i> | Genotipo de ratón empleado en este trabajo que sobreexpresa S-endoglina humana |
| SDS | Dodecil sulfato sódico (<i>Sodium Dodecyl Sulphate</i>) |
| Ser | Aminoácido serina |
| Smad | <i>Small protein Mothers Against Decapentaplegic</i> |
| TEMED | Tetrametiletilendiamina (<i>TEtraMEthylEthyleneDiamine</i>) |
| TGF- β | Factor de crecimiento transformante β (<i>Transforming Growth Factorβ</i>) |
| Thr | Aminoácido treonina |
| TIMP | Inhibidores de metaloproteasas tisulares (<i>Tissue Inhibitors of MetalloProteinases</i>) |
| Tyr | Aminoácido tirosina |
| T β RII | Receptor de tipo II de TGF- β |
| VEGF | Factor endotelial de crecimiento vascular (<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>) |
| VEGFR | Receptor de VEGF |
| WT | Genotipo <i>wild type</i> o salvaje, control utilizado en este trabajo |
| ZO-1 | Proteína de las uniones ocluyentes 1 (<i>zonula occludens 1</i>) |
| ZP | Zona pelúcida |
| α SMA | Actina α de músculo liso vascular (<i>α Smooth Muscle Actin</i>) |

Glosario de términos en inglés

| | |
|-----------------------------|--|
| <i>Beadsmagnéticas</i> | Bolas magnéticas, en este caso cubiertas de anticuerpo secundario, empleadas para la selección específica de un tipo celular. |
| <i>Célula stalk</i> | Célula del tallo de un <i>sprout</i> . |
| <i>Célula tip</i> | Célula de la punta de un <i>sprout</i> . |
| <i>Curva de melting</i> | Curva de disociación de la doble hebra de ADN al someterla a un incremento gradual de la temperatura. |
| <i>Outlier</i> | Observación o dato que dista del resto de observaciones del experimento. |
| <i>Scratch</i> | “Herida” o región sin células en una monocapa para el estudio de la migración celular <i>in vitro</i> . |
| <i>Shear stress</i> | Estrés por cizalladura o de fricción, debido a la presión que el flujo laminar de la sangre ejerce sobre el endotelio. |
| <i>Splicing alternativo</i> | Modificación postranscripcional de ajuste o eliminación alternativa de intrones para dar lugar a diferentes ARNm. |
| <i>Sprout/sprouting</i> | Yema / gemación de las células endoteliales activas que inicia la angiogénesis. |
| <i>Stack</i> | Imagen de cada uno de los planos de una muestra adquiridos con microscopía confocal. |
| <i>Housekeeping</i> | Genes cuya expresión se utiliza como control interno en los experimentos de qPCR por ser constitutiva o no regulada y, por tanto, constante en todas las condiciones del experimento. |
| <i>Tag</i> | Etiqueta, que en este caso se le pone al gen de una proteína en la generación de transgénicos, para facilitar la detección de la misma. |
| <i>Threshold</i> | Línea horizontal que se establece sobre la gráfica de una reacción de qPCR y que corta a cada curva de amplificación, de cada una de las muestras, en su fase exponencial. Permite establecer el Ct (ciclo <i>threshold</i>), que es el ciclo de PCR al que la curva de amplificación de una determinada muestra corta la línea de <i>threshold</i> ; el Ct será tanto menor cuanto mayor sea la cantidad del ADN sustrato de PCR en esa muestra. |
| <i>Transwell</i> | Inserto con el fondo de membrana porosa, para estudiar el paso o migración de las células <i>in vitro</i> . |
| <i>Whole mount</i> | Montaje integral de la retina para estudios de inmunofluorescencia. |
| <i>Wild type</i> | Genotipo salvaje. |

Introducción

“ Como de *“stultorum infinitus est numerus”*,
infinitos son los que han gustado de la tal historia. ”

Bachiller Sansón Carrasco (bachiller por Salamanca)
Don Quijote de la Mancha – Parte II, Miguel de Cervantes

La adecuada vascularización de los tejidos es clave para un correcto funcionamiento fisiológico de los órganos. Por ello, la formación de vasos sanguíneos es esencial durante el crecimiento y el desarrollo del organismo. Tanto es así, que alteraciones en los procesos de formación de vasos sanguíneos pueden conllevar malformaciones incompatibles con la vida ya durante el desarrollo embrionario. También son causa directa de importantes patologías postnatales como las retinopatías, en las que una excesiva vascularización de la retina conlleva una pérdida de visión e incluso ceguera, así como la esclerosis sistémica, o complicaciones de la diabetes como las úlceras de los miembros inferiores. Además, la adecuada formación de vasos sanguíneos tras ciertos eventos patológicos constituye el pilar central de la recuperación de la función del órgano afectado. Cabe destacar la revascularización post-isquémica, esencial en la recuperación del tejido tras accidentes cerebrovasculares, infartos de miocardio o determinados procesos quirúrgicos. Pero sin duda, la mayoría de los estudios llevados a cabo hasta la fecha en torno a la formación, maduración y remodelado de los vasos sanguíneos, tienen por objetivo el estudio del cáncer, puesto que el crecimiento de los tumores sólidos, así como la progresión de la leucemia, dependen directamente de un proceso muy activo de vascularización que aporte nutrientes a las células tumorales, caracterizadas por sus elevadas necesidades metabólicas.

Durante los últimos veinte años, el papel de endoglina en la homeostasis y fisiología del endotelio y los vasos sanguíneos se ha hecho cada vez más evidente. Numerosos estudios muestran cómo endoglina es fundamental para una correcta neovascularización, así como su papel en diversas patologías relacionadas con los vasos sanguíneos. Es más, endoglina es considerada uno de los más específicos marcadores endoteliales, si no el más específico. Asimismo, su utilidad tanto en el diagnóstico como en la terapia de muchas de estas patologías ha quedado patente a lo largo de estos años.

A pesar de que endoglina se conoce desde hace más de veinticinco años y su importancia en los procesos de vascularización es evidente, como hemos señalado, hasta la fecha es muy poco, y en ocasiones contradictorio, lo que se sabe sobre los mecanismos mediante los que endoglina participa en el control de la fisiología vascular.

Por ello, el objetivo principal de este trabajo ha consistido en tratar de esclarecer qué papel juega endoglina en la sucesión de eventos que tiene lugar durante la formación de los vasos sanguíneos, utilizando para ello un modelo de sobreexpresión de endoglina, así como de una endoglina carente de casi todo su dominio intracelular, S-endoglina. El aumento en la expresión de endoglina sucede en condiciones fisiológicas durante la vascularización de los tejidos y durante la angiogénesis patológica, por lo que este modelo nos permite un acercamiento real al efecto del aumento de los niveles de endoglina en el endotelio, y la sobreexpresión de la isoforma S-endoglina posibilita el estudio del papel que en ello juega el dominio citosólico.

1. El sistema vascular

El sistema circulatorio en los mamíferos es un sistema cerrado que está formado por el corazón, motor propulsor de la sangre, y por los vasos sanguíneos, por los que circula esta sangre. Las funciones fundamentales de este sistema son el aporte de oxígeno y nutrientes a los tejidos del organismo junto con la retirada de los productos de desecho del metabolismo celular, y la conducción de diferentes hormonas y citoquinas desde sus sitios de producción a los órganos diana. En general, el sistema circulatorio participa en el mantenimiento de la homeostasis del organismo y así, de las condiciones adecuadas para su funcionamiento.

1.1. Anatomía y fisiología de los vasos sanguíneos

1.1.1. Estructura del árbol vascular

La red de vasos sanguíneos está formada por los árboles arterial y venoso. La circulación sanguínea se divide en mayor y menor. La circulación menor es la encargada de llevar la sangre desoxigenada desde el corazón a los pulmones, donde es oxigenada y dirigida de vuelta al corazón. En la circulación mayor, el árbol arterial lleva la sangre, oxigenada en los pulmones y bombeada por el corazón, hacia los diferentes tejidos, mientras que el sistema venoso recoge los productos metabólicos y lleva la sangre desoxigenada de vuelta hacia el corazón.

Además de a los vasos sanguíneos, el sistema circulatorio incluye al árbol linfático, que recoge el líquido y otros componentes sobrantes del espacio intersticial y lo devuelve a la circulación.

Las grandes arterias que salen de los ventrículos del corazón, se ramifican sucesivamente en arteriolas cada vez más pequeñas, que finalmente constituirán lechos de capilares sanguíneos. Los capilares tienen la pared vascular más sencilla de todos los vasos del organismo: está formada por una capa de células endoteliales rodeadas por su membrana basal y, en determinados órganos, además constan de una capa de pericitos (células murales). Esta sencillez en la estructura de su pared, así como la elevada proporción superficie-volumen de la misma, convierte a los capilares en el principal lugar de intercambio de nutrientes entre la sangre y las células del tejido irrigado. Las arteriolas y las vénulas presentan una pared vascular más compleja. La pared de las arteriolas consta de una serie de capas concéntricas de células de músculo liso vascular (CMLV), altamente compactadas e íntimamente unidas a la capa interna de células endoteliales. En las vénulas, la capa muscular es algo más difusa, y a través de ella

también puede tener lugar la extravasación de células y macromoléculas desde el torrente sanguíneo hacia los tejidos. Los grandes vasos, arterias y venas, constan de tres capas diferenciadas: la íntima, formada por las células endoteliales; la media, constituida por las CMLV, y una adventicia de fibroblastos, con matriz extracelular (MEC) y láminas elásticas. Las CMLV y las láminas elásticas se encargan del control del tono vascular (Jain, 2003) (Figura 1).

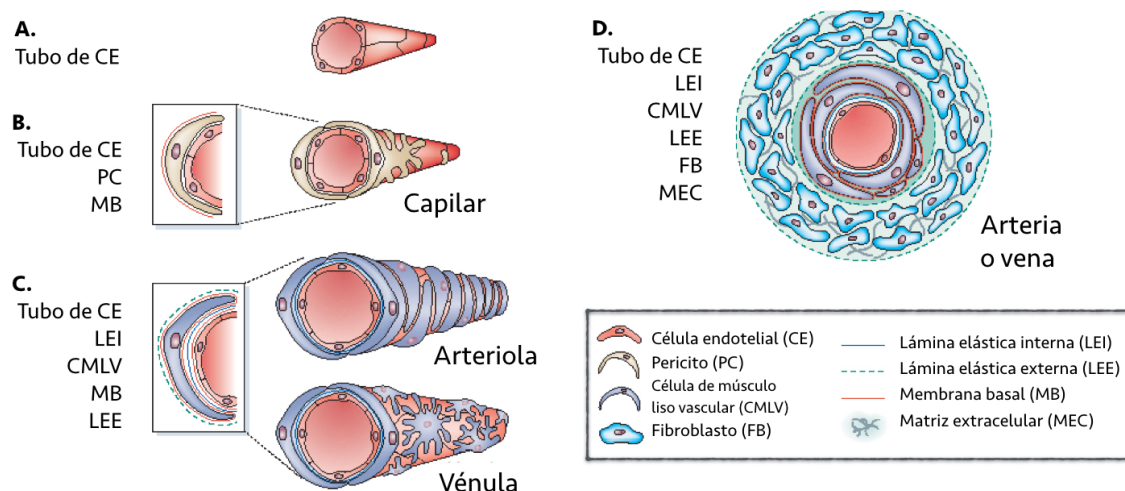


Figura 1. Estructura de la pared vascular

Células que componen la pared vascular en un vaso naciente (A), un capilar (B), en una arteriola o una vénula (C) y en una arteria o una vena (D). Adaptado de Jain, 2003.

1.1.2. El endotelio

El endotelio vascular constituye la capa que recubre la parte interior de los vasos. Durante mucho tiempo se pensó que el endotelio era una mera barrera o capa de revestimiento. La realidad es que su localización estratégica y su activo metabolismo hacen del endotelio un órgano clave en la regulación de muchos procesos fisiológicos fundamentales, como son la permeabilidad a los solutos y el aporte de nutrientes al tejido, la regulación del tono vascular y el flujo sanguíneo, la respuesta inflamatoria, la hemostasia o el remodelado de los tejidos circundantes a la vasculatura (Vane *et al*, 1990; Marsden *et al*, 1991).

Las células endoteliales son enormemente heterogéneas en cuanto a sus propiedades funcionales y a sus perfiles de expresión génica, que dependen del tipo de vaso al que pertenezcan, del órgano, de su grado de diferenciación y de su estado proliferativo. A grandes rasgos, podemos diferenciar a las células endoteliales en estado quiescente, que hacen del

endotelio una pared estable y una barrera funcional, y las células endoteliales activas que, ante determinados estímulos, pueden abandonar el endotelio y abordar procesos de proliferación, migración y quimiotaxis, o de establecimiento de uniones con otras células (Eilken & Adams, 2010). Las células quiescentes están altamente especializadas en el cumplimiento de la función de barrera selectiva, y constan de una membrana apical en la zona luminal del endotelio claramente diferenciada, al igual que las células de origen epidérmico. La regulación tanto de la activación y quiescencia del endotelio, como de la fisiología celular del endotelio activo, son claves durante la angiogénesis, proceso de formación de nuevos vasos sanguíneos y objeto de interés en este trabajo de tesis.

1.2. Formación de los vasos sanguíneos

A lo largo de la vida del organismo, podemos diferenciar dos procesos principales de formación de vasos sanguíneos, que son la vasculogénesis y la angiogénesis. Si bien existen otros procesos también importantes que complementan estos dos, como el remodelado vascular o la intususcepción, los más estudiados y principales responsables de la formación de nuevos vasos sanguíneos son los dos anteriormente referidos.

Tanto durante el desarrollo embrionario como durante la vida postnatal, el aporte de sangre a los tejidos es imprescindible para el crecimiento de los órganos. Por ello, es esencial que el sistema vascular presente la capacidad de acomodarse a las nuevas necesidades metabólicas que surgen durante el crecimiento y desarrolle los vasos que suplan de nutrientes al tejido de nueva formación.

La vasculogénesis consiste en la formación del plexo vascular primario o primitivo durante el desarrollo embrionario. Este proceso supone la formación de nuevos vasos a partir de hemangioblastos, células pluripotentes que también dan lugar a las líneas hematopoyéticas. Los hemangioblastos, estimulados por citoquinas entre las que destaca VEGF (del inglés, *Vascular Endothelial Growth Factor*), se diferencian y organizan dando lugar al plexo vascular primario. De esta red de vasos primitivos nacerán la aorta dorsal, la vena cardinal y los brotes que formarán las arterias y venas del saco embrionario (Figura 2). El sistema vascular aumenta su tamaño y complejidad durante el desarrollo embrionario gracias a los subsecuentes procesos de angiogénesis a partir del plexo primario (Coultas *et al*, 2005; Herbert & Stainier, 2011).

La angiogénesis es la formación *de novo* de vasos sanguíneos a partir de vasos preexistentes. Como ya hemos indicado, tiene lugar durante el desarrollo embrionario para

formar la vasculatura madura del embrión a término, pero también de forma postnatal, durante toda la vida del organismo (Jain, 2003).

La linfangiogenesis es el proceso de formación de los vasos linfáticos, y comparte numerosos mecanismos y vías de señalización con la angiogenesis (Herbert & Stainier, 2011) (Figura 2).

La angiogenesis ha sido un proceso ampliamente estudiado desde los años 30 del siglo pasado, así como numerosas veces revisado (Adams & Alitalo, 2007; Adams & Eichmann, 2010; Geudens & Gerhardt, 2011; Herbert & Stainier, 2011; Weis & Chersesh, 2011).

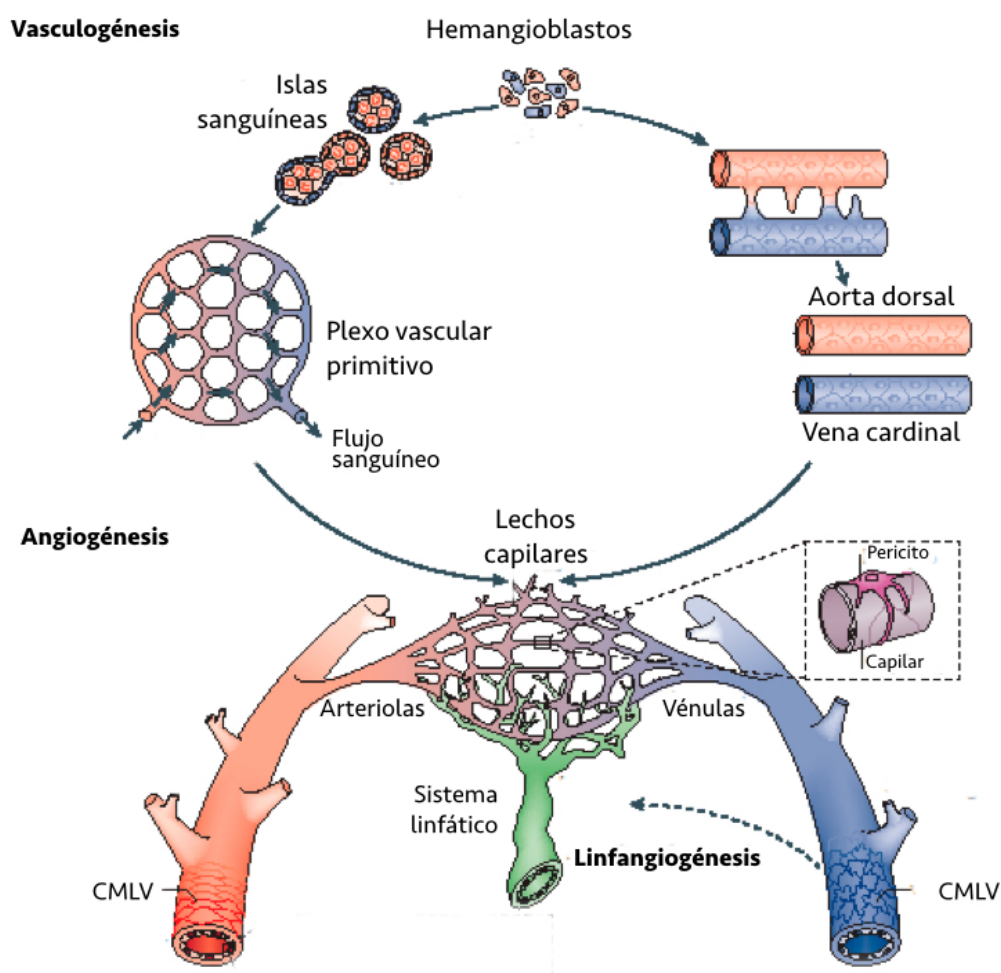


Figura 2. Mecanismos de formación de vasos sanguíneos

Representación esquemática de los procesos de formación de vasos sanguíneos: vasculogénesis, angiogénesis y linfangiogenesis. Adaptado de Herbert & Stainier, 2011.

2. Angiogénesis

La angiogénesis se define como el proceso de formación de vasos sanguíneos *de novo*, a partir de vasos preexistentes. La correcta formación y funcionalidad de los nuevos vasos sanguíneos va a permitir el desarrollo y crecimiento de los órganos y el mantenimiento de la homeostasis en el organismo adulto (Eilken & Adams, 2010; Geudens & Gerhardt, 2011). Alteraciones o defectos durante el proceso de angiogénesis son causa directa de importantes alteraciones presentes en enfermedades como la esclerosis sistémica (Manetti *et al*, 2010), o de complicaciones en la diabetes como úlceras en las extremidades inferiores debidas a una incorrecta cicatrización (Asai *et al*, 2012, 2013). Una excesiva angiogénesis es la responsable del estadio proliferativo de la retinopatía diabética (Tremolada *et al*, 2012), o de la degeneración macular húmeda (Prea *et al*, 2015). Además, la angiogénesis es imprescindible para el crecimiento de los tumores por encima de los 2 milímetros, donde tiene lugar de una forma altamente desregulada y exagerada, que no sólo permite el crecimiento tumoral, sino que lleva a la formación de vasos sanguíneos muy poco estables que frecuentemente facilitan las metástasis por su elevada permeabilidad (Carmeliet & Jain, 2011; Nassiri *et al*, 2011).

El proceso angiogénico se estudió por primera vez en 1939, cuando Ide y colaboradores observaron una potente respuesta de formación de vasos sanguíneos al implantar un tumor en la oreja de un conejo (Ide *et al*, 1939). Se trata de un proceso con una fina regulación a nivel molecular, muy conservada durante la evolución (Muñoz-Chápuli, 2011).

La angiogénesis se desencadena en respuesta a un estímulo, que es eminentemente la hipoxia. Así, ante el crecimiento de un órgano, el aporte sanguíneo ya no será suficiente para todo el tejido y las células más alejadas de los vasos sanguíneos se encontrarán ante una carencia de nutrientes, entre ellos el oxígeno (Figura 3A). Es esta situación de hipoxia la que estimula a los vasos preexistentes, que responden ramificándose y formando nuevos vasos en dirección al foco hipóxico, permitiendo finalmente el aporte sanguíneo necesario en esta zona.

Como ya veremos, en la respuesta a hipoxia son fundamentales las moléculas HIF-1 α y VEGF: ante la carencia de oxígeno, se acumula HIF-1 α (del inglés, *Hypoxia-Inducible Factor 1 α*), factor de transcripción que activa la expresión de los “genes de respuesta a hipoxia”, entre los que se encuentra VEGF. De esta forma, se genera un gradiente de VEGF, que estimula a las células endoteliales de los vasos adyacentes, que salen de su estado quiescente y crecen formando nuevos vasos (Figura 3B).

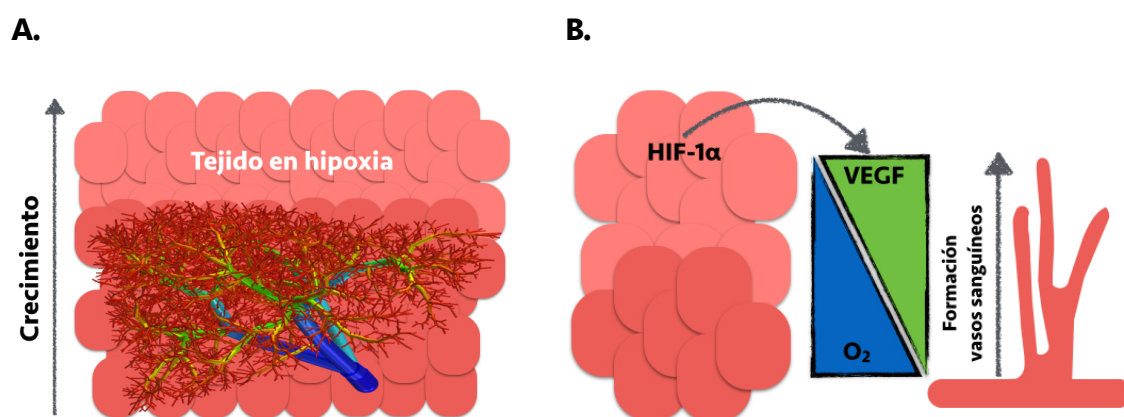


Figura 3. Inducción de la angiogénesis por hipoxia

A. El tejido de nueva formación de un órgano en crecimiento demanda aporte de nutrientes. B. El tejido en hipoxia libera HIF-1 α , que genera un gradiente de VEGF, que estimula la formación de vasos en dirección al foco hipóxico.

Además de la hipoxia, el efecto conocido como *shear stress* o “estrés por cizalladura”, también modula el equilibrio entre el estado de quiescencia y el estado proangiogénico del endotelio. Cambios en la presión que ejerce el flujo laminar de sangre sobre el endotelio, son transducidos en señales intracelulares que tienen un efecto en la expresión de genes pro y antiangiogénicos (Wragg *et al*, 2014).

El proceso de angiogénesis comprende una sucesión de eventos altamente coordinados. Así, en respuesta a VEGF, las células endoteliales se activan y desdiferencian, perdiendo su fenotipo quiescente característico en los vasos maduros, degradan la membrana basal y comienzan a formar una yema guiada por el gradiente de VEGF. Esta yema crece elongándose hacia la fuente de VEGF, adquiere un lumen que será la luz del nuevo vaso y, al encontrarse con otra yema, sufre un proceso de anastomosis. Finalmente el vaso podrá madurar gracias a la cobertura mural del endotelio. En los siguientes apartados explicamos más detalladamente todos estos eventos.

2.1. Factor de Crecimiento Endotelial Vascular (VEGF)

Hace cuatro décadas, Judah Folkman propuso la angiogénesis como una posible diana terapéutica frente al cáncer, tras aislar lo que él denominó TAF (del inglés, *Tumor Angiogenesis Factor*), que resultó ser VEGF (Folkman, 1971; Folkman *et al*, 1971).

A continuación, vamos a profundizar un poco en el papel del factor proangiogénico VEGF y en su regulación por hipoxia durante la angiogénesis.

2.1.1. Isoformas de VEGF

El gen *VEGF* codifica para varias isoformas conocidas de la proteína VEGF-A, que se generan por el *splicing* o ajuste alternativo de los 8 exones que lo conforman. Las isoformas de VEGF reciben su nombre en función del número de aminoácidos de la proteína madura, siendo las principales en humano VEGF₁₂₁, VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₉ y VEGF₂₀₆. Debido a sus diferentes tamaños, las diferentes isoformas presentan distinto comportamiento en el tejido: mientras que VEGF₁₂₁ difunde libremente, VEGF₁₈₉ y VEGF₂₀₆ quedan retenidos por la superficie celular y la MEC; VEGF₁₆₅ presenta características intermedias y es, además, la isoforma predominante.

VEGF₁₂₁ carece de los exones 6 y 7, codificando este último para la cola carboxi-terminal de la proteína, portadora de una secuencia básica de unión a heparina. Por ello, sólo VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₉ y VEGF₂₀₆ son capaces de unirse a los proteoglicanos que contengan heparina (comúnmente heparán sulfato) de la superficie celular y la MEC (Park *et al*, 1993; Ashikari-Hada *et al*, 2005). Como ya veremos, esta propiedad influye en la capacidad de VEGF para unirse a sus receptores. Para alguna de estas isoformas puede haber otra opción de *splicing* alternativo, que supone la sustitución del último exón por otro exón, “8b”, y dota a la proteína de propiedades antiangiogénicas (Nowak *et al*, 2008).

Se han descrito otras proteínas de la familia de VEGF: PlGF (del inglés, *Placental Growth Factor*), VEGF-B, VEGF-C y VEGF-D (Neufeld *et al*, 1999; Dehghanian *et al*, 2014). Todas estas moléculas han demostrado tener un papel en el desarrollo vascular.

Este papel central de VEGF en la angiogénesis y la fisiología vascular, le convierte en una diana terapéutica clave para el tratamiento antiangiogénico de diversas enfermedades, entre las que destaca el cáncer. Numerosos estudios recogen los efectos de tratamientos con inhibidores y anticuerpos contra VEGF, solos o combinados con otras drogas, puesto que son estrategias ampliamente utilizadas en la clínica que han demostrado aumentar el tiempo de supervivencia de los pacientes a la enfermedad. No obstante, no todos los pacientes responden a estos tratamientos y, sobre todo, en muchos casos se desarrolla resistencia (Carmeliet & Jain, 2011; Potente *et al*, 2011; Weis & Cheresh, 2011).

2.1.2. Receptores de VEGF

Se han descrito dos tipos de receptores de VEGF: los receptores tirosina-kinasa (RTK) y las neuropilinas (NRP) (Ferrara *et al*, 2003a).

Los RTK de VEGF son VEGFR1 y VEGFR2. Están formados por 7 dominios inmunoglobulina extracelulares, un solo dominio transmembrana, seguido de un dominio juxtamembranal, el dominio tirosina-kinasa y una cola C-terminal. El principal receptor para VEGF en el endotelio es VEGFR2, también conocido como KDR (del inglés, *Kinase insert Domain Receptor*) o Flk1 en ratón (del inglés, *Fetal Liver Kinase-1*), aunque VEGFR1 (Flt1 en ratón, del inglés, *Fms-Like Tyrosine kinase-1*) también se expresa en células endoteliales. La afinidad de VEGFR2 por sus ligandos es menor que la de VEGFR1, aunque su actividad kinasa es más potente (Shibuya & Claesson-Welsh, 2006). Existe un tercer RTK de VEGF, VEGFR3, relacionado con procesos de vasculogénesis y linfangiogénesis (Olsson *et al*, 2006).

VEGFR2 es considerado como el principal receptor de VEGF involucrado en vasculogénesis y angiogénesis, al mediar en las células endoteliales los procesos de diferenciación, proliferación y migración en respuesta a VEGF (Koch *et al*, 2011). Tras la unión del ligando, los receptores de VEGF dimerizan, formando homo o heterodímeros por unión a través de su dominio inmunoglobulina 7, contiguo a la membrana plasmática. Se cree que VEGFR1 ejerce una regulación negativa de la señalización a través de VEGFR2, modulando negativamente su respuesta proangiogénica: así, tanto VEGFR1 como su forma soluble, sFlt1, actúan secuestrando ligando VEGF, e impidiendo así su señalización a través de VEGFR2 (Hazarika *et al*, 2007). VEGF-A interacciona tanto con VEGFR1 como con VEGFR2 o heterodímeros de ambos receptores, mientras que PlGF y VEGF-B pueden unirse exclusivamente a VEGFR1. VEGF-C y VEGF-D se unen a VEGFR3 o a heterodímeros VEGFR2-3 (Olsson *et al*, 2006) (Figura 4).

En cuanto a las NRP, se han descrito dos tipos, NRP-1 y NRP-2. Se les considera coreceptores de VEGF. NRP-1 es marcador de identidad arterial, mientras que NRP-2 está presente preferentemente en venas y vasos linfáticos.

NRP-1 promueve la señalización de VEGF-A a través de VEGFR2 de una forma heparina-dependiente, por lo que VEGF₁₂₁, aunque sí se puede unir a NRP-1, no es capaz de inducir su acomplejamiento con VEGFR2 y, por tanto, su actividad proangiogénica (Ferrara *et al*, 2003b; Koch *et al*, 2011) (Figura 4).

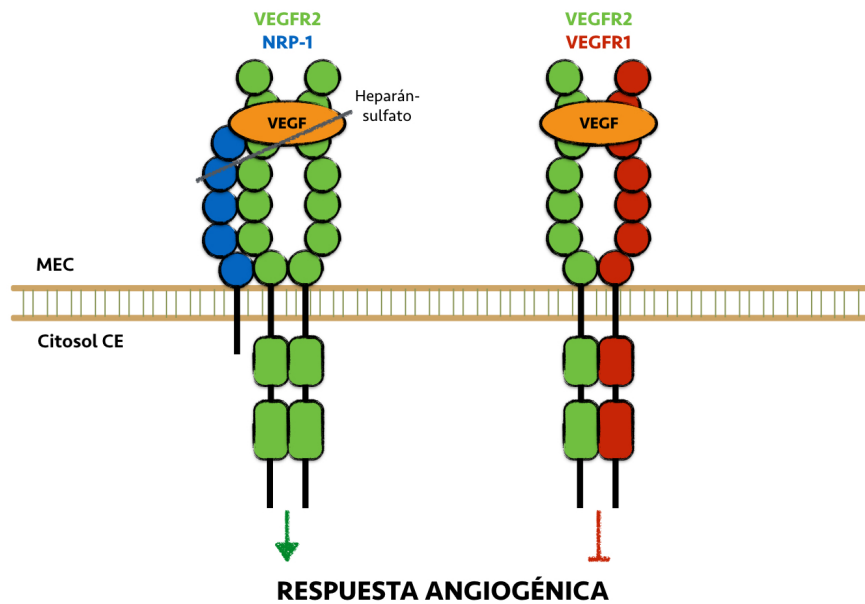


Figura 4. Complejo receptor de VEGF

Mecanismo de señalización de VEGF en las células endoteliales. Señalización a través de sus diferentes receptores y efecto sobre la respuesta angiogénica. Adaptado de Koch *et al*, 2011.

2.2. Hipoxia y HIF-1 α

2.2.1. HIF-1 α en la respuesta a hipoxia

Las células en los tejidos reciben aporte de oxígeno por difusión simple. Pero el crecimiento de un órgano, bien sea de forma fisiológica (durante el desarrollo, por efecto del ejercicio, etc.) o patológica (por ejemplo, en el crecimiento tumoral), por encima del límite de difusión del oxígeno desde el árbol sanguíneo más próximo, supone la creación de una región hipóxica en el tejido de nueva formación. En este ambiente hipóxico, las células producen factores de respuesta a hipoxia que estimulan a las células endoteliales de los vasos circundantes y éstas responden iniciando la angiogénesis, que en último lugar generará los vasos que van a irrigar la zona afectada.

Esta respuesta a hipoxia viene mediada por HIF-1 (del inglés, *Hypoxia-Inducible transcription Factor 1*). En condiciones de normoxia, la subunidad HIF-1 α está siendo continuamente ubiquitinada por el dominio ubiquitina ligasa del factor von Hippel-Lindau (pVHL) y, por consiguiente, está siendo degradada en el proteasoma. Ante una baja biodisponibilidad de O₂, la subunidad α de HIF-1 se acumula y viaja al núcleo, donde actúa como

factor de transcripción regulando la expresión de los genes de respuesta a hipoxia. HIF-1 α consta de un dominio ODD (del inglés, *Oxygen-dependent Degradation Domain*), que contiene dos residuos de prolina susceptibles de ser hidroxilados: Pro⁴⁰² y Pro⁵⁶⁴. Esta hidroxilación es llevada a cabo por enzimas prolil hidroxilasas (PHD) o HIF prolil hidroxilasas (HPH), que necesitan O₂ como cofactor para la catálisis. Estos residuos hidroxilados permiten la unión y actuación del factor pVHL. Pero en condiciones de hipoxia, con una reducida biodisponibilidad de O₂, las prolinas de HIF-1 α no son hidroxiladas y, por tanto, HIF-1 α no es ubiquitinado para su degradación (Lee *et al*, 2004a). De esta forma, HIF-1 α se acumula y puede ser translocado al núcleo gracias a la unión a proteínas importinas (Depping *et al*, 2008). En el núcleo, HIF-1 α se une con la subunidad nuclear HIF-1 β y constituye el factor de transcripción activo (Figura 5).

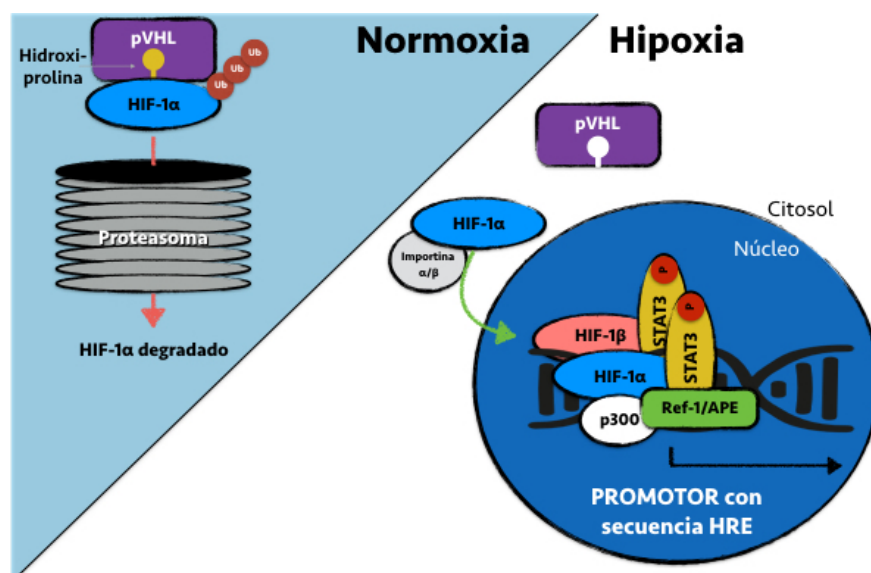


Figura 5. Mecanismo celular de respuesta a hipoxia

Ubiquitinación y degradación de HIF-1 α en normoxia. Activación y acumulación de HIF-1 α en hipoxia. Activación de promotores con elemento HRE por HIF-1 α . Adaptado de Ghosh *et al*, 2009 y Ahluwalia & Tarnawski, 2012.

2.2.2. Genes de respuesta a hipoxia

El factor HIF-1 promueve el aumento de la expresión de genes de respuesta a hipoxia, portadores de la secuencia *enhancer* de promotor HRE (del inglés, *Hypoxia Response Element*). Uno de los genes portadores de esta secuencia es *VEGF* (Levy *et al*, 1995; Liu *et al*, 1995), pero

también lo son otros muy importantes en angiogénesis como *ANGPT2* y *ANGPT4* (Yamakawa *et al*, 2003), *TGFB1* (Hung *et al*, 2013), o el gen de la proteína a estudio en este trabajo de tesis, endogлина (Sanchez-Elsner *et al*, 2002; Li *et al*, 2003; Fujita *et al*, 2010).

Por tanto, HIF-1 forma parte del complejo de transcripción que regula la expresión de VEGF en respuesta a hipoxia, junto con STAT3, el co-activador CBP/p300 y el factor de co-transcripción Ref-1/APE (Gray *et al*, 2005; Ghosh *et al*, 2009). De esta forma, ante una acumulación de HIF-1 α , se induce la expresión y liberación de VEGF. Este efecto será tanto más intenso cuanto mayor sea la hipoxia, creándose así un gradiente de concentración de VEGF, que será más abundante en la zona más hipóxica (Ahluwalia & Tarnawski, 2012).

2.3. Inicio de la angiogénesis: *sprouting* o gemación

Como hemos señalado, las células endoteliales responden a la hipoxia gemando, es decir, formando un pequeño brote o yema (*sprout*) a partir de un capilar preexistente que crecerá en dirección al foco hipóxico o “penumbra isquémica”. Por ello, este proceso se conoce como *sprouting* o gemación.

Durante el *sprouting*, las células endoteliales migran en dirección al foco de la hipoxia, proliferan y establecen conexiones adecuadas y estables entre ellas, formando finalmente un vaso funcional. Este vaso puede sufrir posteriores procesos de remodelado, de maduración mediante reclutamiento de células murales, de especificación de la identidad arterial o venosa, o incluso de desaparición (Eilken & Adams, 2010; Herbert & Stainier, 2011).

El aumento de los niveles de VEGF que se genera en respuesta a hipoxia, es detectado por las células endoteliales gracias a su unión a VEGFR2. Esta unión desencadena un mecanismo molecular por el que las células endoteliales afectadas adquieren diferentes fenotipos, de una forma altamente coordinada. La unión de VEGF a su receptor en las células endoteliales, modula procesos altamente involucrados en la angiogénesis como son la migración, la proliferación o la unión a MEC de las células endoteliales (Adams & Alitalo, 2007; Chappell *et al*, 2011), además de regular su supervivencia y aumentar la permeabilidad del endotelio (Darland *et al*, 2003; Lee *et al*, 2007; Persson & Buschmann, 2011). Este aumento de la permeabilidad por disrupción de las uniones entre células endoteliales también se observa durante el proceso de *sprouting* que da comienzo a la angiogénesis.

2.3.1. Células *tipy stalk* selección por inhibición lateral

La unión de VEGF a su receptor de la superficie celular, conlleva la diferenciación de esa célula a “célula punta” o “célula *tip*”. La célula *tip*, con un fenotipo predominantemente migratorio, lidera la formación del *sprout* en dirección al foco hipóxico gracias a la adquisición de estructuras similares a filopodios que median el avance de la célula, guiada por el gradiente de VEGF.

La diferenciación de una célula a *tip* desencadena un proceso de inhibición lateral por el que se impide que las células endoteliales contiguas a la célula *tip* se diferencien del mismo modo. En cambio, estas células adquieren fenotipo de “célula del tallo” o “célula *stalk*”, altamente proliferativa. Las células *stalk* se dividen y constituyen el nuevo vaso primitivo, siempre unidas al vaso parental y dirigidas por la célula *tip* (Adams & Alitalo, 2007; Chappell *et al*, 2011). Este proceso está controlado por la señalización a través de la vía de Notch. Notch es una molécula clave en la regulación del destino y el fenotipo celular, regulando procesos de diferenciación en numerosos tejidos y organismos diferentes. Aunque se considera que VEGF activa a las células endoteliales, no todas responden de la misma manera. La unión de VEGF a VEGFR2, abundante en células susceptibles de convertirse en célula *tip*, conlleva un aumento de la expresión del ligando de Notch, Dll4 (del inglés, *Delta-Like Ligand 4*), que se unirá al receptor Notch de las células vecinas. La activación del receptor Notch en estas células induce el corte proteolítico de su dominio citosólico por acción de la enzima γ -secretasa. El fragmento intracelular de Notch actúa como factor de transcripción y reduce la expresión de VEGFR2 y Dll4, pasando estas células, vecinas de las *tip*, a ser menos susceptibles de transformarse también en *tip*, y haciéndolo preferentemente en *stalk*. Además, la activación de Notch en la célula *stalk* induce la expresión de VEGFR1, que impedirá la acción de VEGF a través de su receptor 2 y, así, la diferenciación de la célula a *tip* (Phng & Gerhardt, 2009; Eilken & Adams, 2010; Jakobsson *et al*, 2010; Chappell *et al*, 2011; Blanco & Gerhardt, 2013). Asimismo, la activación de Notch induce la expresión de otro ligando de Notch, Jagged1 (Jag1), que no está presente en células *tip*. La unión de Jag1 a su receptor Notch en la célula *tip* no induce su corte proteolítico y evita la unión de Dll4, por lo que en esta célula no se activa la vía de Notch (Gerhardt *et al*, 2003; Geudens & Gerhardt, 2011).

Por tanto, las células que van a competir por la posición de célula *tip* expresan niveles elevados de VEGFR2 y también de Dll4, mientras que presentan niveles bajos de Notch, VEGFR1 y su forma soluble, sFlt1 (Jakobsson *et al*, 2010). Además, también se caracterizan por una elevada expresión de otros marcadores como PDGF-B (del inglés, *Platelet-Derived Growth Factor B*), UNC5b (receptor de netrina) y VEGFR3 (o Flt-4 en pez cebra) (Gerhardt *et al*, 2003; Lu *et al*, 2004; Hellstrom *et al*, 2007; Larrivee *et al*, 2007; Siekmann & Lawson, 2007; Jakobsson

et al, 2010). PDGF-B juega un papel principal en el proceso de reclutamiento de células murales, esencial para la maduración vascular (Hellstrom *et al*, 1999). UNC5b es un receptor de netrina-1 específico del endotelio. UNC5b-netrina-1 controlan la retracción de los filopodios durante el *sprouting* (Lu *et al*, 2004). VEGFR3 participa en linfangiogénesis (Koch *et al*, 2011). Por el contrario, las células *stalk* se caracterizan por niveles elevados de Notch1 activo (Hofmann & Iruela-Arispe, 2007a, 2007b), y por expresar preferentemente VEGFR1 y Jag1. La sobreexpresión de Jag1 aumenta la ramificación de los vasos y la proliferación de las células endoteliales, mientras que su delección lleva a una importante reducción en el número de células *tip* y filopodios por la inducción de la señalización vía Notch1 / Dll4 (Benedito *et al*, 2009). La supresión de la señalización a través de Notch mediante la inhibición de la enzima encargada de su liberación (γ -secretasa) o mediante la delección de un alelo del gen Dll4 en ratón, aumenta tanto el *sprouting* como la ramificación de los vasos formados, lo que resulta en un aumento de la perfusión de la red capilar como resultado de una excesiva diferenciación de las células a fenotipo *tip* (Hellstrom *et al*, 2007; Siekmann & Lawson, 2007).

Por tanto, y resumiendo, VEGF induce la diferenciación de una célula endotelial a célula *tip*, lo cual lleva a la expresión en superficie de Dll4, que mediará la inhibición lateral entre la célula *tip* (emisora) y las células *stalk* (receptoras, portadoras del receptor Notch para Dll4), impidiendo que éstas adquieran el fenotipo *tip* (Phng & Gerhardt, 2009; Eilken & Adams, 2010; Jakobsson *et al*, 2010; Chappell *et al*, 2011; Blanco & Gerhardt, 2013) (Figura 6A).

2.4. Crecimiento del *sprout*

El crecimiento del *sprout* en dirección al estímulo angiogénico requiere la proliferación y migración de las células endoteliales.

Las células *tip* son atraídas quimiotácticamente por el gradiente de citoquinas generado en la zona hipóxica, principalmente VEGF-A, que determina la dirección de migración. Por el contrario, las células *stalk*, que llevarán a cabo la formación del tubo, responden a las citoquinas proangiogénicas con una activa proliferación (Figura 6B). No se conoce bien si son las células *tip* quienes migran delante de las *stalk*, o si la proliferación de las células *stalk*, empuja a las células *tip*, contribuyendo así al crecimiento del *sprout* (Adams & Alitalo, 2007).

Recientemente se ha visto que, en células endoteliales en cultivo, la exposición a hipoxia conlleva una reducción en la expresión de VEGFR2 y un aumento de la expresión de VEGFR1, lo que conlleva una reducida respuesta intracelular a VEGF, así como una menor respuesta migratoria a VEGF. Es decir: se comportan como células *stalk* (Ulyatt *et al*, 2011).

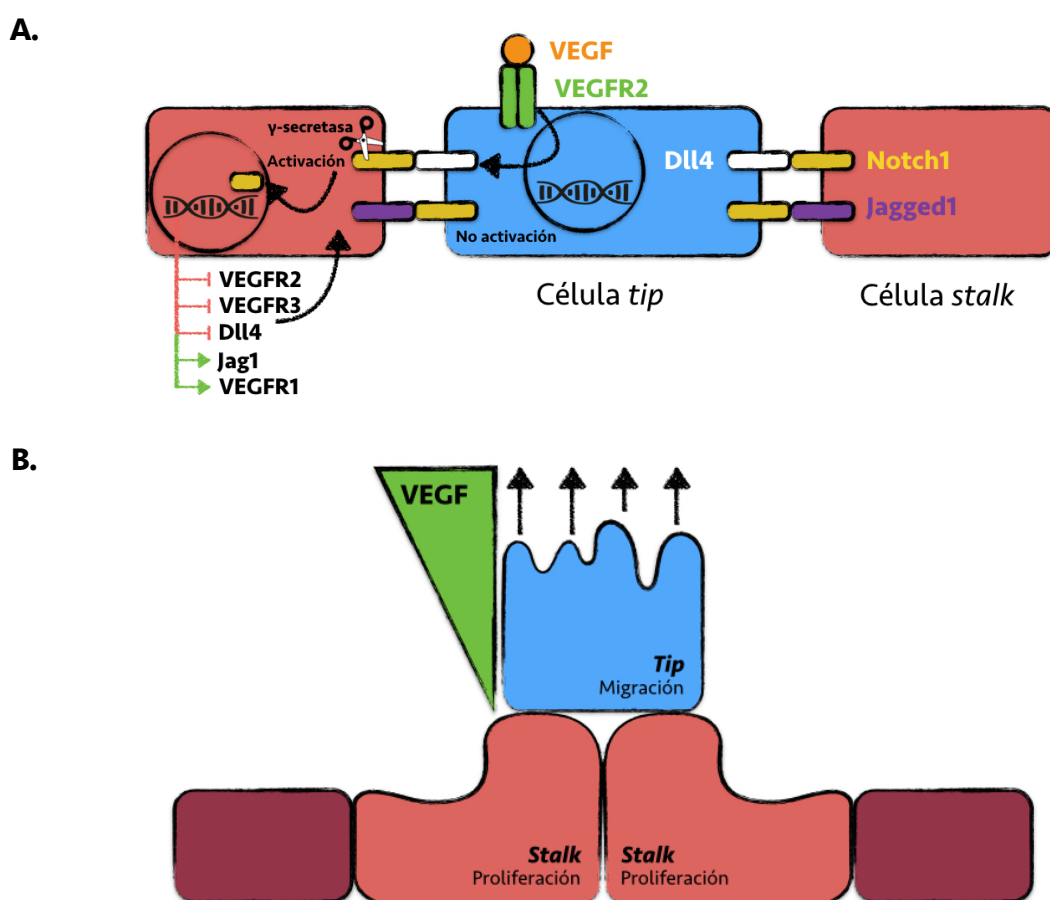


Figura 6. Selección de células *tip* y *stalk* durante el *sprouting*

A. Mecanismo de inhibición lateral *tip* / *stalk* mediante la modulación de la expresión génica por la señalización de la vía de Notch. Adaptado de Blanco & Gerhardt, 2012 y Larrivee *et al*, 2012. B. Respuesta de las células *tip* y *stalk*: las *tip* degradan la MEC y migran guiadas por el gradiente de VEGF, y las *stalk* les siguen y proliferan formando un vaso primitivo.

2.4.1. La familia de FGF

Los factores FGF (del inglés, *Fibroblast Growth Factor*), principalmente FGF1 y FGF2, son conocidos mitógenos en células endoteliales y CMLV, así como potentes estímulos proangiogénicos, tanto *in vitro* como *in vivo*. Los miembros de la familia de FGF, codificados por 4 genes, *FGF1-4*, estimulan la dispersión de células endoteliales durante el *sprouting*, participando en el control de la proliferación, migración y morfogénesis de las células endoteliales, pero también son necesarios en bajos niveles para la maduración de los vasos sanguíneos, e incluso en la degradación de la MEC (Dell'Era *et al*, 2005; Presta *et al*, 2005; Turner & Grose, 2010). FGF-2 es uno de los principales estimuladores de la proliferación de las células

endoteliales (Margosio *et al*, 2003). Existen otras isoformas de FGF expresadas por células endoteliales y de músculo liso vascular, y a las que se les conoce algún papel durante la angiogénesis, como FGF_{3,4,5,7,8,9} y ₁₀ (Presta *et al*, 2005; Ronca *et al*, 2015).

Los receptores de FGF (FGFR) son proteínas tirosina-kinasa y, al igual que sucedía con VEGF, la unión de FGF a sus receptores viene mediada por proteoglicanos heparán-sulfato. Las células endoteliales y las CMLV expresan un patrón muy parecido de receptores de FGF: expresan las isoformas IIIc – generadas por *splicing* alternativo – de los receptores FGFR₁, FGFR₂ y FGFR₃. Las células endoteliales expresan además FGFR₅ o FGFR_L, que carece de dominio tirosina-kinasa. Recientemente se ha demostrado que la señalización a través de los receptores de FGF está implicada en la angiogénesis, el mantenimiento de la estabilidad del endotelio y la regeneración tras un daño tisular (De Smet *et al*, 2014). Además, la pérdida de la expresión endotelial de los genes *Fgfr1* y *Fgfr2* en ratón impide una correcta revascularización durante la cicatrización, aunque no tiene efectos en desarrollo y homeostasis fisiológica de la vasculatura, se cree que debido a la alta redundancia de la señalización de FGF (Yang *et al*, 2015).

VEGF y FGF actúan sinérgica y coordinadamente para promover la neovascularización, ya que FGF₂ induce la expresión de VEGF y sus receptores en células endoteliales y, por el contrario, VEGF induce la expresión de FGF₂. Además, FGF₂ requiere de la presencia de VEGFR₁ para promover la organización de las células endoteliales (Saylor *et al*, 2012). También se ha observado un aumento de la expresión de FGF tras la inhibición de VEGF en tumores, quizá como mecanismo de compensación y evasión tumoral, por lo que se ha propuesto como agente fundamental en el desarrollo de resistencia a los fármacos que antagonizan VEGF en el tratamiento antitumoral (Lieu *et al*, 2011; De Smet *et al*, 2014).

2.4.2. Degradación y síntesis de la MEC

Para el crecimiento del *sprout*, es necesaria la degradación local de la membrana basal del vaso preexistente y de la MEC circundante. Esta degradación viene mediada por metaloproteasas (MMP), liberadas principalmente por la célula *tip*, y no sólo permite el avance del *sprouting*, sino que conlleva la liberación de factores solubles retenidos entre las proteínas de la matriz, que también contribuirán a modular la neovascularización (Eilken & Adams, 2010).

Como ya hemos indicado, VEGF y FGF son capaces de unirse al heparán-sulfato de los proteoglicanos de la matriz. TGF- β y BMP9, ligandos de endogлина implicados en angiogénesis, también son almacenados anclados a la MEC. La forma latente de TGF- β (del inglés, *Transforming Growth Factor* β) producida por las células, es dirigida y retenida por la MEC, que actúa como reservorio de la citoquina, donde ésta es activada por corte proteolítico.

Concretamente, TGF- β interactúa con las proteínas de matriz fibrilinas (Isogai *et al*, 2003). Se sabe que las BMP (del inglés, *Bone Morphogenetic Proteins*), también miembros de la superfamilia de TGF- β , son capaces de interactuar con el colágeno (Hynes, 2009).

A su vez, los componentes de la MEC interactúan con las células endoteliales y son capaces de modular la respuesta angiogénica. Tanto fibronectina, como laminina y diferentes isotipos de colágeno se unen a integrinas de la membrana de la célula endotelial y activan cascadas de señales intracelulares. La proteína laminina, componente esencial de la membrana basal, participa en la inducción de la señalización a través de Notch / Dll4, impidiendo una excesiva diferenciación de las células endoteliales a células *tip* (Bishop, 2015). Por tanto, las moléculas presentes en la MEC tienen un claro potencial angiogénico y modulan este proceso. Pero cuando estas moléculas son degradadas por acción de las MMP, y también del sistema activador del plasminógeno / plasmina, se liberan fragmentos proteicos que inhiben la angiogénesis. Estos fragmentos son péptidos que proceden de la proteólisis de colágeno IV, colágeno XVIII y perlecano, principalmente (Nave *et al*, 2014; Bishop, 2015). Además, las células *stalk* y los pericitos, al contrario que las *tip*, liberan inhibidores de proteasas, TIMP (del inglés, *Tissue Inhibitors of MetalloProteinases*), evitando la degradación de la MEC en su entorno (Bishop, 2015).

A medida que el nuevo vaso se forma, se sintetiza una nueva membrana basal alrededor del tubo de células endoteliales. Esta MEC está compuesta de lamininas, colágeno tipo IV, entactina, nidógeno y proteoglicanos heparán-sulfato (colágeno tipo XVIII, agrina y perlecano) (Kalluri, 2003; Nave *et al*, 2014), y da estabilidad al nuevo vaso y modula su funcionalidad.

2.5. Resolución de la angiogénesis: anastomosis y tubulogénesis

La formación de *sprouts* hacia el estímulo angiogénico no termina siempre en la formación de un nuevo vaso. Muchos de ellos sufren una regresión o degeneran, al no encontrar otro *sprout* con el que fusionarse y establecer un vaso funcional capaz de asumir la circulación sanguínea. Cuando dos *sprouts* que provienen de zonas diferentes se encuentran en el foco hipóxico, sus células *tip* llevan a cabo la anastomosis o fusión de los *sprouts* (Figura 7A). Las células *tip* contactan entre ellas a través de sus filopodios y fusionan sus membranas apicales formando un pequeño lumen que posteriormente se fusionará con el lumen formado en el tubo de células *stalk* que constituye el nuevo capilar (Siekman *et al*, 2013).

Los mecanismos que regulan este proceso son bastante desconocidos a día de hoy, y lo poco que se sabe se ha estudiado en organismos como el pez cebra, donde la angiogénesis es

regulada de modo similar a la que tiene lugar en organismos superiores, pero se desconoce cómo funciona exactamente en mamíferos. Se cree que en su regulación participan VEGF y Notch (Song *et al*, 2012; Siekmann *et al*, 2013).

A la vez que tiene lugar el crecimiento del *sprout*, se va formando la luz del futuro vaso. La morfogénesis del nuevo vaso ha de respetar en todo momento la estructura del tubo formado y permitir el flujo de sangre. Se cree que este proceso tiene lugar mediante la formación de vesículas de pinocitosis en las células *stalk*, que se fusionan formando vacuolas, que a su vez se fusionan con la membrana plasmática y forman la luz del vaso (Figura 7B). Estas vacuolas son visibles en las células endoteliales durante todo el *sprouting*. Este proceso ha sido poco estudiado, y se cree que en organismos superiores puede haber otros procesos implicados además de la vacuolización (Davis *et al*, 2002; Davis & Bayless, 2003; Kamei *et al*, 2006; Chappell *et al*, 2011).

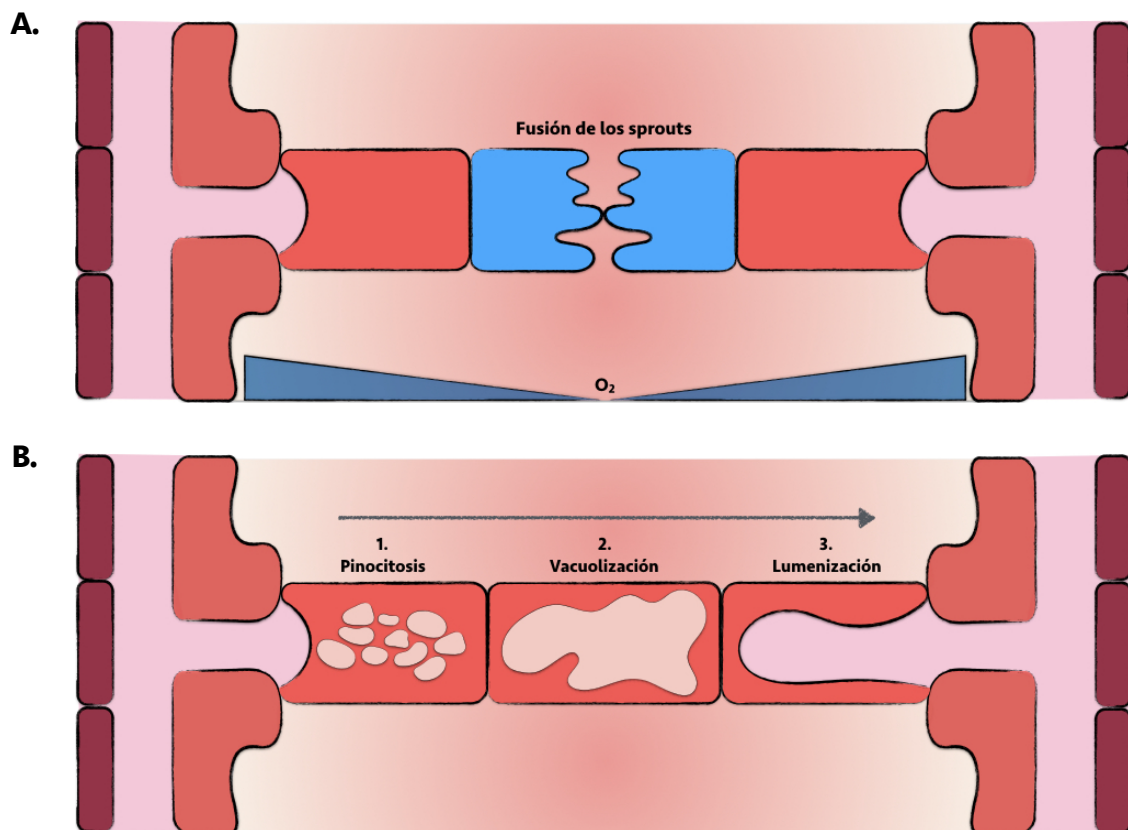


Figura 7. Anastomosis y tubulogénesis

A. Esquema del proceso de anastomosis, en el que las células *tip* se encuentran, sus filopodios contactan y las membranas celulares se fusionan. Adaptado de Siekmann *et al*, 2013. B. Esquema del proceso de tubulogénesis mediante pinocitosis y vacuolización. Adaptado de Kamei *et al*, 2006.

2.6. Participación de células precursoras endoteliales en la angiogénesis

Las células progenitoras endoteliales (EPC, del inglés, *Endothelial Progenitor Cells*) son células circulantes pluripotentes derivadas del hemangioblasto, del que también derivan los linajes de células sanguíneas linfoides y mieloides. Durante mucho tiempo se creyó que las EPC participaban solamente en los procesos de vasculogénesis durante el desarrollo embrionario. Pero hoy en día sabemos que también están involucradas en la vascularización en el adulto (Asahara *et al*, 1999; Li *et al*, 2006; Marcola & Rodrigues, 2015). Una pequeña población dentro de las células mononucleadas de la sangre ha sido identificada como precursores endoteliales tardíos, ECFC (del inglés, *Endothelial Colonies Forming Cells*), y han sido utilizadas *in vitro* para el estudio de su potencial angiogénico (Yoon *et al*, 2005; Fuchs *et al*, 2006; Medina *et al*, 2010; Martin-Ramirez *et al*, 2012). Además, también hay EPC residentes en los vasos, entre las capas de endotelio y cobertura mural de la pared vascular (Zengin *et al*, 2006; Adams & Alitalo, 2007).

Las EPC pueden participar en el *sprouting* de forma directa, incorporándose a la nueva yema vascular en formación, lo que también se conoce como “vasculogénesis postnatal o del adulto”. Además, también pueden ser extravasadas y estimular el crecimiento del *sprout* mediante la producción de citoquinas proangiogénicas (Adams & Alitalo, 2007; Zhang & Xu, 2014). Los niveles de EPC aumentan en circulación tras un daño vascular y en diversas patologías que cursan con una regeneración de la vasculatura, y su participación en la neovascularización se ha demostrado esencial en la recuperación tras el daño isquémico y el ictus (Gill *et al*, 2001; Yamaguchi *et al*, 2003; Lopez-Holgado *et al*, 2009; Jourde-Chiche *et al*, 2009; Foresta *et al*, 2011; Paczkowska *et al*, 2014; Ma *et al*, 2015).

2.7. Maduración del vaso: recubrimiento mural

La cobertura mural del nuevo vaso no sólo estabiliza el endotelio, sino que permite una regulación del flujo sanguíneo, lo que determina el éxito del vaso de nueva formación evitando su regresión, así como el papel que desempeñará y su identidad.

La adhesión y envoltura de pericitos alrededor del endotelio de capilares maduros son clave en su estabilización y maduración. Son las propias células endoteliales quienes dirigen la diferenciación de precursores de células murales y su quimiotaxis desde el tejido adyacente. Así, el endotelio produce gradientes de la citoquina PDGF-B, potente quimioatrayente de pericitos, que expresan su receptor PDGFR β (Hirschi *et al*, 1998). TGF- β también es una citoquina involucrada en la diferenciación de las células murales, el arresto del ciclo celular y la producción de MEC durante la maduración (Gaengel *et al*, 2009). A su vez, los pericitos liberan el factor

estabilizador endotelial angiopoietina 1 (Angpt-1) y otras citoquinas, que regulan la proliferación, migración y supervivencia de las células endoteliales. Además, colaboran con el endotelio en el mantenimiento de la membrana basal (Darland *et al*, 2003; Logsdon *et al*, 2014). Este proceso tiene lugar de forma simultánea al proceso de *sprouting*. La posterior adquisición de una mayor cobertura con CMLV, en el caso de arteriolas, vénulas y grandes vasos, permitirá a los vasos regular flujos de sangre elevados.

Ratones deficientes para genes clave en este proceso, como son los que codifican para Angpt-1, su receptor Tie-2, PDGF-B o PDGFR β , presentan bien defectos en la formación del plexo vascular primario, o bien un fenotipo hemorrágico caracterizado por un reducido número de células murales. En ciertas patologías vasculares, como la retinopatía diabética, se ha descrito tanto la muerte de pericitos como alteraciones en la membrana basal de los vasos (Ribatti *et al*, 2011). Además, una correcta cobertura mural es de vital importancia en la revascularización y recuperación del tejido tras ciertos daños como la isquemia (Chen *et al*, 2013).

3. La superfamilia de TGF- β en la angiogénesis

3.1. El Factor de Crecimiento Transformante β

La superfamilia del Factor de Crecimiento Transformante β o TGF- β , comprende no sólo los TGF- β , sino también las BMP o las activinas, entre otras citoquinas. Controlan el desarrollo y la homeostasis del organismo, y están implicados en la regulación de la proliferación, diferenciación y apoptosis celular, procesos involucrados en la reparación tisular, en la angiogénesis y en la respuesta inmune, entre otros (Massague, 1998).

En mamíferos existen tres isoformas de TGF- β , TGF- β 1, 2 y 3, siendo TGF- β 1 la más abundante y a la que nos referiremos en general. TGF- β 1 está implicado en numerosos procesos celulares y puede tener efectos biológicos muy variados dependiendo del contexto celular. Así, regula la proliferación celular, la apoptosis y procesos de desarrollo, diferenciación celular y migración. También puede inducir la síntesis de proteínas de la MEC, estimular la producción de inhibidores de proteasas previniendo la rotura enzimática de la MEC y modular la respuesta inmune (Shi & Massague, 2003; ten Dijke & Arthur, 2007).

La subfamilia de las BMP se encuentra a su vez dividida en varios subgrupos, entre los que cabe destacar los de BMP2/4, BMP5/6/7 y BMP9/10. Se trata de un grupo de factores reguladores de procesos como la proliferación celular, la diferenciación y la apoptosis en

diferentes tejidos. Estos factores tienen un importante papel en la vasculogénesis y la angiogénesis (Cai *et al*, 2012; Bai *et al*, 2014).

3.2. El complejo de receptores de TGF- β

Las citoquinas de la superfamilia de TGF- β transmiten sus señales al interior de la célula a través de receptores de membrana de tipo serina-treonina-kinasa, homo o heterodiméricos, que constituyen el complejo de receptores de TGF- β . Atendiendo a sus propiedades estructurales y funcionales, los receptores se han dividido en dos subfamilias, denominadas receptores de tipo I y de tipo II (Derynck & Zhang, 2003; Miyazawa *et al*, 2002). Además de la actividad serina-treonina-kinasa, los receptores de TGF- β tienen actividad tirosina-kinasa (Lawler *et al*, 1997).

Los receptores de tipo I también se llaman ALK (del inglés, *Activin receptor-Like Kinase*). En la mayoría de tipos celulares, TGF- β señala a través del receptor ALK5, si bien ALK1 es el receptor mayoritario en células endoteliales, en las que TGF- β señala tanto a través de ALK1 como de ALK5 (Goumans *et al*, 2003a). Además, algunos autores han involucrado a la señalización de TGF- β a través de ALK2 en el desarrollo cardíaco (Olivey *et al*, 2006). El reclutamiento de ALK1 al complejo de receptores es mediado por ALK5 (Goumans *et al*, 2003b), por lo que la señalización a través de ALK1 tendría lugar a través de heterodímeros ALK1 / ALK5. BMP9 señala en el endotelio preferentemente a través de ALK1 (David *et al*, 2007). El receptor de tipo II específico de TGF- β es T β RRII, mientras que para BMP9, es BMPRII o BMPRII, aunque también puede unirse a ActRII o a heterodímeros BMPRII/ActRII (Derynck & Feng, 1997; Upton *et al*, 2009; Cai *et al*, 2012).

Los receptores T β RRII y BMPRII se encuentran siempre formando dímeros aun en ausencia de sus ligandos. Los receptores de tipo II diméricos se autofosforilan en varios residuos de serina y tirosina (Derynck & Feng, 1997). En el caso de TGF- β , sólo los receptores de tipo II son capaces de unir el ligando *per se*, tras lo cual reclutan al receptor de tipo I. Las BMP se pueden unir tanto a receptores de tipo II como de tipo I, por los que presentan más o menos afinidad dependiendo de la citoquina de que se trate (David *et al*, 2009). Los receptores de tipo II fosforilan a los receptores ALK en un dominio yuxtamembrana altamente conservado, denominado “dominio GS”. Esta fosforilación activa el dominio kinasa de los receptores de tipo I, mediador de la transducción de la señal del ligando al interior celular (Huang & Chen, 2012).

Existe un tercer tipo de receptores que forman parte del complejo de receptores de TGF- β , denominados genéricamente receptores de tipo III. Son betaglicano y endogлина, proteína en la que se centra este trabajo de tesis. Se tratan igualmente de glicoproteínas de membrana dimericas, que se pueden unir al complejo de receptores tras la unión del ligando. Los receptores de tipo III carecen de actividad enzimática, por lo que no son capaces de transducir ninguna señal al citoplasma, pero sí de modular la señal que el ligando transmita a través del complejo de receptores; por ello son considerados receptores auxiliares (Gougos & Letarte, 1990). Endogлина puede ser fosforilada en varios residuos tanto por T β RII como por ALK1 y ALK5, y de ello depende su función en la modulación de la señal de TGF- β (Guerrero-Esteo *et al*, 2002; Koleva *et al*, 2006). Detallaremos la estructura y los sitios de fosforilación de endogлина más adelante.

La deficiente función de alguno de los receptores de la superfamilia de TGF- β lleva al desarrollo de importantes alteraciones vasculares. Mutaciones en los genes de ALK1 y endogлина en humanos (*ALK1* y *ENG*) son las causantes de las enfermedades vasculares HHT1 y HHT2, respectivamente (del inglés, *Haemorrhagic Hereditary Telangiectasia type 1 or 2*), caracterizadas por anomalías vasculares como malformaciones arteriovenosas, edema pulmonar y hepático, y problemas cerebrovasculares (Sabbà *et al*, 2006). Ratones *knock-out* para los genes de *Alk1*, endogлина y T β RII mueren durante el desarrollo embrionario debido a alteraciones en la vascularización del saco vitelino y otros problemas del crecimiento (Oshima *et al*, 1996; Bourdeau *et al*, 1999; Oh *et al*, 2000). Los ratones heterocigotos para *Alk1* o para endogлина son haploinsuficientes, ya que expresan niveles de estos receptores aproximadamente del 50% a nivel proteico, respectivamente (Jerkic *et al*, 2006b, 2006a; Ardelean *et al*, 2014a; González-Núñez *et al*, 2015). Estos ratones desarrollan malformaciones arteriovenosas y otros defectos vasculares que recuerdan a aquellos presentes en la HHT (Bourdeau *et al*, 1999, 2000; Srinivasan *et al*, 2003). La eliminación postnatal de uno o los dos alelos de los genes de *Alk1*, endogлина o T β RII, conlleva el desarrollo de alteraciones en la vasculatura y/o deficiencias en la angiogénesis (Mahmoud *et al*, 2010; Allinson *et al*, 2012; Anderberg *et al*, 2013; Tual-Chalot *et al*, 2014).

3.3. Señalización intracelular de TGF- β y BMP9 en las células endoteliales

La activación del complejo de receptores de TGF- β por unión del ligando induce la cascada de señalización de las proteínas Smad (del inglés, *Small protein Mothers Against*

Decapentaplegic) que, una vez activadas forman un complejo que viaja al núcleo, donde actúa como factor de transcripción.

Las proteínas R-Smad (del inglés, *Receptor-regulated*) se clasifican en dos grupos, en función del receptor de tipo I que las activa; así, ALK1 activa a Smad 1, 5 y 8, mientras que ALK5 fosforila a Smad 2 y 3. La fosforilación de las proteínas R-Smad permite su oligomerización con Smad4 o Co-Smad (del inglés, *Common partner*), que no se une al complejo de receptores ni es activada por fosforilación, pero colabora con las isoformas R-Smad en su función reguladora de la transcripción. Existe un tercer tipo de proteínas Smad o I-Smad (del inglés, *Inhibitor*), que son Smad 6 y 7. Las proteínas I-Smad compiten con R-Smad por su unión a los receptores o a Smad4, y tienen por tanto una función inhibidora de la señalización a través de las R-Smad (Mahmoud *et al*, 2011).

La teoría más aceptada acerca de la señalización de TGF- β 1 en el endotelio defiende que esta citoquina puede ejercer efectos diversos en función de sus niveles y del contexto celular. Así, bajos niveles de TGF- β 1 activan a los receptores ALK1 / ALK5 / T β RRI, que señalizan a través de la vía de Smad1/5/8, relacionada con la transcripción de genes con promotores con secuencia rica en GC. Esta activación tiene un efecto proangiogénico, promoviendo la degradación de la matriz, así como la proliferación y migración de las células endoteliales. En cambio, niveles elevados de TGF- β 1 activan la señalización a través de ALK5 / T β RRII y la vía de Smad2/3, promoviendo la transcripción de genes con secuencia CAGA en su promotor, con funciones antiangiogénicas como la producción de membrana basal y la maduración y estabilización del nuevo vaso (Goumans *et al*, 2002; Miyazawa *et al*, 2002; Lebrin *et al*, 2005; Holderfield & Hughes, 2008; Pardali *et al*, 2010). La señalización a través de ALK1 / Smad1/5/8 tiene como gen reportero Id1 (del inglés, *Inhibitor of DNA binding 1*) que promueve la proliferación y la migración endotelial, e inhibe la producción de MEC. Por su parte, la activación de la vía de ALK5 / Smad2/3 induce la expresión de PAI-1 (del inglés, *Plasminogen Activator Inhibitor 1*) y PDGF-B, e inhibe la proliferación y migración celular además de promover la producción de MEC. Además, la activación de Smad1/5/8 regula negativamente la expresión de PAI-1 (Oh *et al*, 2000; Goumans *et al*, 2002, 2003a; Lebrin *et al*, 2005; Goumans *et al*, 2009; Pardali *et al*, 2010; Mahmoud *et al*, 2011) (Figura 12). Aunque está ampliamente aceptada, algunas investigaciones han puesto esta teoría en cuestión. Por ejemplo, se ha documentado un bloqueo de la migración de células endoteliales mediado por la señalización a través de Smad1/5/8, al igual que la inhibición de la diferenciación a célula *tip* por acción de BMP9 a través de Smad1/5/8 (Tian *et al*, 2012; Larrivee *et al*, 2012).

Así, en la literatura se pueden encontrar efectos sobre la angiogénesis muy variados al tratamiento con TGF- β . Los ratones *knock-out* para cualquiera de las tres isoformas de TGF- β

mueren durante el desarrollo embrionario por defectos en el desarrollo de la vasculatura (Pardali *et al*, 2010). TGF- β 1 induce la angiogénesis en varios modelos experimentales, tanto *in vivo* como *in vitro* (Ma *et al*, 2007; Evrard *et al*, 2012; Peshavariya *et al*, 2014). La inhibición de la señalización de TGF- β reduce la perfusión en la retina y altera la función de la barrera endotelial (Walshe *et al*, 2009). En los tumores, las células del microambiente tumoral liberan TGF- β y estimulan así la angiogénesis que permite el crecimiento del tumor, por lo que la neutralización de esta citoquina o el bloqueo de su señalización se han propuesto como estrategias para la terapia contra el cáncer (Saunier & Akhurst, 2006). Pero también son muchos los trabajos en los que se propone un papel antiangiogénico para TGF- β (Riedel *et al*, 2007; Geng *et al*, 2013). Como ya hemos comentado, el principal argumento para explicar estas diferencias se basa en las diferentes condiciones experimentales en cuanto a las concentraciones del ligando y los tipos celulares.

Además de los TGF- β , las BMP son los otros miembros de la superfamilia que participan activamente en la angiogénesis. BMP2, 4, 6 y 7 inducen la liberación de VEGF, estimulan a las células endoteliales *in vitro* y también modulan la incorporación de CMLV durante la fase de maduración de la angiogénesis (Finkenzeller *et al*, 2012; Bai *et al*, 2014). Una de las BMP más estudiadas en angiogénesis es BMP9, si bien los resultados referentes a esta relación son contradictorios. Estudios iniciales propusieron un papel antiangiogénico para BMP9, pero posteriormente ha sido aceptado que este efecto se debe al tratamiento con dosis altas, mientras que dosis bajas de BMP9 han mostrado propiedades proangiogénicas (David *et al*, 2007; Scharpfenecker *et al*, 2007; David *et al*, 2008; Suzuki *et al*, 2010; van Meeteren *et al*, 2012).

Se considera que BMP9 señala en la célula endotelial a través de la vía de ALK1 y las Smads 1, 5 y 8 (David *et al*, 2007; Cai *et al*, 2012) de forma dependiente de endoglin (Nolan-Stevaux *et al*, 2012), si bien se ha descrito que BMP9 puede activar la vía de Smad2/3, aunque de manera dependiente de ALK1 (Upton *et al*, 2009).

La dualidad observada tanto para TGF- β como para BMP9 en angiogénesis ha sido revisada recientemente por Jonker (Jonker, 2014).

Además de la vía canónica de señalización, se sabe que TGF- β puede activar otras vías como son las de las MAPK (del inglés, *Mitogen Activated Protein Kinases*) como ERK (del inglés, *Extracellular-signal-Regulated Kinase*), JNK (del inglés, *Jun N-terminal Kinase*) o p38 MAPK, así como la de PI3K (del inglés, *PhosphoInositide-3-Kinase*) / Akt (Derynck & Zhang, 2003; Moustakas & Heldin, 2005; Zhang, 2009). Todas estas rutas quizá sean las vías de señalización de TGF- β no mediadas por Smad mejor caracterizadas. Además de los efectos transcripcionales directos de la activación de estas vías, se sabe que su activación modula la señalización de las

proteínas Smad (Zhang, 2009). Esta señalización también es relevante en el estudio de la angiogénesis. La activación de las MAPK se ha relacionado con una mayor supervivencia celular, migración y capacidad de formar redes de células endoteliales, así como con la permeabilidad vascular (Goldberg *et al*, 2002; Birukova *et al*, 2005; Park *et al*, 2013). Por otro lado, la señalización a través de Akt en células endoteliales media la formación de estructuras similares a capilares *in vitro* y las protege frente a la apoptosis (Lee *et al*, 2012).

Finalmente, además del papel directo de estas citoquinas en angiogénesis, cabe señalar la evidencia de una relación entre la señalización de TGF- β / BMP y la de VEGF, que muestran efectos sinérgicos o antagónicos en función de la citoquina en estudio, su concentración y el modelo utilizado (Holderfield & Hughes, 2008). Se ha descrito un efecto proangiogénico sinérgico de VEGF y BMP2 *in vitro* (Bai *et al*, 2014), así como un efecto similar al combinar VEGF con inhibidores de la señalización de TGF- β (Liu *et al*, 2009). Además, el tratamiento con TGF- β 1 induce el *splicing* alternativo del ARNm de VEGF para dar lugar a una isoforma antiangiogénica (Nowak *et al*, 2008).

4. Endogлина (CD105)

4.1. Expresión y distribución celular

Endogлина es una proteína vascular que fue identificada a mediados de los años 80 del pasado siglo como un antígeno de membrana de las células endoteliales, al teñir diversos tejidos con el anticuerpo monoclonal 44G4 generado contra la línea celular pre-leucémica HOON y comprobar que éste era muy reactivo en el endotelio vascular; asimismo, el anticuerpo 44G4 reconocía un componente de la membrana de células endoteliales aisladas de la vena del cordón umbilical (HUVEC, del inglés, *Human Umbilical Vein Endothelial Cells*). Este antígeno fue identificado como una glicoproteína homodimérica (Gougos & Letarte, 1988a, 1988b). El ADNc de endogлина fue aislado y secuenciado en 1990, y de él se dedujo que endogлина es una proteína integral de membrana de tipo I que consta de 658 aminoácidos (Gougos & Letarte, 1990). En 1993, en el “5th International Workshop on Human Leucocyte Differentiation Antigens (HLDA)” en Boston, se le asignó el grupo de diferenciación CD105 (CD, del inglés, *Cluster of Differentiation*), ya que aumenta su expresión en la diferenciación de monocito a macrófago (O’Connell *et al*, 1992). El gen de endogлина (*ENG*) está localizado en el cromosoma 9q34 de las células humanas (Fernandez-Ruiz *et al*, 1993), mientras que en ratones (*Eng*) se encuentra en el cromosoma 2 (Qureshi *et al*, 1995).

Endoglina se expresa predominantemente en el endotelio, donde su promotor muestra una elevada actividad y la proteína se expresa en altos niveles comparado con otros tipos celulares. Además, endoglina parece ser un mejor marcador de células endoteliales que otros anteriormente propuestos como VEGFR2, ciertas moléculas de adhesión (ICAM, PECAM o VCAM) o el factor de coagulación vonWillebrand (vWF) (Gougos & Letarte, 1988b; Graulich *et al*, 1999). De hecho, endoglina se expresa fundamentalmente en células endoteliales tanto de arterias como, especialmente, de venas y capilares (Mahmoud *et al*, 2009), y tanto en adultos como en la vasculatura embrionaria (Arthur *et al*, 2000). Por todo ello, es considerada como uno de los principales marcadores endoteliales. Además de en el endotelio, endoglina se expresa en menores niveles en CMLV y pericitos (Conley *et al*, 2000; Rivera & Brekken, 2011). También se ha descrito la expresión de endoglina en células de origen hematopoyético, como precursores de células B (Zhang *et al*, 1996), proeritroblastos (Buhning *et al*, 1991), macrófagos (Lastres *et al*, 1992; O'Connell *et al*, 1992), y células estromales de la médula ósea (St-Jacques *et al*, 1994a; Rokhlin *et al*, 1995), así como en los sincitiotrofoblastos de la placenta durante el embarazo (Gougos *et al*, 1992; St-Jacques *et al*, 1994b), en fibroblastos (Gougos and Letarte, 1988), condrocitos del cartílago (Parker *et al*, 2003), células mesangiales de riñón (Rodríguez-Barbero *et al*, 2001; Díez-Marques *et al*, 2002) y en las células estrelladas del hígado (Meurer *et al*, 2005).

Endoglina puede localizarse en caveolas (Toporsian *et al*, 2005). Se ha comprobado que caveolina-1 (Cav-1), la proteína mayoritaria de las caveolas, colocaliza con endoglina, e interacciona y coopera con la señalización de TGF- β en células endoteliales (Toporsian *et al*, 2005; Santibanez *et al*, 2008).

4.2. Estructura

Endoglina es una glicoproteína de membrana homodimérica, de 180 kDa, formada por dos subunidades de 90 kDa cada una, unidas por dos puentes disulfuro (Figura 8). Su dominio extracelular se encuentra altamente glicosilado por oligosacáridos unidos a las cadenas peptídicas mediante enlaces N-Asn y O-Ser/Thr, que suponen aproximadamente el 20% del total del peso de la proteína. De los 658 aminoácidos que tiene endoglina, 561 corresponden a su dominio extracelular y 47 a la cola citoplasmática (Gougos & Letarte, 1990; Llorca *et al*, 2007). Existe una segunda isoforma de endoglina, S-endoglina, minoritaria y más corta, que consta de 625 aminoácidos, puesto que carece de gran parte del dominio intracelular (Bellon *et al*, 1993).

4.2.1. El dominio extracelular de endogлина

El dominio extracelular consta de dos regiones diferenciadas: un dominio huérfano N-terminal, sin homología con ninguna otra proteína conocida (salvo con betaglicano), y el dominio ZP (zona pelúcida), muy conservado entre las diferentes especies. Los primeros 25 aminoácidos corresponden al péptido señal o secuencia líder, que dirige endogлина a la membrana citoplasmática, donde este fragmento es eliminado (Gougos & Letarte, 1990). El dominio huérfano es portador de la secuencia de unión de TGF- β y BMP9, en su papel de receptor auxiliar de estos receptores (López-Casillas *et al*, 1994; Llorca *et al*, 2007; Castonguay *et al*, 2011; Alt *et al*, 2012). El dominio ZP consta de 260 aminoácidos con, al menos, ocho residuos de cisteína conservados, y está implicado en las interacciones proteína-proteína (Jovine *et al*, 2005). Participa en la oligomerización de endogлина y en su interacción con los receptores T β RII y ALK5 (Guerrero-Esteo *et al*, 2002). Además, consta del tripéptido RGD (arginina-glicina-aspartato), comprendido entre los aminoácidos 374 y 376, implicado en adhesión celular (Gougos & Letarte, 1990; Cheifetz *et al*, 1992; Llorca *et al*, 2007). Este péptido se encuentra fundamentalmente en proteínas de la MEC, como fibronectina, vitronectina, colágeno tipo I y fibrinógeno, y es reconocido por integrinas de la superficie celular (Ruoslahti & Pierschbacher, 1987). Poco se sabe acerca de las proteínas que pueden interaccionar con el dominio RGD de endogлина, pero recientemente se han publicado dos trabajos en los que se demuestra cómo endogлина favorece la transmigración leucocitaria a través de la barrera endotelial gracias a su unión a las integrinas de los leucocitos a través de este tripéptido RGD (Rossi *et al*, 2013a) y, lo que es más interesante para este trabajo, cómo esta unión favorece la adhesión de pericitos a células endoteliales gracias a la interacción de integrinas de pericitos con endogлина del endotelio (Rossi *et al*, 2015) (Figura 8).

4.2.2. El dominio intracelular de endogлина

Tras el dominio extracelular, endogлина posee una única región transmembrana y un corto dominio citoplasmático, que consta de 47 aminoácidos y se encuentra constitutivamente fosforilado en las células endoteliales (Lastres *et al*, 1994; Yamashita *et al*, 1994). En esta cola citosólica endogлина presenta numerosos residuos serina, treonina y tirosina susceptibles de ser fosforilados (Lastres *et al*, 1994; Koleva *et al*, 2006; Pan *et al*, 2014). Los tres últimos residuos C-terminales constituyen una secuencia de unión a motivos PDZ tipo I de otras proteínas (Guerrero-Esteo *et al*, 2002).

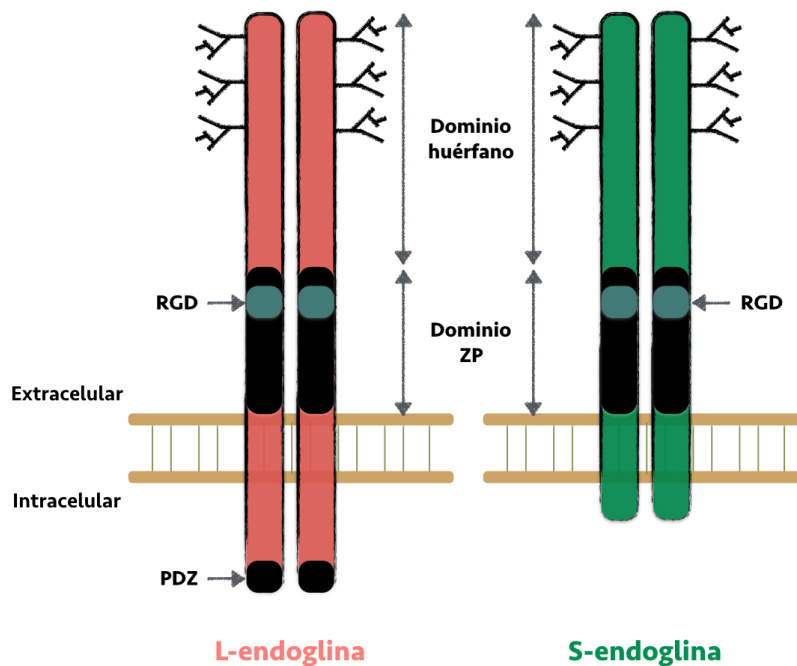


Figura 8. Estructura molecular del dímero de endogлина

Estructura proteica de L-endogлина, forma mayoritaria de la proteína, y de S-endogлина. Adaptado de Bellon *et al.*, 2003 y ten Dijke *et al.*, 2008.

En el dominio intracelular de endogлина se localizan una serie de residuos clave en la fosforilación de la proteína. T β RRII fosforila endogлина en los residuos Ser⁶³⁴ y Ser⁶³⁵. El receptor de tipo I ALK1 no fosforila serinas, sino que fosforila endogлина en Thr⁶⁴⁰ y Thr⁶⁵⁴. Para que ALK1 pueda fosforilar endogлина en estos dos residuos, requiere que las serinas Ser⁶³⁴ y Ser⁶³⁵ hayan sido previamente fosforiladas por T β RRII. ALK5, por su parte, fosforila endogлина en los residuos Ser⁶⁴⁶ y Ser⁶⁴⁹. La falta de fosforilación de estas dos serinas por ALK5 también inhibe la fosforilación de endogлина por ALK1. (Lastres *et al.*, 1994; Koleva *et al.*, 2006; Ray *et al.*, 2010a). Además de los miembros del complejo de receptores de TGF- β , otras proteínas con actividad kinasa pueden fosforilar endogлина en su dominio intracelular. Se sabe que el residuo Ser⁶²¹ es fosforilable por proteína kinasa C (PKC) y las tirosinas Tyr⁶¹² y Tyr⁶¹⁴ por la kinasa Src (nombre derivado de “sarcoma”). Endogлина se encuentra constitutivamente fosforilada, al menos por T β RRII y PKC (Lastres *et al.*, 1994; Pan *et al.*, 2014) (Figura 9).

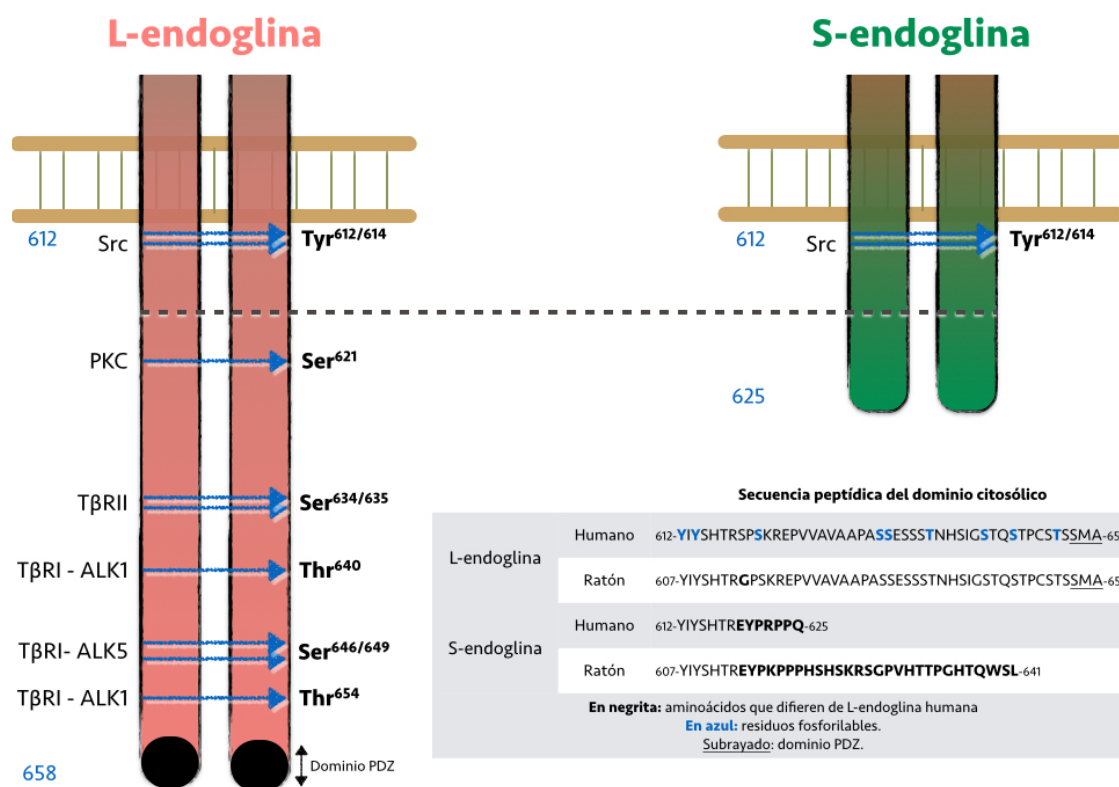


Figura 9. Dominio intracelular de las isoformas de endogлина de membrana

Estructura proteica del dominio intracelular de L-endogлина y S-endogлина humanas, y sitios de fosforilación. Secuencia de aminoácidos de las isoformas larga y corta de endogлина, de humano y de ratón. Adaptado de Pérez-Gómez *et al*, 2005, Koleva *et al*, 2006 y Pan *et al*, 2014.

La región PDZ parece ser importante en la regulación de la fosforilación de endogлина: la eliminación de este tripéptido favorece la fosforilación en serinas por TβRII, probablemente porque la unión de proteínas con dominio de unión a PDZ suponga impedimentos estéricos y su ausencia favorezca la interacción de TβRII con endogлина y, así, su fosforilación (Koleva *et al*, 2006).

En el dominio intracelular de endogлина, además, se encuentran regiones clave implicadas en la unión y andamiaje de proteínas intracelulares, como zyxina, ZRP-1 (del inglés, *Zyxin Related Protein 1*), β-arrestina o GIPC. Estas interacciones modulan procesos celulares involucrados en angiogénesis, como la división o la migración celular (Conley *et al*, 2004; Sanz-Rodríguez *et al*, 2004; Lee & Blobel, 2007; Lee *et al*, 2012).

4.2.3. Isoformas de endogлина

El gen de endogлина consta de 15 exones, y el ARNm resultante de su transcripción puede sufrir *splicing* alternativo, dando lugar a dos isoformas diferentes de la proteína.

La isoforma predominante es L-endogлина o endogлина larga, a la que corresponde la estructura proteica anteriormente descrita. Pero si durante la transcripción génica no se elimina el último intrón, localizado entre los exones 13 y 14, el ARNm maduro resultante da lugar a la traducción de una proteína más corta, S-endogлина (S, del inglés, *small* o *short*), que carece de gran parte del dominio intracelular. Esto es así porque este intrón introduce un codón de parada prematuro (Bellon *et al*, 1993; Perez-Gomez *et al*, 2005) (Figura 10). El factor de *splicing* serina-arginina 1 (SRSF1, del inglés, *Serine-Arginine Splicing Factor 1*; o ASF1, del inglés, *Alternative Splicing Factor 1*; o *Pre-mRNA Splicing Factor 2*) es el responsable de este *splicing* alternativo que da lugar a la expresión de la isoforma S-endogлина. SRSF1 también está implicado en la selección del lugar de *splicing* en la generación de las formas proangiogénicas de VEGF, proceso que se ve inhibido por TGF- β (Nowak *et al*, 2008; Blanco & Bernabeu, 2012). El *splicing* alternativo del ARNm de endogлина tiene lugar en el citoplasma e involucra al espliceosoma menor (Blanco & Bernabeu, 2011).

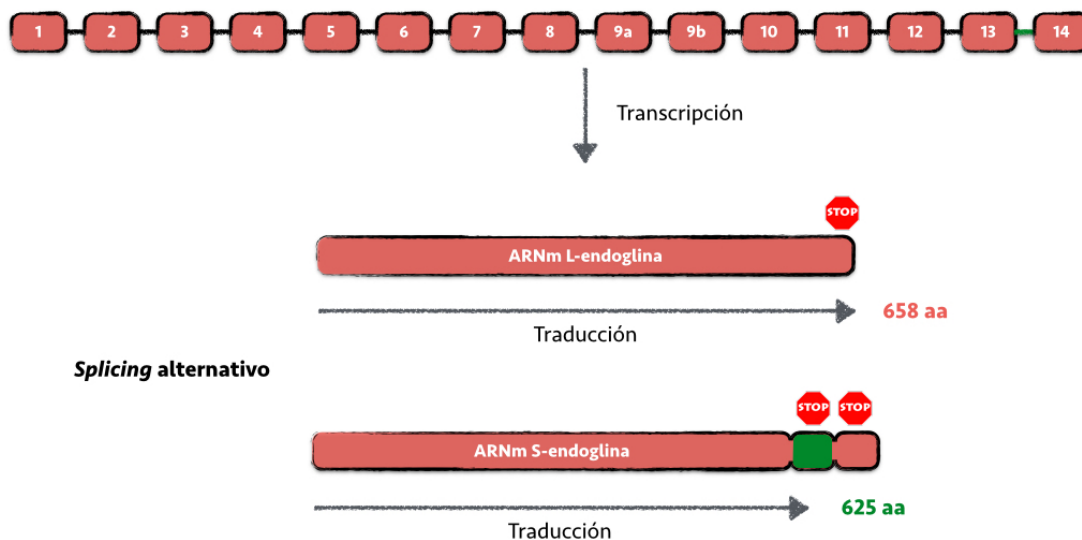


Figura 10. Procesamiento alternativo del ARNm de endogлина

Esquema del mecanismo de procesamiento postranscripcional del ARNm de endogлина, que da lugar a las dos isoformas de endogлина, L- y S-endogлина. Adaptado de Bellón *et al*, 1993.

S-endoglina humana consta de 625 aminoácidos, con una cola citoplasmática 33 aminoácidos más corta que L-endoglina. De los 14 aminoácidos que conserva S-endoglina, sólo 7 son comunes a la isoforma larga (del 612 al 618), puesto que los 7 aminoácidos terminales corresponden a la región del intrón que se traduce, hasta el codón de paro (del 619 al 625). Este dominio intracelular, por tanto, carece del tripéptido PDZ, así como de sitios clave de fosforilación como son la Ser⁶²¹ y todos los residuos fosforilables por miembros del complejo de receptores de TGF- β (Ser⁶³⁴, Ser⁶³⁵, Thr⁶⁴⁰, Thr⁶⁵⁴, Ser⁶⁴⁶ y Ser⁶⁴⁹), pero conserva los sitios de fosforilación por Src (Figura 9).

La secuencia del intrón que se retiene en la isoforma corta de endoglina, así como las regiones flanqueantes, están altamente conservadas entre especies si bien los niveles de homología más altos se dan en las regiones exónicas (Blanco & Bernabeu, 2011).

S-endoglina se expresa significativamente en hígado y pulmón en ratón (Perez-Gomez *et al*, 2005), y su expresión aumenta durante la senescencia de las células endoteliales (Blanco *et al*, 2008) y en situaciones de estrés oxidativo y envejecimiento en macrófagos (Aristorena *et al*, 2014).

4.2.4 Endoglina en el ratón

Las formas humanas y de ratón de endoglina sólo presentan una homología del 72% a nivel de proteína (St-Jacques *et al*, 1994a). La forma murina es una proteína 3 aminoácidos más corta en su dominio extracelular, pero con un dominio intracelular de la misma longitud que la proteína humana. Además, endoglina de ratón carece del tripéptido RGD en su región extracelular, pero en su lugar consta de la secuencia homóloga TDD, comprendida por los residuos 399-401 (Rossi *et al*, 2013a). Las principales diferencias entre las proteínas L-endoglina de ambas especies residen en el dominio extracelular, puesto que la región citosólica está altamente conservada: los dominios citosólicos sólo difieren en la serina Ser⁶¹⁹ de la proteína humana, que en ratón es una glicina (Pan *et al*, 2014). Las isoformas S-endoglina de ratón y humana difieren algo más en el dominio intracelular que en el caso de la isoforma mayoritaria: la secuencia del intrón es diferente y el codón de paro está más alejado en el caso del gen murino, dando lugar a un dominio citosólico más largo, de 35 aminoácidos, siendo la región correspondiente al exón exactamente igual a la de S-endoglina humana (Figura 9).

En 2011 se describió en rata la isoforma de endoglina correspondiente a la isoforma corta de ratón y humano, que se denominó S'-endoglina (Meurer *et al*, 2011). La variante de rata proviene también del *splicing* alternativo en el que se retiene una inserción intrónica que

codifica 49 aminoácidos adicionales. Así, en contraste con el ARNm humano y de ratón, el ARNm de S'-endogлина de rata codifica para una proteína más larga que L-endogлина.

43. Niveles de endogлина y angiogénesis

De manera interesante, la expresión de endogлина se ve incrementada en células endoteliales en zonas donde se está produciendo una angiogénesis activa, tanto tumorales como no tumorales (Burrows *et al*, 1995; Bodey *et al*, 1998; Miller *et al*, 1999; Anderberg *et al*, 2013; Kuiper *et al*, 2011), así como en respuesta al principal estímulo angiogénico, que es la hipoxia (Park *et al*, 2013; Barnett *et al*, 2014). Además, la expresión de endogлина también aumenta en zonas donde hay una lesión vascular (Conley *et al*, 2000; Ma *et al*, 2000; Botella *et al*, 2002; van Laake *et al*, 2006; Munoz *et al*, 2012), en el endotelio de la piel ante algunas patologías (Westphal *et al*, 1993; van de Kerkhof *et al*, 1998) y en determinadas enfermedades autoinmunes (Marazuela *et al*, 1995). Asimismo, se ha observado un aumento de la expresión del gen de endogлина en células endoteliales sometidas a un flujo laminar que imita el “*shear stress*” fisiológico (Seghers *et al*, 2012).

Además, endogлина se ha mostrado esencial para una correcta neovascularización, tanto en la clínica, como se observa en los pacientes de HHT1, como en la experimentación *in vivo*, ya que la expresión deficiente de endogлина en ratón lleva a numerosas alteraciones relacionadas con una angiogénesis defectuosa. Se ha documentado el retraso en la reperfusión post-isquémica, relacionada con una reducida producción de VEGF por las células endoteliales de estos ratones, tanto en condiciones basales como tras el tratamiento con TGF- β (Jerkic *et al*, 2006b; Seghers *et al*, 2012), una revascularización anómala en la recuperación tras infarto de miocardio (van Laake *et al*, 2006), así como un crecimiento tumoral reducido relacionado con una menor densidad capilar en el tumor (Duwel *et al*, 2007) y una reducida o nula angiogénesis en la retina en hipoxia (Park *et al*, 2013).

44. Funciones celulares de endogлина que participan en la angiogénesis

44.1. Papel de endogлина en la especificación arterial y venosa

Como hemos indicado anteriormente, endogлина se expresa de forma abundante en el endotelio de los vasos sanguíneos, tanto de arterias como, preferentemente, de venas y capilares.

Esto lleva a pensar que pueda desempeñar un papel en la especificación arterio-venosa durante la vasculogénesis y la angiogénesis.

La mutación deletérea del gen de endogлина causa la aparición de HHT1, como ya se ha señalado. Esta enfermedad cursa con malformaciones arteriovenosas. Una posible causa para la aparición de estas alteraciones es la pérdida de las identidades arterial y venosa. En ratones carentes de endogлина, las venas de la retina de crías con 7 días de vida, habitualmente sin cobertura de CMLV, son positivas para α SMA, marcador de estas células (Mahmoud *et al*, 2010). En ratones heterocigotos para el gen de endogлина, *Eng*^{+/}, el marcador arterial CD34 se expresa en las venas cardinales durante la vasculogénesis, sugiriendo un reclutamiento anómalo de precursores endoteliales durante el desarrollo vascular del embrión (Sorensen *et al*, 2003). Además, la delección de endogлина en embriones de ratón lleva a la expresión ectópica del marcador venoso COUPTFII en arterias (Mancini *et al*, 2009).

4.4.2. Expresión de endogлина en respuesta a hipoxia

El gen de endogлина contiene en su promotor secuencias HRE. Se trata de elementos de promotor reguladores, que unen HIF-1 y modulan la expresión génica en respuesta a hipoxia. Así, la expresión de endogлина aumenta en condiciones de hipoxia, tanto en células endoteliales humanas como en monocitos y células epiteliales (Sanchez-Elsner *et al*, 2002; Lopez-Novoa & Bernabeu, 2010). La expresión de endogлина en hipoxia también puede ser inducida por otras vías, como la activación de la señalización a través de MAPK (Zhu *et al*, 2003). Además, el gen de TGF- β también consta de secuencia HRE en su promotor (Sanchez-Elsner *et al*, 2002), y la expresión de algunas BMP, como BMP2 y BMP7, también es inducida en respuesta a hipoxia (Tseng *et al*, 2010; Luan *et al*, 2015).

Además, el tratamiento con TGF- β incrementa la expresión de HIF-1 α en condiciones tanto de normoxia como de hipoxia en células epiteliales (Basu *et al*, 2011) y BMP9 induce la expresión de HIF-1 α en progenitores mesenquimales (Hu *et al*, 2013).

Endogлина parece un agente clave en la regulación de la respuesta angiogénica a hipoxia. Como ya hemos mencionado, recientemente se ha demostrado en los ratones *Eng*^{+/} una deficiente neovascularización de la retina en el modelo de OIR (del inglés, *Oxygen Induced Retinopathy*), en el que se somete a los ratones a condiciones de hipoxia artificiales, que en ratones *wild type* estimulan la angiogénesis (Park *et al*, 2013). Además, se sabe que endogлина puede actuar como agente protector frente a la apoptosis de las células endoteliales en respuesta a hipoxia y a TGF- β (Li *et al*, 2003).

443. Endoglina modula la liberación de factores proangiogénicos

VEGF y NO (óxido nítrico) son dos de los principales factores proangiogénicos, y son principalmente producidos por las células endoteliales.

Con respecto a la relación entre endoglina y VEGF, son numerosos los trabajos en los que se hace referencia a una regulación recíproca y una participación coordinada de ambas moléculas en la regulación de la angiogénesis. Se han descrito niveles plasmáticos elevados de VEGF y TGF- β en pacientes de HHT1, sin apreciarse diferencias en los niveles de estas citoquinas en los órganos de estos enfermos con respecto a controles sanos (Sadick *et al*, 2005). En cambio, como ya hemos mencionado anteriormente, niveles reducidos de VEGF han sido encontrados en células endoteliales aisladas de aorta de ratones *Eng*^{+/+} (Jerkic *et al*, 2006b), mientras que células endoteliales aisladas de retinas de estos mismos ratones producen mayores niveles de VEGF (Park *et al*, 2013); el diferente origen celular, esto es, macrovasculatura o microvasculatura, podría explicar estas diferencias. No se han visto diferencias en los niveles de VEGF ni en plasma ni en diversos órganos de estos ratones. Además, el tratamiento de ratones *Eng*^{+/+} con un anticuerpo neutralizante de VEGF recupera el balance pro / antiangiogénico, desplazado en estos ratones hacia una situación angiostática, pero sin afectar a los niveles de endoglina (Ardelean *et al*, 2014a). En el endotelio activo, donde los niveles de endoglina aumentan incluso en el caso de los ratones *Eng*^{+/+}, aunque en menor medida que en los controles *Eng*^{+/+}, el tratamiento anti-VEGF sí reduce los niveles de endoglina (Ardelean *et al*, 2014b). Se cree que endoglina es necesaria para una correcta angiogénesis inducida por VEGF, aunque la deficiencia de endoglina no afecta a la señalización de VEGF (Liu *et al*, 2014b). Por otra parte, el tratamiento anti-VEGF del carcinoma pancreático induce un incremento no sólo de la expresión de HIF-1 α , sino también de endoglina (Bockhorn *et al*, 2003). Se ha demostrado que BMP9 bloquea el *sprouting* inducido por VEGF *ex vivo*, a través de ALK1 / Smad1/5/8 (Scharpfenecker *et al*, 2007). Esta vía de señalización es bloqueada por TRC105, anticuerpo que neutraliza endoglina (Liu *et al*, 2014a). La ausencia total de expresión de endoglina en células endoteliales embrionarias conlleva el bloqueo total de la expresión de VEGFR2 (Jerkic & Letarte, 2015). Finalmente, como detallaremos más adelante, tanto VEGF como endoglina participan en el mantenimiento de la estabilidad del endotelio.

En resumen, endoglina y VEGF son moléculas clave en la angiogénesis, y parece que un equilibrio en los niveles de ambas proteínas es esencial en la regulación de este proceso. Además, es evidente que hay una interconexión entre ambas moléculas. Sin embargo, los resultados hasta la fecha no son nada concluyentes y se hace necesario llevar a cabo más estudios.

Hay numerosas evidencias de que el NO es un componente clave en la regulación de la función de VEGF en el endotelio. El NO media la proliferación inducida por VEGF en HUVEC,

así como la organización tridimensional de células endoteliales en cultivo. Además, la exposición de las células endoteliales a VEGF aumenta tanto la expresión de la enzima óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS o NOS₃), como la producción de NO. Inhibidores de la enzima eNOS reducen la angiogénesis inducida por VEGF (Papapetropoulos *et al*, 1997). Además, la producción de NO está directamente regulada por la presión parcial de oxígeno, que se ve reducida en condiciones de hipoxia. Por el contrario, el NO induce la degradación de HIF-1 α , lo que reduciría la respuesta a hipoxia, quizá de forma compensatoria (Olson & van der Vliet, 2011).

La producción de NO durante la angiogénesis ha sido relacionada con endoglin. En nuestro laboratorio demostramos cómo la haploinsuficiencia en endoglin reduce la expresión de eNOS (Jerkic *et al*, 2006b) y la producción de NO (Jerkic *et al*, 2004). Estos resultados han sido recientemente confirmados en células endoteliales aisladas de retinas de estos ratones (Park *et al*, 2013). Además, endoglin promueve la inducción de la expresión de eNOS por TGF- β , vía ALK5 / Smad2, en modelos de células no endoteliales (Santibanez *et al*, 2007). En un estudio reciente se describe como las EPC de pacientes de HHT presentan niveles reducidos de eNOS (Zucco *et al*, 2014). Se ha descrito una localización subcelular tanto de endoglin como de eNOS en caveolas. Se sabe que endoglin es capaz de estabilizar eNOS y es necesaria para la unión de esta enzima a su cofactor Hsp90 (del inglés, *Heat shock protein 90*). Así, se ha descrito una eNOS “desacoplada”, incapaz de unir Hsp90 y, por tanto, no funcional en células *Eng*^{+/−}, que lleva a un incremento en la producción de radicales libres y una reducida síntesis de NO (Toporsian *et al*, 2005). Dado que tanto eNOS, como Hsp90 y Cav-1 se localizan en la cara citosólica de la membrana plasmática (Figura 11), se puede deducir que la interacción de estas moléculas con endoglin tiene lugar a través del dominio intracelular de nuestra proteína de interés. Así, podemos hipotetizar que el papel de endoglin en la síntesis de NO se encuentre alterado o incluso anulado cuando sea la isoforma S-endoglin la que participe en el proceso.

Como resumen de este apartado, podríamos sacar dos ideas en cuanto a la relación de endoglin con VEGF y NO. Por una parte, la hipoxia directamente regula los niveles de estas tres moléculas proangiogénicas, lo que abre la posibilidad de una interconexión entre ellas. Por otro lado, endoglin parece modular dos de las principales vías de acción de VEGF, como son la producción de NO y la activación de ERK.

4.4.4. Endoglin en relación con los precursores endoteliales

Tradicionalmente se ha considerado que endoglin es expresada por células endoteliales maduras (Zengin *et al*, 2006; Pelosi *et al*, 2012), pero se ha demostrado que las EPC

pueden expresar endogлина cuando se estimula su diferenciación a células endoteliales con VEGF (Bagley *et al*, 2005).

Como ya hemos comentado, la deficiencia en endogлина conlleva un deficiente “homing” de las EPC en ratones *Eng*^{+/-} (Sorensen *et al*, 2003). Las EPC tardías también son conocidas como ECFC o BOEC (del inglés, *Blood Outgrowth Endothelial Cells*); pueden ser estudiadas en cultivo y además muestran propiedades angiogénicas. La caracterización de BOEC procedentes de pacientes de HHT1 reveló una morfología alterada caracterizada por un citoesqueleto de actina desorganizado, además de una reducida capacidad para formar estructuras similares a capilares *in vitro* y reducida adhesión, proliferación y migración (Fernandez *et al*, 2005). El estudio del perfil genético de estas células mostró la reducción en la expresión de genes involucrados en la angiogénesis, la adhesión celular, la regulación de la migración y el citoesqueleto, y del ciclo celular y la supervivencia, como los que codifican para eNOS, VE-cadherina 2, PECAM1 (del inglés, *Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1*), Angpt2 o ciclina B2 (Fernandez *et al*, 2007). Más recientemente se ha demostrado una reducida capacidad de estas células para diferenciarse a células endoteliales, así como una reducida movilidad hacia potentes estímulos angiogénicos como VEGF (Zucco *et al*, 2014).

4.4.5. Endogлина modula la integridad de la barrera endotelial

VEGF es un potente inductor de la permeabilidad vascular (Weis & Cheresh, 2005; Persson & Buschmann, 2011). De forma interesante, se ha descrito la alteración de la barrera endotelial en tumores de ratones *Eng*^{+/-}, relacionada con una mayor incidencia de metástasis (Anderberg *et al*, 2013). El aumento de la permeabilidad en el endotelio de estos ratones también se ha descrito en relación con elevados niveles de VEGF en colon, principalmente tras una inducción crónica de un proceso inflamatorio (Jerkic *et al*, 2010). Un aumento en la permeabilidad también se ha observado en el estudio *in vitro* de monocapas de células endoteliales *Eng*^{+/-} y *Eng*^{+/-}, en comparación con células control (Jerkic & Letarte, 2015).

La expresión de VE-cadherina (VE, del inglés, *Vascular Endothelial*) es característica de células endoteliales en estado quiescente, cuando se establecen uniones adherentes estables entre ellas. VE-cadherina no sólo tiene un papel estructural de establecimiento de uniones homotípicas entre células endoteliales, sino que también inhibe la señalización de VEGF a través de VEGFR2 y, por tanto, su señalización (Lampugnani *et al*, 2006). VEGF, por contra, induce la internalización de VE-cadherina y la ruptura de la unión intercelular que establecía (Gavard & Gutkind, 2006).

La alteración de la permeabilidad descrita en los ratones *Eng*^{+/+} se ha relacionado con una alteración en los niveles de VE-cadherina y la activación constitutiva de RhoA, que normalmente es inducida por VEGF y TGF- β y lleva a la desestabilización del endotelio (Jerkic & Letarte, 2015). Además, ante la haploinsuficiencia de endogлина, las uniones celulares disminuyen mediante la reducción de la expresión de VE-cadherina, β -catenina, PECAM y ZO-1 (Park *et al*, 2013). Se sabe que VE-cadherina interacciona con T β RRI, ALK1, ALK5 y endogлина, y que favorece el ensamblaje del complejo de receptores de TGF- β , modulando la transducción de la señal y activación de las proteínas Smad. Además, las células *knock-out* para VE-cadherina presentan un bloqueo de la inhibición de la proliferación por TGF- β (Rudini *et al*, 2008). La relación entre endogлина y VE-cadherina puede estar mediada por zyxina, proteína del citoesqueleto con la que endogлина interacciona que se encuentra unida al complejo cadherina / catenina / actinina (Lee *et al*, 2004b) (Figura 11).

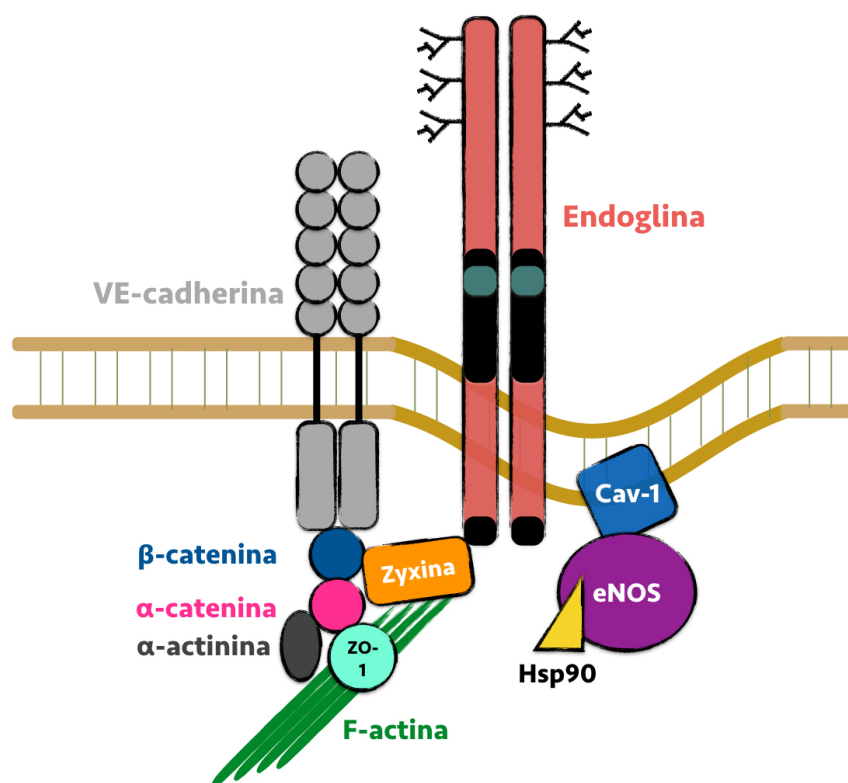


Figura 11. Localización de endogлина en caveolas y relación con eNOS y VE-cadherina

Posible relación entre endogлина y VE-cadherina a través de zyxina y proteínas de anclaje al citoesqueleto. Posible relación entre endogлина y eNOS. Adaptado de <http://sabiosciencias.com>.

4.4.6. Endoglina interacciona con proteínas de citoesqueleto y las adhesiones focales durante la migración celular

Endoglina se localiza en las adhesiones focales durante la migración (Liu *et al*, 2002). Esto se debe, al menos en parte, a su capacidad para unirse a zyxina (Figura 11), proteína que se concentra en las adhesiones focales y a lo largo del citoesqueleto de actina (Conley *et al*, 2004). Además, endoglina promueve cambios en la localización de ZRP-1, que pasa de estar en las adhesiones focales a las estructuras fibrilares de actina, lo que supone cambios en la disposición del citoesqueleto (Sanz-Rodriguez *et al*, 2004). Así, una expresión de endoglina reducida o incrementada, puede conllevar cambios en la morfología y, por tanto, en la motilidad celular.

BOEC aisladas de pacientes de HHT1 mostraron una morfología alterada, un citoesqueleto desorganizado y una capacidad migratoria disminuida (Fernandez *et al*, 2005, 2007), así como una menor motilidad hacia quimioatrayentes como VEGF (Zucco *et al*, 2014). La neutralización de endoglina con el anticuerpo monoclonal específico TRC105, reduce la migración de HUVEC y la formación de estructuras similares a capilares *in vitro*, probablemente mediante la inhibición de la señalización de BMP9 a través de Smad1/5/8 (Liu *et al*, 2014a). Por el contrario, la sobreexpresión de endoglina en diferentes tipos celulares no endoteliales produjo una disminución de los índices de migración (Liu *et al*, 2002; Conley *et al*, 2004). Además, se observó una mayor capacidad de migración en células endoteliales embrionarias aisladas de ratones *knock-out* de endoglina, en las que la recuperación de la expresión de endoglina normalizaba esta diferencia. Estos autores implicaron en el proceso la fosforilación de la Ser⁶⁴⁶ de endoglina por ALK5 (Ray *et al*, 2010a).

Debido a la localización intracelular tanto de zyxina como de ZRP-1, y considerando el posible papel sobre el citoesqueleto, el dominio intracelular de endoglina emerge de nuevo como un modulador clave, en este caso de la organización del citoesqueleto y la migración celular.

4.4.7. Endoglina regula la señalización de TGF- β y BMP9 en el endotelio

La fosforilación de endoglina regula la señalización de TGF- β 1 y BMP9 a través de las vías de las proteínas Smad. Endoglina es necesaria para la inducción por TGF- β y BMP9 de la señalización a través de la vía de Smad1/5/8 en células endoteliales embrionarias *in vitro*. La fosforilación de endoglina por ALK5 en su residuo Ser⁶⁴⁶ es esencial en el caso de la activación por TGF- β , y tanto la Ser⁶⁴⁶ como Ser⁶⁴⁹ han de ser fosforiladas para la inducción por BMP9 (Ray *et al*, 2010a).

Así, se ha propuesto que endogлина colabora con ALK1 en la señalización proangiogénica de estas citoquinas, promoviendo las fases activas de la angiogénesis a través de la activación de Smad1/5/8 (Goumans *et al*, 2002, 2003a; van Meeteren *et al*, 2012; Nolan-Stevaux *et al*, 2012) (Figura 12). Pero la deficiencia de endogлина en el endotelio no sólo inhibe la activación de Smad1/5/8 sino también de Smad2/3. Se cree que esto se debe a una reducción en la expresión de T β RII (Park *et al*, 2013). El papel de endogлина en la modulación de la señalización de los miembros de la superfamilia de TGF- β a través de la vía de ALK1 / Smad1/5/8 ha sido recientemente revisado (González-Núñez *et al*, 2013; Jonker, 2014).

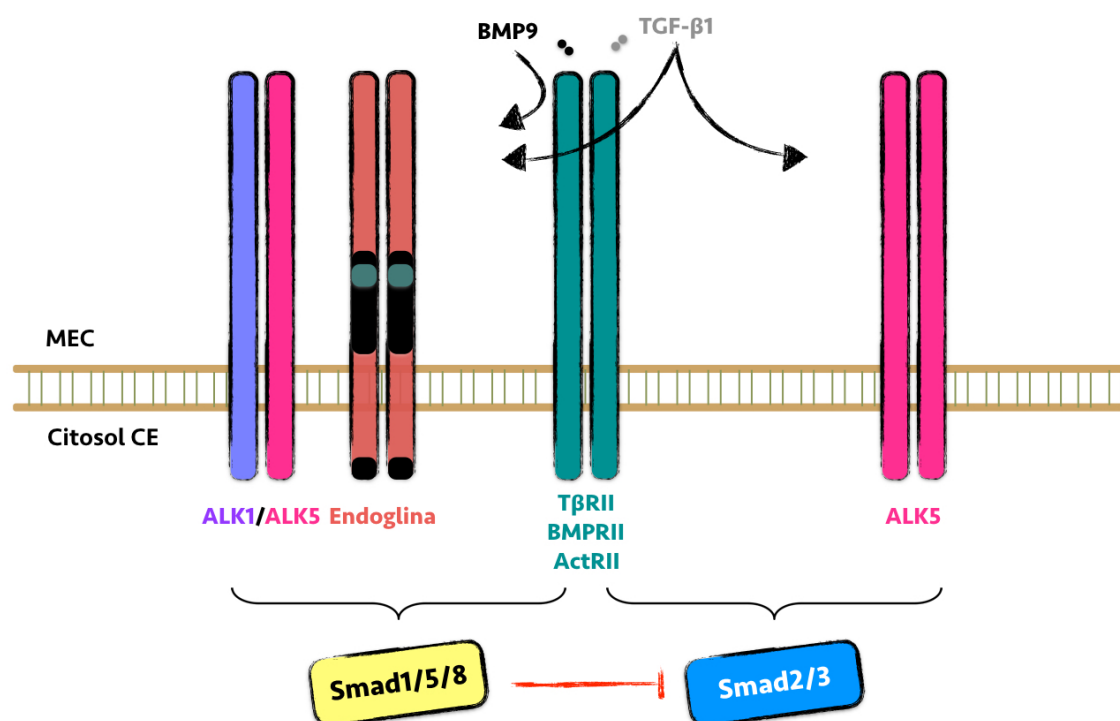


Figura 12. Papel de endogлина en la señalización de TGF- β 1 y BMP9 en el endotelio

Endogлина favorece la señalización de TGF- β 1 y BMP9 a través de ALK1 / Smad1/5/8. Adaptado de ten Dijke *et al*, 2008.

Hasta la fecha, la mayoría de los estudios de señalización se han llevado a cabo atendiendo únicamente a la isoforma mayoritaria, L-endogлина. A la vista de los pocos resultados que se conocen acerca de la isoforma S-endogлина, se cree que ambas isoformas modulan de forma diferencial la señalización a través de las vías de ALK1 y ALK5, puesto que en dos modelos celulares diferentes se ha demostrado que la sobreexpresión de S-endogлина favorece la

señalización a través de ALK5 / Smad2/3, mientras que L-endogлина promueve la señalización a través de ALK1 / Smad1/5/8, como se ha demostrado en otros numerosos trabajos (Blanco *et al*, 2008; Velasco *et al*, 2008). Este hecho puede contribuir a explicar el efecto dual de estas citoquinas en función de sus niveles.

En lo referente a la señalización no canónica de TGF- β , en nuestro laboratorio hemos demostrado que endogлина tiene un papel inhibitor de la señalización tanto de ERK y p38 (resultados no publicados) como de Akt (Pericacho *et al*, 2013). Según nuestros datos preliminares, la isoforma corta de endogлина parece mostrar el efecto opuesto, induciendo la señalización a través de MAPK. Se ha relacionado la falta de endogлина con una mayor activación de las vías de ERK, JNK y p38 en células endoteliales, y con propiedades angiogénicas alteradas (Park *et al*, 2013). Además, la inducción de ERK mediada por endogлина depende de la interacción del dominio citosólico de endogлина con β -arrestina (Lee & Blobel, 2007; Valluru *et al*, 2011). Cabe señalar además que la cascada de ERK es la principal vía de señalización de VEGF en la célula endotelial (Eichmann & Simons, 2012). Respecto a BMP9, se sabe que activa PI3K de forma dependiente de endogлина (Lee *et al*, 2012).

4.4.8. Endogлина puede participar en el reclutamiento de células murales

Endogлина se expresa en niveles elevados en las células endoteliales durante los procesos de neovascularización, al mismo tiempo que tiene lugar el reclutamiento de las células murales a los vasos (Lopez-Novoa & Bernabeu, 2010). Numerosas evidencias apuntan a un posible papel de endogлина en el reclutamiento de células murales por el tubo de células endoteliales. En primer lugar, los ratones *Eng*^{-/-} mueren en el día 11,5 de gestación debido a un desarrollo vascular defectuoso y a una deficiente diferenciación de las CMLV y asociación a las células endoteliales, aunque los procesos de vasculogénesis no se ven afectados (Bourdeau *et al*, 1999; Li *et al*, 1999; Arthur *et al*, 2000). Los niveles de α SMA (del inglés, *Smooth Muscle Actin*) son mucho más bajos en los sacos vitelinos de estos ratones, en los que se observan vasos frágiles y dilatados (Li *et al*, 1999; Carvalho *et al*, 2004). La imposibilidad del endotelio para llevar a cabo el remodelado vascular en los ratones *Eng*^{-/-}, junto con el subsiguiente desarrollo defectuoso de las CMLV, sugiere que las CMLV tienen un papel importante en la regulación de la organización vascular, implicada en la patogénesis de la HHT1. Este dato es consistente con el hecho de que los pacientes de HHT1 sufran epistaxis recurrentes y hemorragias internas debido a la presencia de vasos inmaduros (Orlova *et al*, 2011). Se ha demostrado que la expresión de PDGF-B es directamente inducida por el principal ligando de endogлина, TGF- β , en determinados tipos

celulares, aunque se desconoce el papel de endogлина al respecto (Wang & Hirschberg, 2000; Bruna *et al*, 2007; Ikushima *et al*, 2008).

Las integrinas son proteínas que juegan un importante papel durante la angiogénesis, el remodelado vascular y la maduración (Silva *et al*, 2008). Así, en el vaso en crecimiento, la membrana basal sufre degradación y es reemplazada por una matriz rica en fibronectina, que induce la expresión de integrinas en la membrana de las células murales, principalmente las isoformas $\alpha 5\beta 1$ y $\alpha v\beta 3$, ambas receptores de fibronectina. Ambas integrinas participan en la proliferación de células endoteliales y pericitos, y durante el *sprouting* (Cai *et al*, 2009; Liu *et al*, 2009; Li *et al*, 2012).

Endogлина, en el humano, presenta en su dominio extracelular el motivo prototipo RGD, implicado en interacciones proteína-proteína con integrinas. En ratón, se ha descrito un motivo equivalente, TDD, también con capacidad para unirse a integrinas (Lum *et al*, 1998; Rossi *et al*, 2013a). De hecho, ya se ha puesto de manifiesto la existencia de una interacción funcional entre endogлина y las subunidades de integrinas $\beta 1$ (Gougos *et al*, 1992; Conley *et al*, 2004; Muenzner *et al*, 2010; Tian *et al*, 2012). Recientemente se ha propuesto a endogлина como un ligando de las integrinas de los leucocitos (Rossi *et al*, 2013a, 2014). Además, se sabe que las CMLV expresan integrinas $\beta 1$ (Abraham *et al*, 2008). Estas evidencias sugieren la posibilidad de que endogлина en las células endoteliales interaccione con integrinas de las células murales, favoreciendo la maduración vascular, hipótesis que muy recientemente se ha demostrado (Rossi *et al*, 2015).

Una isoforma de integrina candidata a interactuar con endogлина durante la angiogénesis es $\alpha 5\beta 1$. Se trata de una integrina proangiogénica, necesaria para una correcta angiogénesis inducida por hipoxia (Li *et al*, 2012), y cuya expresión aumenta durante los procesos de vasculogénesis y angiogénesis (Milner & Campbell, 2002; Boroujerdi *et al*, 2012). Integrina $\alpha 5\beta 1$ es expresada por las CMLV y reconoce específicamente el motivo RGD de proteínas de la MEC durante la regulación del reclutamiento y adhesión de estas células a los vasos sanguíneos (Abraham *et al*, 2008). Se ha demostrado mediante co-inmunoprecipitación que endogлина se une a la subunidad $\alpha 5$ pero de forma independiente al dominio RGD (Tian *et al*, 2012). Además, estos mismos autores muestran cómo la formación de complejos ligando / receptor entre fibronectina y la subunidad $\beta 1$ promueven la unión de endogлина a ALK1 y la señalización de TGF- $\beta 1$ a través la vía de Smad1/5/8. TGF- $\beta 1$, por su parte, activa la señalización a través de integrinas $\alpha 5\beta 1$ de forma endogлина-dependiente.

Por otra parte, endogлина también es expresada por las células murales, aunque es muy poco lo que se sabe acerca de su papel en estos tipos celulares. Un reciente e interesante artículo,

demonstró cómo la deficiencia en la proteína SPARC (del inglés, *Secreted Protein Acidic and Rich in Cysteine*) en pericitos, promueve la señalización de TGF- β , que se encontraría en su estado latente anclado a la MEC y unido a integrinas αv , a través de ALK5 / Smad2, de forma endoglina dependiente. Esta activación inhibe la migración y reclutamiento de pericitos al vaso, por lo que endoglina también parece estar implicada en la regulación de este proceso llevada a cabo desde la propia célula mural (Rivera & Brekken, 2011). En relación con la señalización de TGF- β , la inhibición de ALK5 de forma simultánea al estímulo con VEGF, o VEGF y FGF en HUVEC, induce la expresión de las subunidades de integrinas $\alpha 5$ y $\beta 3$, entre otros genes proangiogénicos (Liu *et al*, 2009). Este dato abre la puerta a una posible implicación de endoglina, en cuanto a la regulación que hace de la señalización a través de ALK1 o ALK5, si bien no se tiene ningún indicio sobre lo que pueda suceder en células murales. Por el contrario, se ha demostrado en una línea celular promonocítica, que endoglina inhibe la expresión de las integrinas $\alpha 1$, $\beta 2$, αM y αL . Sin embargo, un efecto similar se ha observado para la isoforma corta de endoglina, y se observó además que ambas isoformas bloquean la adhesión celular mediada por integrinas de estas células al endotelio (Blanco *et al*, 2015). Los MAB (“mesoangioblastos”) son células pluripotentes asociadas a los vasos, que expresan marcadores de pericitos y que mejoran la regeneración del músculo esquelético. Recientemente se ha demostrado que la vía de Smad1/5/8 está implicada en la diferenciación miogénica de estos precursores, si bien aún no se sabe si endoglina está implicada en este proceso (Costamagna *et al*, 2015).

Aunque hay muchas evidencias que apuntan a que la deficiencia de endoglina puede llevar a una cobertura mural deficiente, los únicos datos experimentales de que se dispone a día de hoy indican que las retinas de los ratones *Eng*^{+/−} no presentan diferencias con los *wild type* ni en el marcaje de pericitos ni en el de CMLV (Lebrin *et al*, 2010), pero sí en su permeabilidad (Rossi *et al*, 2015). Se hace necesario estudiar este hecho en más profundidad para poder demostrar el posible papel de endoglina endotelial en la maduración vascular.

4.5. Función diferencial de las isoformas de endoglina en la angiogénesis

Apenas se conoce el papel que desempeña S-endoglina *in vivo*. Estudios en ratón sugieren que puede comportarse como una molécula antiangiogénica, contrariamente a la función proangiogénica que se le atribuye a la isoforma mayoritaria. Ratones que sobreexpresan S-endoglina presentan un retraso en el crecimiento tumoral, similar a aquel observado en ratones deficientes de endoglina (Quintanilla *et al*, 2003; Perez-Gomez *et al*, 2005; Duwel *et al*, 2007). También se le ha atribuido un papel en senescencia (Blanco *et al*, 2008), y se ha sugerido

que el ratio L-endogлина / S-endogлина puede verse reducido con el envejecimiento, si bien esto aún no se ha podido demostrar.

Se han descrito diferentes respuestas celulares a la sobreexpresión de L-endogлина o de S-endogлина, sugiriendo un papel esencial del dominio intracelular de la proteína en la modulación de numerosos procesos. Así, en un modelo celular de mioblastos de rata, la sobreexpresión de L-endogлина promueve la activación de la vía de Smad1/5/8, inhibe la vía de Smad2/3 y estimula la proliferación celular. Por el contrario, la sobreexpresión de S-endogлина induce la señalización a través de Smad2/3 y la producción de componentes de la MEC (Velasco *et al*, 2008).

Una posible hipótesis es que, al carecer de la mayor parte del dominio intracelular, S-endogлина esté actuando como un dominante negativo del efecto de L-endogлина, al formar heterodímeros con ésta o incluso competir con ella por la unión al complejo de receptores de TGF- β , y ser incapaz de ejercer el efecto de la isoforma mayoritaria. A diferencia de lo que sucede con TGF- β , endogлина puede unir BMP9 por sí misma (Alt *et al*, 2012), por lo que en este caso, S-endogлина podría estar secuestrando, no sólo al complejo de receptores, sino la propia citoquina del medio extracelular. De esta forma, S-endogлина ejercería el mismo papel que L-endogлина en aquellos procesos mediados exclusivamente por el dominio extracelular, pero antagonizaría el efecto de la isoforma principal cuando es el dominio intracelular quien modula el proceso en cuestión.

Objetivos

“ Si te empeñas, tú mismo puedes ser tan peligroso como cualquiera que se cruce en tu camino. O más. ”

Las Aventuras del Capitán Alatríste, Arturo Pérez-Reverte

Como se ha puesto de manifiesto en el apartado “Introducción”, endogлина es una molécula clave en la angiogénesis. Los estudios al respecto se han llevado a cabo preferentemente en modelos de inhibición, insuficiencia o abolición de la proteína endogлина, y han demostrado que se trata de una proteína imprescindible para la correcta vasculogénesis y angiogénesis. Se ha descrito que los niveles de endogлина en el endotelio cambian durante la angiogénesis y que esto es fundamental para que la formación *de novo* de vasos sanguíneos tenga lugar correctamente. Sin embargo, apenas se ha estudiado el efecto del aumento de los niveles de endogлина en cada uno de los procesos específicos de la formación de vasos sanguíneos y en la fisiología de la célula endotelial. Además, pese a que se conoce una segunda isoforma de endogлина de membrana presente en condiciones fisiológicas de forma muy minoritaria, y que carece de buena parte del dominio intracelular, son muy pocos los estudios que hablan de esta isoforma ni de su efecto en comparación con el de la isoforma mayoritaria.

Por tanto, para conocer mejor el papel de las isoformas de endogлина en la regulación de los procesos involucrados en la angiogénesis, nos planteamos los siguientes OBJETIVOS:

1. **Analizar el efecto de la sobreexpresión de endogлина sobre los procesos de vascularización *in vivo*.**
 - a. Evaluar el efecto de la sobreexpresión de L-endogлина en la reperusión post-isquémica.
 - b. Estudiar el efecto de la sobreexpresión de L-endogлина en modelos de angiogénesis *in vivo*.
 - c. Analizar si el dominio intracelular media la respuesta que observemos de L-endogлина utilizando un modelo de sobreexpresión de S-endogлина.

2. **Estudiar el efecto de la sobreexpresión de endogлина en el proceso de *sprouting*, tanto *in vivo* como *ex vivo*, así como la implicación del dominio intracelular.**

3. Investigar el efecto de la sobreexpresión de endoglina en la fisiología de procesos de la célula endotelial involucrados en la angiogénesis:
 - a. Estudiar el efecto de la sobreexpresión de endoglina sobre la proliferación y la migración endotelial.
 - b. Estudiar el efecto de la sobreexpresión de endoglina sobre la organización de las células endoteliales en estructuras similares a capilares en cultivo.
 - c. Analizar si el dominio intracelular media la respuesta que observemos de L-endoglina, utilizando un modelo de sobreexpresión de S-endoglina.

4. Estudiar el efecto de la sobreexpresión de endoglina sobre el reclutamiento de células murales y la maduración del vaso.

Materiales y métodos

“Golpe a golpe. Verso a verso.”

Joan Manuel Serrat

1. Materiales

Todos los reactivos, anticuerpos, materiales y aparatos empleados para la realización de este trabajo, así como las casas comerciales, están recogidos en las [Tablas 10, 11, 12 y 13](#), que se encuentran al final de este apartado de “Materiales y métodos”.

2. Ratones que sobreexpresan endoglina larga ($L-ENG^+$) y corta ($S-ENG^+$)

Los animales de experimentación utilizados en este trabajo son ratones transgénicos de fondo genético C57BL/6J que sobreexpresan de forma ubicua las proteínas humanas L-endoglina ($L-ENG^+$) o S-endoglina ($S-ENG^+$).

Estos ratones se generaron mediante la microinyección de los respectivos vectores pCAGGS en un pronúcleo fecundado de CBA x C57BL/6J. Estos vectores fueron construidos en el laboratorio del Dr. Carmelo Bernabéu (Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC, Madrid). El vector era portador de la secuencia de ADNc de endoglina, esto es, en el caso de los ratones $L-ENG^+$, la secuencia de exones del gen de endoglina, mientras que para los ratones $S-ENG^+$, este vector contenía la secuencia de exones del 1 al 13, más la región del intrón que se transcribe hasta el codón de *stop* (Oujo *et al*, 2014).

En la generación de estos vectores se utilizó un constructo formado por la secuencia líder de endoglina (SL, que comprende los aminoácidos del 1 al 25), seguida por el epítipo de la hemaglutinina de *Influenza* (HA) y el ADNc maduro de endoglina. Esta construcción fue clonada en el sitio EcoRI de un vector pcEXV. Tras la digestión con la enzima de restricción EcoRI, el fragmento se insertó en el sitio EcoRI de un plásmido pCAGGS, bajo el control del promotor de actina, de expresión ubicua. Este plásmido es además portador de la secuencia amplificadora del CMV (del inglés, *Cauliflower Mosaic Virus*), otro amplificador y un intrón del gen de la β -globina antes del sitio EcoRI. Después de la secuencia de endoglina, contiene un motivo de poliadenilación del gen de la β -globina (Oujo *et al*, 2014). Un esquema de esta construcción se representa en la [Figura 13](#).

Para la obtención de fragmentos lineales para la microinyección, este vector fue digerido con las enzimas SalI/KpnI. Se procedió a la separación y purificación del fragmento portador del gen de endoglina, de 5,2 kilobases, mediante electroforesis en gel de agarosa.

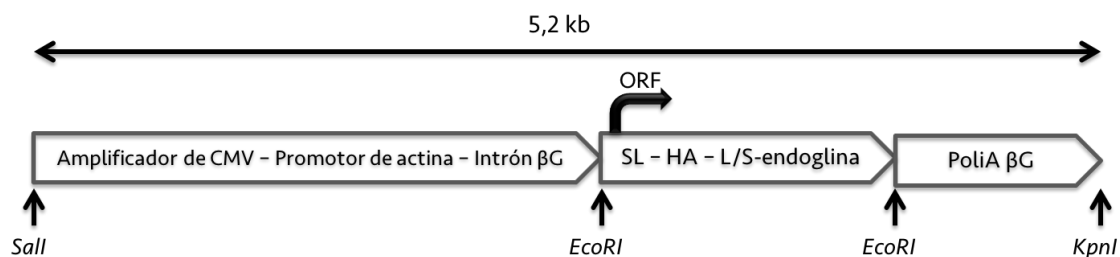


Figura 13. Construcción genética para la generación de los ratones *L-ENG*⁺ y *S-ENG*⁺

Adaptado de Oujo *et al*, 2014.

Los óvulos fecundados fueron inyectados en hembras gestantes en el Servicio de Animales Transgénico de la Universidad de Salamanca, mediante protocolos estándar. La microinyección en un estado tan inicial como es el óvulo fecundado permite que el transgen esté presente en todas las células del organismo y, por tanto, también en la línea germinal. De esta forma, los descendientes de estos ratones son portadores del transgen en todas sus células y éste, gracias al promotor del gen de actina, se expresa de forma ubicua. La descendencia fue genotipada mediante reacción en cadena de la polimerasa o PCR (del inglés, *Polimerase Chain Reaction*). Los animales transgénicos fundadores se retrocruzaron con ratones C57BL/6J para perpetuar la línea transgénica.

Para la realización de este trabajo se utilizaron los ratones *L-ENG*⁺ y *S-ENG*⁺ mencionados. Todos los animales utilizados pertenecían a una generación de retrocruzamiento superior a ocho. Se utilizaron ratones *wild type* (*WT*) C57BL/6J como controles de los experimentos. Los estudios se realizaron con ratones entre 3 y 6 meses de edad, de un peso de unos 25—30 gramos. Los experimentos se desarrollaron con las tres líneas de ratones, *WT*, *L-ENG*⁺ y *S-ENG*⁺, se diseñaron en paralelo y se llevaron a cabo siguiendo el mismo protocolo.

2.1. Mantenimiento y manipulación de los animales

Los animales se mantuvieron en las dependencias del Servicio de Experimentación Animal (SEA) de la Universidad de Salamanca, en un animalario bajo barrera libre de patógenos (SPF). La cría de nuestros animales la llevó a cabo nuestra técnico de laboratorio.

Los animales se manipularon siguiendo las recomendaciones de la Declaración de Helsinki de la Asamblea Médica Mundial y los principios del cuidado y la utilización de los animales de experimentación estipulados en las regulaciones internacionales y en las siguientes instituciones europeas y nacionales: la Directiva Europea 2010/63/UE, la Ley del Estado Español 32/2007 de cuidado de los animales y los Reales Decretos RD1201/2005 y RD 53/2013 sobre la protección de los animales utilizados en experimentación y en otros fines científicos.

Todos los animales se alimentaron con una dieta estándar, con la siguiente composición: almidón (34,8% del total), proteína bruta (20,2%), cenizas brutas (5,5%), materias grasas brutas (5%), lisina (1%), calcio (0,9%), fósforo (0,6%), metionina (0,6%), sodio (0,28%), vitamina A (15 UI/g), vitamina D₃ (2,2 UI/g) y vitamina E (70 UI/g). En su preparación se utilizaron los siguientes ingredientes: cereales, subproductos de molinería, harinas o tortas oleaginosas, harina de carne, compuestos minerales y corrector vitamínico mineral.

El sacrificio de los animales se llevó a cabo siguiendo estrictamente las guías para la eutanasia de los animales de experimentación detalladas en el Anexo III del RD 53/2013, basadas en el reglamento 1099/2009 del Consejo Europeo. Además, utilizamos como referencia las recomendaciones dictadas por la Asociación Médica de Veterinaria Americana (AVMA), que se pueden consultar en la dirección web detallada en la bibliografía (American Veterinary Medical Association, 2013). Concretamente, dependiendo de la edad de los ratones y los requerimientos del experimento, se utilizaron las técnicas de dislocación cervical, decapitación o hipoxia (desplazamiento del O₂ mediante gaseado con CO₂).

2.2. Determinación del genotipo de los ratones

Como se ha indicado anteriormente, el genotipo de los ratones se determinó mediante PCR. Para ello, se digirió una pequeña porción del extremo de la cola de los ratones en tampón de lisis (Tris 50 mM, EDTA 5 mM, NaCl 100 mM, DTT 1mM y espermidina 0,5 mM) al que se añadieron 250 ng/ μ L de proteinasa K (*Roche*), durante 24 horas a 55°C. El sobrenadante de esta digestión contiene el ADN genómico extraído de la cola del ratón. Dicho sobrenadante se almacenó a -20°C. Con 0,5 μ L de esta muestra de ADN, se procedió a amplificar mediante PCR una región específica del fragmento extracelular del gen de endoglina humana. Para ello se utilizaron unos cebadores de PCR que amplifican específicamente el gen de endoglina humana ([Tabla 1](#)), ADN polimerasa (*Biotoools*), dNTP (*Roche*) y el tampón de reacción.

Tabla 1. Cebadores para genotipado y condiciones de PCR

| Gen diana | Secuencia de los cebadores (5' → 3') | Tª de anillamiento | Longitud amplicón (pb) |
|------------|---|--------------------|------------------------|
| ENG | TGAAGCCACGAATGTTTTCT AGAGCATCCTCCTCCGACTGG | 59 | 375 |

La secuencia del ADN genómico amplificada en esta reacción se detalla en la [Figura 14](#). El genotipado de los animales lo llevó a cabo nuestra técnico de laboratorio.

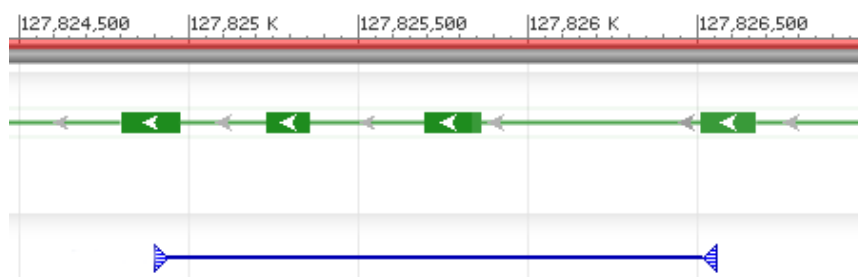


Figura 14. Región del gen de endoglina humana amplificada en el genotipado

Las flechas azules son los cebadores: así podemos conocer su lugar de anillamiento.

El producto de PCR se separó en un gel de agarosa de 1% (*Lonza*), utilizando un marcador específico de 1 kilobase (*Thermo Fisher Scientific*). El producto de amplificación de PCR apareció a la altura de 375 pares de bases. De este modo, aquellas muestras en la que observásemos producto de PCR corresponderían con aquellos animales de la progenie que hubiesen incorporado el gen de endoglina en sus células, ya fuese de la línea de ratones *L-ENG^f* o *S-ENG^f*, en cada caso.

3. Isquemia-reperfusión femoral

La técnica de isquemia-reperfusión femoral nos permitió evaluar la tasa de revascularización o, más concretamente, el ritmo al que se restableció el flujo sanguíneo a través

de la extremidad tras la práctica de la ligadura femoral y la consecuente isquemia. Indirectamente, evaluamos de este modo la eficacia con que se produjeron los eventos de angiogénesis y arteriogénesis, principalmente.

3.1. Cirugía: isquemia femoral

El primer procedimiento que se llevó a cabo para analizar la reperfusión post-isquémica consistió en practicar la ligadura unilateral de la arteria femoral del ratón, para inducir así la isquemia. Se llevó a cabo adaptando un protocolo previamente descrito (Limboung *et al*, 2009).

Previamente se rasuraron por completo las dos extremidades traseras del ratón. Para la cirugía, se procedió a anestesiarse al ratón con anestesia inhalatoria: isoflurano 2% en oxígeno (*IsoFlo, Esteve*). Antes de comenzar la cirugía, se administró al animal una dosis del analgésico buprenorfina (0,15 mg/kg p.c., vía subcutánea; *Buprex, RB Pharmaceuticals*), de tal forma que, una vez terminado el procedimiento quirúrgico, ya estuviese ejerciendo sus efectos.

Para los procedimientos quirúrgicos se empleó material del fabricante *Fine Scientific Tools (F.S.T.)*. Para proceder a la ligadura de la arteria, en primer lugar se practicó una incisión de unos 5 mm en la zona de la ingle izquierda. Tras retirar el tejido conjuntivo más superficial, se accedió al paquete compuesto por la arteria y la vena femorales y el nervio femoral. Se localizó el punto de ramificación de la arteria femoral en arterias epigástrica, femoral profunda y colaterales, para trabajar en la zona inmediatamente anterior a esta bifurcación ([Figura 15A](#)); de esta forma, aseguramos un total bloqueo del aporte sanguíneo a la extremidad. Se diseccionó dicho paquete y se separaron los vasos sanguíneos del nervio. Una vez los vasos estuvieron aislados, se practicaron dos nudos dobles con sutura 5/0 no absorbible estéril de seda trenzada (*Laboratorio Aragón*). Se practicó un corte en el segmento de paquete vascular entre los dos nudos, de tal modo que el flujo sanguíneo de esa pata quedó cortado. Finalmente se cerró la herida mediante dos puntos de sutura 5/0 no absorbible discontinuos y se desinfectó la zona con solución yodada.

Se trata de una operación bastante reproducible y que se mecaniza con facilidad, lo que permite un análisis muy fiable, dada la variabilidad intrínseca de los métodos *in vivo*.

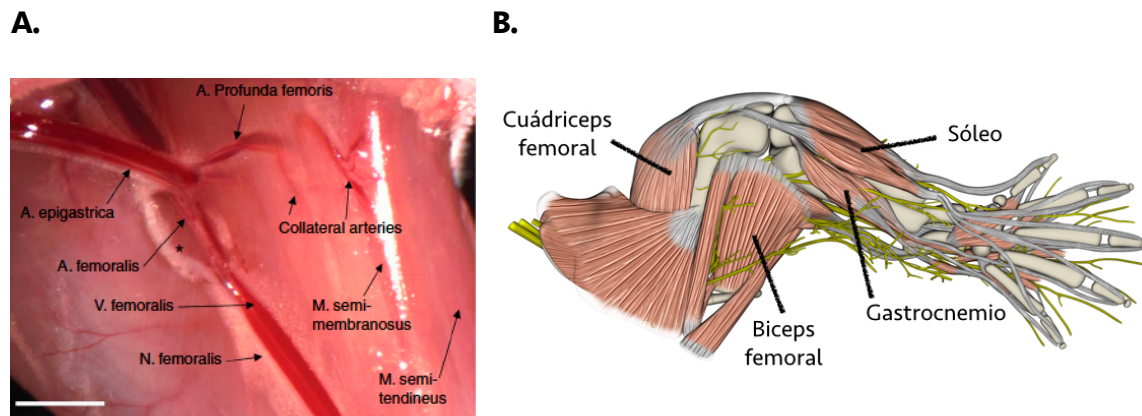


Figura 15. Anatomía de las extremidades posteriores del ratón

A. Anatomía de la vasculatura. Adaptado de Limbourg *et al*, 2009. B. Anatomía muscular: principales músculos de la extremidad posterior. Adaptado de <http://kardon.genetics.utah.edu/>.

3.2. Determinación de la perfusión con láser Doppler

Disponemos del equipo *Laser Doppler Moor LDLS* (Figura 16A) que nos permitió medir el flujo sanguíneo en una determinada zona de nuestro animal. La técnica se basa en el “efecto Doppler”, que determina que la frecuencia de la luz láser reflejada varía si la superficie enfocada que lo refleja se desplaza.

Nuestro equipo dispone de dos fuentes de luz: una visible, de 658 nm de longitud de onda, y otra próxima al infrarrojo, de 785 nm. El aparato produce una única línea láser con los haces visible e infrarrojo coaxiales. Gracias a un espejo controlado por un motor, el láser hace un barrido de la superficie del ratón. Los tejidos serán la superficie que refleje el haz de luz, que será filtrado para eliminar la luz exógena y recibido por un fotodetector. Al ser la sangre la única superficie en movimiento del animal anestesiado, la modificación de la frecuencia de la luz reflejada dependerá directa y exclusivamente del flujo sanguíneo.

El *software* acoplado al láser permite, mediante un algoritmo, transformar la frecuencia de la luz recibida por el fotodetector en unidades de flujo arbitrarias, que son representadas en una imagen bidimensional a través de un código de colores (Figura 16B). El programa permite cuantificar en esta imagen el promedio de unidades arbitrarias de flujo por cada píxel de un área seleccionada.

De esta forma, pudimos evaluar a lo largo del tiempo la cantidad de flujo en este área, lo que nos permitió comparar cómo evolucionó la perfusión de las extremidades traseras de

nuestras tres líneas de ratones. Como control, se utilizó el flujo a través de la extremidad contralateral, no isquémica.

Los ratones se mantuvieron rasurados durante los 28 días que duró el experimento. Para la medida del flujo, los ratones fueron anestesiados con isoflurano 1,5—2%, para que la profundidad de la anestesia no fuese muy alta, dado que ésta deprime el flujo sanguíneo. Los ratones se colocaron en decúbito prono. Se tomaron medidas basales de flujo el día antes de practicar la cirugía, y medidas sucesivas los días 1, 3, 5, 7, 14, 21 y 28 tras la isquemia. Para cada medida, se hicieron sucesivos barridos hasta que se consiguieron resultados constantes y estables.

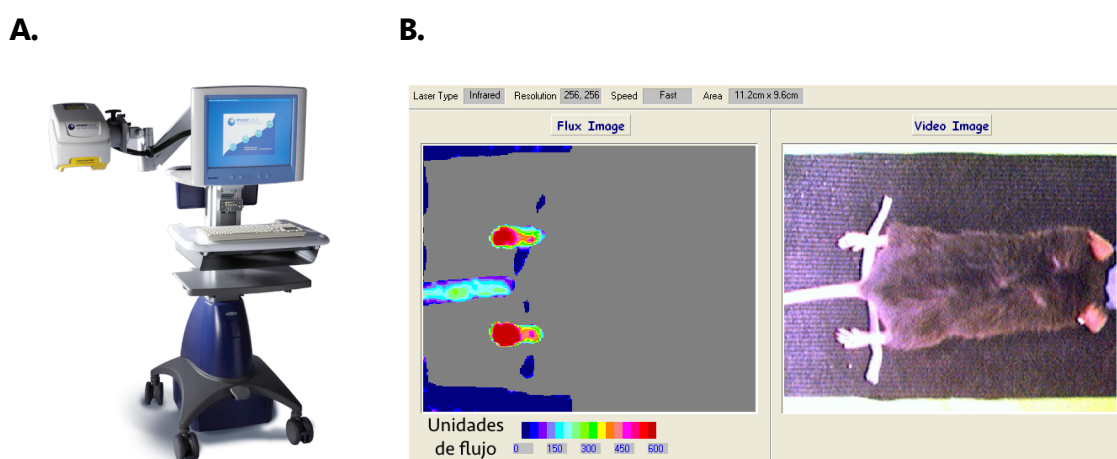


Figura 16. Sistema de adquisición de imágenes de flujo sanguíneo

A. Equipo *Laser Doppler Moor LDLS*. B. *Software* acoplado al láser. Ejemplo de una adquisición y código de colores de unidades de flujo arbitrarias.

Es importante calibrar la distancia entre el animal y el lector láser, que, de manera recomendable, debe situarse entre 10 y 20 cm, y que en nuestro caso fue de 10 cm. Así mismo, es importante hacer los experimentos en una habitación con condiciones de iluminación, temperatura y humedad controladas, puesto que variaciones en estos parámetros pueden afectar a la lectura. También se ha de ser cuidadoso con la posición del ratón y la profundidad de la anestesia.

Los datos se representaron como la media de 3 experimentos, cada uno constando de 3 ratones *L-ENG⁺*, 3 ratones *S-ENG⁺* y sus 3 respectivos controles, habiendo utilizado un total de 9 ratones por línea.

4. Análisis de la vascularización de la retina

En el momento del nacimiento, la retina del ratón carece de vasculatura. La vascularización de la retina tiene lugar gracias a un proceso de angiogénesis, que sucede entre el nacimiento y los 8 días postnatales (Stahl *et al*, 2010), aunque la angiogénesis se sigue produciendo a medida que crece la retina hasta la etapa adulta.

4.1. Aislamiento de retinas y estudio de la vasculatura por microscopía

Para el estudio del estado de la estructura y del proceso de formación de la vasculatura en la retina de nuestros ratones, elegimos un tiempo en el que la vasculatura de la retina se estuviese desarrollando y, por tanto, experimentando angiogénesis, que fueron los 6 días postnatales.

Un mínimo de 3 animales de cada línea genética fueron sacrificados mediante decapitación. Tras el sacrificio, se enuclearon los dos ojos con ayuda de fórceps (*F.S.T.*).

4.1.1. Preparación de las retinas para su visualización microscópica

Los ojos recogidos para su estudio microscópico se fijaron en paraformaldehído (PFA; *Sigma-Aldrich*) al 4% en PBS 2X (del inglés, *Phosphate-Buffered Saline*) durante 20-24 horas a 4°C. Después se pasaron a PBS 2X a 4°C durante, como máximo, 5 días. En este periodo se procedió a aislar la retina, mediante el protocolo descrito por Tual-Chalot (Tual-Chalot *et al*, 2013). Bajo una lupa, se seccionó el ojo en su mitad anterior y posterior. Con ayuda de fórceps de microcirugía (*F.S.T.*), se separó la retina de la coroides. Se lavó la retina con PBS 1X y se almacenó en metanol (*Sigma-Aldrich*) a -20°C.

Para el marcaje de las células de los vasos se utilizó isolectina-B4 de *Griffonia simplicifolia* (*Cultrex, Trevigen*), que se une a las células endoteliales gracias a la elevada expresión de residuos de α -D-galactosa en su membrana, con los que isolectina reacciona específicamente (Laitinen, 1987). La isolectina utilizada está conjugada con el fluoróforo isotiocianato de fluoresceína, o FITC (del inglés, *Fluorescein IsoThioCyanate*). Hicimos un marcaje de endoglin de ratón mediante inmunofluorescencia. De esta forma, tras incubar las retinas con solución de permeabilización / bloqueo (PBS, 0,3% Triton-X100 (*Sigma-Aldrich*), 5% suero de cabra (*Sigma-Aldrich*)), las incubamos con la solución mezcla de FITC-lectina y

anticuerpo primario para endoglina, a 4°C durante la noche. Se retiró esta solución, se hicieron 3 lavados en PBSTX (PBS, Triton-X100 al 0,3%) y se incubaron las retinas con anticuerpo secundario fluorescente (*Thermo Fisher Scientific*), a 4°C durante 4 horas. Los anticuerpos y las condiciones utilizadas se detallan en la **Tabla 2**. Se repitieron los 3 lavados y se montaron las retinas sobre un portaobjetos utilizando 50 μL de ProLong Gold Antifade (*Thermo Fisher Scientific*).

Tabla 2. Marcaje fluorescente de la vasculatura de la retina

| Marcaje/ Anticuerpo | Reconoce/ Epítipo | Fluoróforo | Hospedador | Dilución |
|------------------------|-----------------------|------------|------------|----------------------------|
| Isolectina-B4 | α -D-galactosa | FITC | - | 1:200 en <i>perm/block</i> |
| Primario | Endoglina murina | - | Rata | 1:100 en <i>perm/block</i> |
| Secundario | IgG de rata | Cy3 | Cabra | 1:200 en PBSTX |

Tomamos fotografías de planos focales de las preparaciones separados 2,5 μm , con una cámara acoplada a un microscopio confocal (*Leica*), utilizando los filtros rojo y verde del microscopio. Las imágenes de microscopía confocal fueron tomadas en el Servicio de Microscopía del Centro de Investigación del Cáncer (CSIC, Salamanca).

4.1.2. Análisis estructural de la vasculatura de la retina

Con las imágenes obtenidas, medimos en primer lugar el grado de progresión o longitud invadida por los vasos del plexo vascular formado. Para ello, se utilizó el *software Fiji*.

Los resultados se representaron como la media de un mínimo de doce mediciones tomadas en, al menos, tres retinas por línea de ratón.

El *software Fiji* permite además analizar la estructura tridimensional de los vasos. La herramienta “*skeletonize*” en 3D de *Fiji* convirtió el árbol vascular marcado con FITC-lectina en un esqueleto digital (**Figura 17**). Sobre este esqueleto digitalizado de las estructuras tridimensionales, el *software* dibuja y recuenta las ramificaciones y los nexos, y mide la longitud de las ramas en píxeles. Utilizamos esta aproximación en campos de 200 x 200 píxeles de cada una de las imágenes; se analizaron el máximo de campos posible para cada imagen.

Los resultados se representaron como la media de la cuantificación de un mínimo de 22 campos de, al menos, 3 retinas por cada línea de ratón.

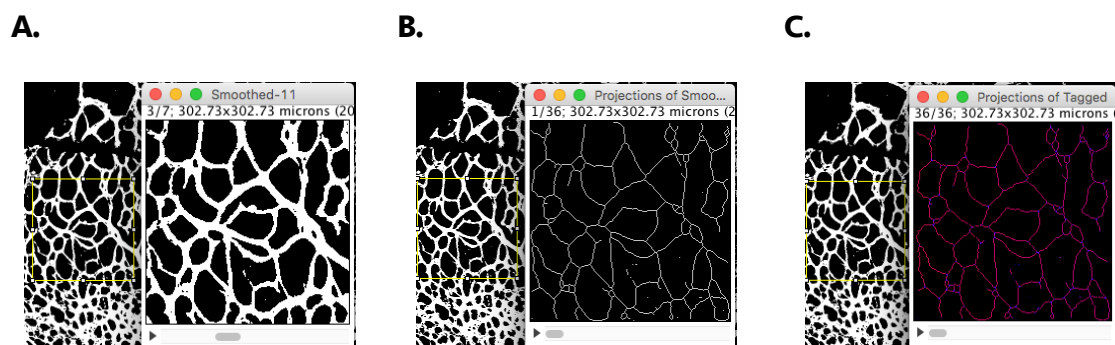


Figura 17. Herramienta de cuantificación de las estructuras vasculares en retina

A. Imagen digital 3D de 200 x 200 píxeles, obtenida a partir de una microfotografía confocal de retina. B. Esqueleto 3D obtenido con *Fiji* de ese campo. C. Análisis que el *software* hace del esqueleto: identifica nexos y ramificaciones con diferentes colores y ofrece una cuantificación de los mismos y del tamaño de cada rama analizada.

4.2. Aislamiento de retinas para el estudio de la expresión génica

En este caso utilizamos retinas de ratones de 17 días de edad, que extrajimos siguiendo el mismo protocolo. En este caso el sacrificio de los ratones se llevó a cabo mediante desplazamiento del O_2 por CO_2 .

Aislamos las retinas del modo anteriormente descrito, pero siempre en frío y utilizando material libre de ARNasas. Estas retinas fueron incubadas con el tampón de lisis de un kit comercial de columnas con membranas (NucleoSpin® RNA, *Macherey Nagel*). El protocolo se detalla más adelante, en el apartado 9.1.3.

Se obtuvo ADNc a partir de este ARN mediante un protocolo de retrotranscripción que utiliza los reactivos iScript RT Supermix (*Bio-Rad*). El protocolo se detalla en el apartado 9.2.

Analizamos la expresión de los genes de interés mediante qPCR (PCR cuantitativa) como se indica en el apartado 9.6. La relación de cebadores utilizados se detalla en la [Tabla 9](#) de estos “Materiales y métodos”.

Los datos se representaron como la media de 8 retinas procedentes de sendos 8 ratones *L-ENG⁺*, *S-ENG⁺* o controles.

5. Ensayo Directo de Angiogénesis *In Vivo* (EDAIV)

El EDAIV (en inglés DIVAA, por sus siglas, *Direct In Vivo Angiogenesis Assay*), se llevó a cabo en base a un protocolo anteriormente descrito (Guedez *et al*, 2003), con una serie de modificaciones.

Los “angiorreactores” son unos tubos de silicona que fueron elaborados aplicando un tapón de la misma silicona a un tubo de 8 mm de longitud, que queda de este modo sellado por un extremo. Estos tubos se rellenan de Matrigel® (*Corning*) y factores proangiogénicos (*R&D Systems*). Los angiorreactores, implantados en los ratones de forma subcutánea, permiten estudiar la invasión de nuevos capilares derivados de vasos del tejido circundante, que penetran en el tubo invadiendo el Matrigel® (**Figura 18A**). Permiten, portanto, estudiar la angiogénesis.

El Matrigel®, o *Matrigel Basement Membrane Matrix Phenol Red-Free*, es un polímero compuesto por proteínas de la membrana basal (laminina, colágeno IV, entactina y heparán sulfato proteoglicano) extraído de tumores Engelbreth-Holm-Swarm. Presenta la característica de que polimeriza adquiriendo una textura de gel a partir de 22°C, pero es líquido a 4°C. Por tanto, siempre se trabajó en frío para mantenerlo líquido, hasta el momento en que queramos inducir su polimerización.

5.1. Elaboración, implantación y extracción de los angiorreactores

Una vez construidos los angiorreactores, los esterilizamos en cámara de óxido de etileno. Quisimos mantener todo lo posible la esterilidad para evitar infecciones y otro tipo de reacciones en el ratón que pudiesen interferir con el proceso en estudio. Tras su esterilización, estos angiorreactores fueron rellenos con 25 μL de Matrigel®, suplementado con 3 $\text{ng}/\mu\text{L}$ de VEGF y 9 $\text{ng}/\mu\text{L}$ de bFGF de procedencia murina (*R&D Systems*), y con 2 $\text{ng}/\mu\text{L}$ de heparina bovina (*Sigma Aldrich*). Esta mezcla la preparamos en frío y bajo campana de flujo laminar.

Para la posterior polimerización del Matrigel®, introdujimos cada angiorreactor en posición invertida en un tubo *ependorf*, para evitar que se forme menisco en la mezcla. Introducimos los tubos en un incubador a 37°C durante 1 hora, tras lo que procedimos a implantarlos.

Los ratones, cuyo lomo fue previamente afeitado, fueron anestesiados con isoflurano al 2%, tras lo que se les practicaron dos incisiones en la piel, en la zona dorsal-lateral,

aproximadamente 1 cm por encima de la cadera. Se abrió hueco bajo la piel con ayuda de un trócar (*F.S.T.*). A través de la incisión, se implantaron subcutáneamente dos angiorreactores, uno a cada lado del lomo del ratón.

Nueve días después de la implantación, los animales se sacrificaron con CO_2 y los angiorreactores fueron extraídos, fotografiados y procesados para su análisis. En la **Figura 18B** se muestran una serie de angiorreactores tras su extracción al noveno día.

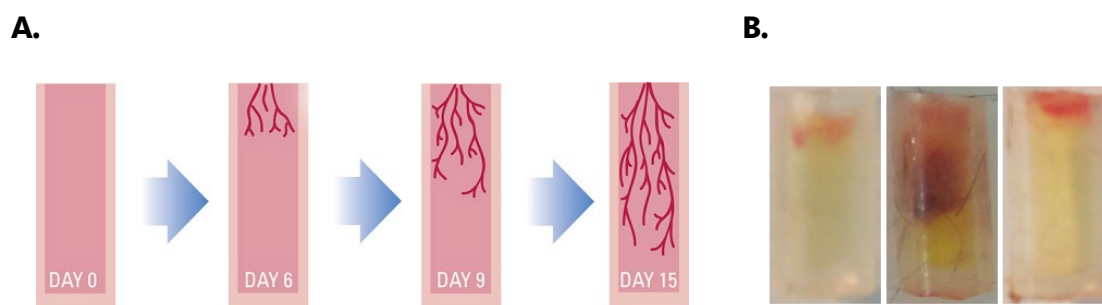


Figura 18. Ensayo Directo de Angiogénesis *In Vivo*

A. Representación gráfica de lo que sucede dentro de los angiorreactores implantados subcutáneamente. B. Angiorreactores extraídos tras 9 días de implantación bajo la piel de nuestros ratones.

La principal ventaja de esta técnica es que es más reproducible que técnicas similares utilizadas anteriormente en las que no se emplea tubo de silicona, puesto que el tubo delimita un volumen estable de Matrigel®, que mantiene su estructura y es igual en todos los casos. Además direcciona el crecimiento de los vasos al tener una única vía de acceso. Cabe señalar también que el volumen de Matrigel® y factores proangiogénicos necesarios es mucho menor que cuando se inyecta directamente esta mezcla sin utilizar los tubos de silicona.

5.2. Distancia invadida por vasos en los angiorreactores

En los angiorreactores se puede observar hasta dónde ha llegado la formación de vasos sanguíneos funcionales gracias a la invasión de los mismos por sangre.

Tomamos fotos de los tubos nada más extraerlos y cuantificamos la distancia invadida gracias al *software Fiji*.

Los datos se representaron como la distancia invadida promedio, en milímetros. Se analizaron al menos 16 tubos procedentes de, al menos, 10 ratones diferentes.

5.3. Cuantificación de la invasión endotelial

Para la cuantificación de la invasión de células endoteliales en el interior de los angiorreactores, se extrajo su contenido y se digirió el Matrigel® con dispasa (*Corning*). El producto de la digestión fue marcado con isolectina-B4 conjugada con FITC.

Por lo tanto, determinando la fluorescencia de cada muestra mediante un lector de placas (*Thermo*), se puede estimar la cantidad de lectina y, así, de células endoteliales presentes en el tubo. Para ello, se utilizaron los filtros ópticos que más se aproximaban a los parámetros de absorción/emisión del FITC, esto es, 485 nm de excitación y 510 nm de emisión.

Los datos se representaron como la fluorescencia media de 4 experimentos, cada uno constando de 2 o 3 ratones *L-ENG^t*, 2 o 3 ratones *S-ENG^t* y 2 ratones controles, habiendo analizado un total de 8 a 10 ratones por condición, y 2 angiorreactores por ratón.

5.4. Preparación e implantación de *plugs* de Matrigel®

Alternativamente, para el análisis de la expresión génica por qPCR, el EDAIV fue modificado para poder obtener mayor cantidad de tejido y poder así extraer ARN. Para ello, en lugar de utilizar angiorreactores, se inyectó Matrigel® mezclado con factores proangiogénicos directamente bajo el lomo del ratón, lo que comúnmente se denominan *plugs* subcutáneos. Este protocolo fue adaptado a partir del anteriormente descrito por Passaniti (Passaniti *et al*, 1992).

En este caso, y basándonos en la bibliografía, utilizamos menor concentración de factores proangiogénicos. Concretamente, para cada *plug*, mezclamos 250 μL de Matrigel®, suplementado con 1 ng/ μL de VEGF, 1 ng/ μL de bFGF y 1 ng/ μL de heparina bovina. Esto se debe a que, al no tener una única vía de acceso o contacto entre el contenido del tubo y el tejido circundante, como es el caso de los angiorreactores, los vasos de este tejido van a tener una mayor superficie de contacto directo con la mezcla y, por tanto, con las citoquinas proangiogénicas. La invasión será masiva y aleatoria, pero permitirá disponer de una mayor cantidad de tejido de la que extraer una muestra de ARN de mayor concentración y calidad.

Una vez preparada la mezcla de cada *plug*, procedimos a inyectarlos de forma subcutánea en el lomo de ratones previamente rasurados. En todo momento los tubos con la mezcla, así como el material a utilizar, se mantuvieron en hielo. Utilizamos jeringuillas de 1 mL (*Braun*) y agujas 23 gauge. Repetimos la operación una vez más por cada ratón, de tal forma que inyectamos dos *plugs* por animal.

Transcurridos siete días, sacrificamos al animal con CO₂ y extrajimos los *plugs*. Para ello, cortamos la piel alrededor del *plug* y fuimos aislándolo cortando el tejido conjuntivo que lo une a la piel. Los almacenamos a -80°C para la posterior extracción de ARN.

5.5. Análisis de la expresión génica de las células de los *plugs*

Para profundizar en el estudio del proceso de angiogénesis que tiene lugar en este modelo experimental, estudiamos la expresión génica de las células del *plug*, es decir, de los vasos sanguíneos del mismo.

Pulverizamos el *plug* en frío –sobre hielo seco– y homogenizamos y digerimos del tejido pulverizado. Se adaptó el protocolo de extracción de ARN para su uso en tejidos fibrosos o ricos en matriz extracelular; como etapa adicional, al homogenizado le añadimos proteinasa K para ayudar a digerir la mezcla proteica del Matrigel®. El protocolo se detalla más adelante, en el apartado 9.1.2.

Se obtuvo ADNc a partir de este ARN mediante un protocolo de retrotranscripción, siguiendo el protocolo que se detalla más adelante (apartado 9.2).

Fue necesaria una preamplificación del ADNc antes de la reacción de PCR, puesto que los niveles de expresión eran más bajos de lo que nuestro equipo era capaz de detectar con precisión. Igualmente, el proceso de preamplificación se detalla más adelante (apartado 9.3).

Finalmente procedimos a analizar la expresión de los genes de interés mediante qPCR, como se indica en el apartado 9.6. La relación de cebadores utilizados (*Bio-Rad*) se detallan en el apartado 9.4 (Tabla 8).

Los datos se representaron como la media de 2 experimentos, constandingo cada uno de 3 ratones *L-ENG*⁺, 3 ratones *S-ENG*⁺ y sus 3 respectivos controles, habiendo analizado un total de 6 ratones por condición, y 2 *plugs* por ratón.

6. Ensayo de *sprouting* a partir de anillos de aorta

El ensayo de *sprouting* a partir de anillos de aorta es una técnica *ex vivo* que permite reproducir este proceso *in vitro* facilitando así su análisis. Consiste en la siembra de fragmentos de arteria aorta de ratón embebidos en Matrigel® y cultivados en un medio rico en factores proangiogénicos (Baker *et al*, 2012).

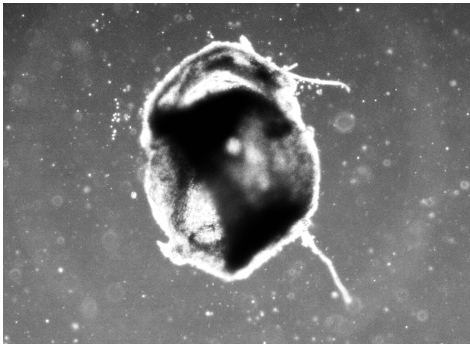
El único método de eutanasia que no afecta al endotelio vascular es la dislocación cervical. Para la obtención de los anillos, se sacrificó a los animales mediante esta técnica, tras lo que se abrió la caja torácica, se retiraron los pulmones y se procedió a la disección de la arteria aorta torácica con la ayuda de unos fórceps de microcirugía. Se aisló el mayor tramo de arteria posible y, tras cortar en ambos extremos, este fragmento de arteria se pasó a medio de cultivo de lavado frío, Ham's F-12 (*Thermo Fisher Scientific*). Bajo una lupa, procedimos a limpiar la aorta, estirada sobre un soporte de parafina. Retiramos el tejido conjuntivo y lavamos el interior de la arteria inyectando medio de lavado con ayuda de una jeringuilla de 1 mL con aguja 25 gauges. Finalmente cortamos anillos de aproximadamente 1 mm de grosor con ayuda de unas tijeras de microcirugía (*F.S.T.*).

Bajo campana de flujo laminar, pasamos los anillos de aorta a una placa de 35 mm con medio de cultivo DMEM (*Dulbecco Modified Eagle Medium, Thermo Fisher Scientific*), con 4,5 g/L de glucosa, suplementado con 50 U/mL de penicilina-estreptomicina (*Thermo Fisher Scientific*). Mantuvimos los anillos en este medio durante 12-16 horas. Transcurrido este tiempo, los sembramos embebidos en Matrigel®. Para ello, en condiciones de esterilidad, colocamos una gota de 30 μ L de Matrigel® frío en el soporte necesario en cada caso – bien placas de 12 pocillos o bien portaobjetos para microscopía – y, con ayuda de unas pinzas de microcirugía, colocamos un anillo en el seno de la gota. Una vez colocados todos los anillos de la placa o el portaobjetos, se incubó durante 30 minutos a 37°C para permitir la polimerización del Matrigel®. Finalmente, se añadió medio de cultivo, Advanced-DMEM F-12 (*Thermo Fisher Scientific*), con 3 g/L de glucosa, suplementado con 50 U/mL de penicilina-estreptomicina, glutamina 2 mM (*Sigma-Aldrich*), 30 μ g/mL de ECGS (del inglés, *Endothelial Cell Growth Supplement; Generon*), 100 μ g/mL heparina bovina (*Sigma-Aldrich*) y 20% de suero bovino fetal (FBS, del inglés, *Foetal Bovine Serum; Thermo Fisher Scientific*). Los anillos se mantuvieron en un incubador en atmósfera húmeda, a 37°C con CO₂ al 5%.

El crecimiento de *sprouts* a partir del endotelio de los anillos comienza a ser visible a partir del día 2,5 tras la siembra. La abundancia de estímulos angiogénicos favorece la formación de numerosos *sprouts*, pero ésta tiene lugar de forma aleatoria y desorganizada. A partir de los 6–

7 días los *sprouts* comienzan a degenerar, por lo que nuestros experimentos se realizaron en el día 5 de crecimiento. A continuación, se muestran un anillo recién sembrado (Figura 19A) y uno en el último día de experimento (Figura 19B), tomadas con una cámara acoplada a un microscopio de contraste de fases (Nikon).

A.



B.

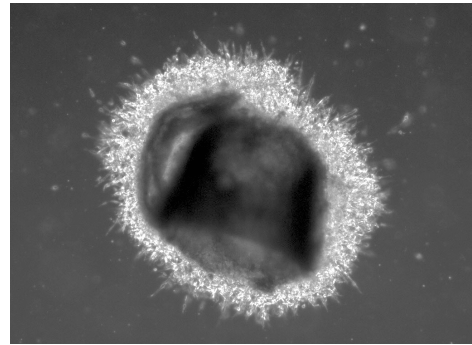


Figura 19. Anillos de aorta en Matrigel®

A. Microfotografía de un anillo de aorta recién sembrado en el Matrigel®. B. Microfotografía de un anillo de aorta 5 días después de haber sido sembrado.

6.1. Iniciación del *sprouting*

Transcurridos 2,5 días tras la siembra de los anillos, observamos que el proceso de *sprouting* ya se había iniciado y que podíamos observar células *tip* (Figura 20A) o incluso algunos pequeños *sprouts* primigenios (Figura 20B).

Con la ayuda de un microscopio de contraste de fases (Nikon) hicimos un recuento en todos nuestros anillos del número de *tips* y de *sprouts*. Asignamos el valor 1 a cada *tip* y el valor 2 a cada *sprout* de cada anillo y, sumando estos valores, obtuvimos para cada anillo un valor que denominamos “tasa de *sprouting*”.

Los datos se representaron como la media de 6 experimentos, cada uno constando de 8 anillos por ratón, procedentes de un ratón *L-ENG⁺*, un ratón *S-ENG⁺* y un ratón control, habiendo analizado un total de 6 ratones por condición.

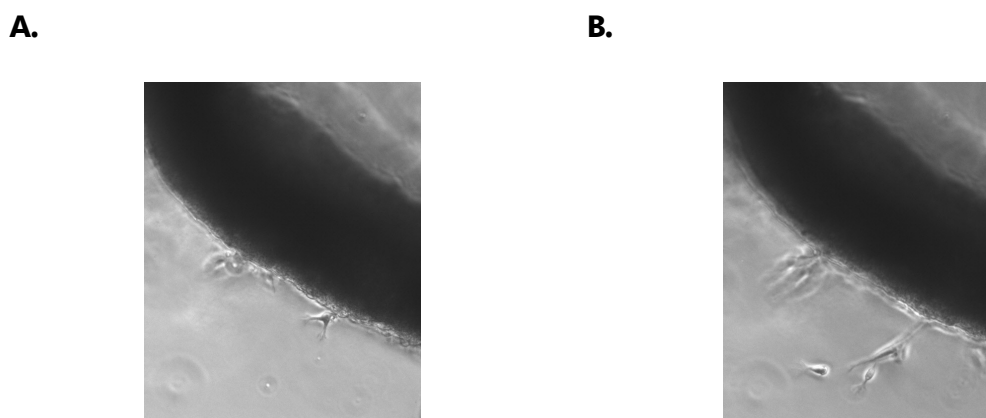


Figura 20. Iniciación del *sprouting* en anillos de aorta en Matrigel®

A. Microfotografía de una célula *tip*. B. Microfotografía de un pequeño *sprout* generado a partir de la célula *tip* en A.

6.2. Análisis del volumen ocupado por *sprouts* con microscopía confocal

Numerosos estudios que utilizan la técnica de los anillos de aorta en la bibliografía toman una fotografía de cada anillo con microscopio de contraste de fases, similares a las que se muestran en la [Figura 19B](#), y cuantifican el área ocupada por los *sprouts* para analizar las imágenes. Pero estos *sprouts* forman un conjunto tridimensional y estructuralmente heterogéneo, por lo que concluimos que el análisis del volumen ocupado era más adecuado que el del área.

Para estudiar el volumen invadido por los *sprouts* que se forman a partir de las aortas de nuestras tres líneas de ratones, los sembramos en portaobjetos *MillicellEZ slide* de 8 pocillos (*Millipore*). Utilizamos calceína-AM (*Sigma-Aldrich*), colorante vital fluorescente, para marcar las células que forman los *sprouts*. Una vez teñidas, en fresco, adquirimos imágenes de microscopía confocal de cada anillo, tomando imágenes de planos focales separados entre sí 5 μm , para reconstruir una imagen tridimensional del mismo. A continuación se muestra una imagen de un plano cualquiera ([Figura 21A](#)) y la proyección máxima de todos los planos ([Figura 21B](#)).

Las imágenes de microscopía confocal de fueron tomadas en el Servicio de Microscopía del Centro de Investigación del Cáncer (CSIC, Salamanca).

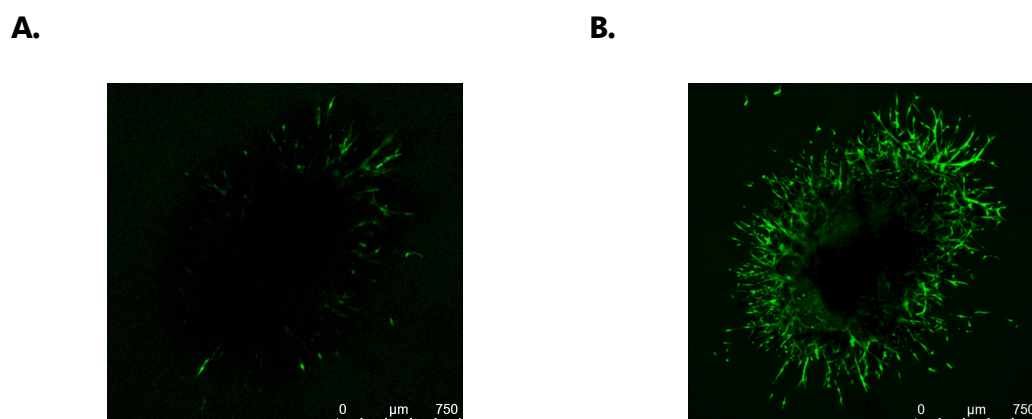


Figura 21. Imágenes de microscopía confocal de anillos de aorta en Matrigel®

A. Microfotografía de un plano focal de los *sprouts* formados a partir de un anillo de aorta. B. Proyección máxima de todos los planos focales del anillo de aorta en A.

Se cuantificó el área invadido por *sprouts* en cada plano focal o *stack* con ayuda del *software Fiji*. La suma del área cuantificada en cada plano de un mismo anillo se expresó como el volumen ocupado por los *sprouts* de ese anillo.

Los datos se representaron como la media de 5 experimentos, cada uno constando de entre 4 y 6 anillos por ratón, procedentes de un ratón *L-ENG⁺*, un ratón *S-ENG⁺* y un ratón control, habiendo analizado un total de 5 ratones por condición.

6.3. Análisis de la expresión génica de los *sprouts*

Para profundizar en el estudio del proceso de angiogénesis que tiene lugar en este modelo experimental, estudiamos la expresión génica de las células de los *sprouts*.

Para ello, extrajimos el ARNm utilizando el protocolo que se detalla más adelante (apartado 9.1.2.). Bajo una lupa, retiramos el anillo con ayuda de unos fórceps de microcirugía. Recogimos el volumen de Matrigel® con los *sprouts*, y lo mezclamos con el tampón de lisis de kit. Como en el caso de los *plugs*, se adaptó el protocolo para su uso en tejidos fibrosos, por lo que añadimos proteinasa K al homogenizado para ayudar a digerir la mezcla proteica del Matrigel®.

Se obtuvo ADNc a partir de este ARN mediante un protocolo de retrotranscripción que se detalla más adelante (apartado 9.2).

Al igual que con los *plugs*, fue necesaria una preamplificación del ADNc antes de la reacción de PCR. El proceso de preamplificación se detalla más adelante (apartado 9.3).

Finalmente procedimos a analizar la expresión de los genes de interés (Tabla 8) mediante qPCR, como se indica en los apartados 9.4 y 9.6.

Los datos se representaron como la media de 2 experimentos, constando cada uno de 3 ratones *L-ENG^t*, 3 ratones *S-ENG^t* y sus 3 respectivos controles, habiendo analizado un total de 6 ratones por condición, y 12 anillos por ratón, que agrupamos en 2 muestras.

7. Métodos de cultivo celular

Todas las manipulaciones con cultivos celulares se realizaron en campana de flujo laminar vertical (*Flow Laboratories*) y utilizando material estéril. Los cultivos se mantuvieron en un incubador (*Thermo Fisher Scientific*) en atmósfera húmeda, a 37°C con CO₂ al 5%. Las microfotografías de células en cultivo se tomaron con una cámara acoplada a un microscopio invertido de contraste de fases (*Nikon*).

7.1. Cultivo primario de células endoteliales de pulmón de ratón (MLEC)

En primer lugar, quisimos analizar diversos aspectos de la biología y la fisiología celular del endotelio de nuestros ratones, que pudiesen explicar los efectos de la sobreexpresión de las isoformas de endoglin que observamos *in vivo*.

Para ello, se obtuvieron cultivos primarios de células endoteliales de pulmón de ratón (MLEC, del inglés, *Mouse Lung Endothelial Cells*), a partir de los ratones *WT*, *L-ENG^t* y *S-ENG^t*. Se siguió el método descrito anteriormente (Oblander *et al*, 2005), con una serie de modificaciones.

El pulmón es un tejido altamente vascularizado, con una amplia microvasculatura, que va a permitir obtener un alto rendimiento del cultivo y va a aportar células con un elevado potencial angiogénico.

7.1.1. Cultivo de las células pulmonares

Se practicó la dislocación cervical a 3 animales de cada línea genética, tras lo que se abrió la caja torácica y se extrajeron los pulmones, que se pasaron a medio de cultivo de lavado, Ham's

F-12, estéril y frío. Ya en campana de flujo laminar, se procedió a la limpieza de los pulmones y retirada de tejido conjuntivo y coágulos sanguíneos. Los pulmones se trituraron con dos bisturíes durante 1 minuto, tras lo que se pasó el tejido triturado a una solución de colagenasa-ADNasa (*Sigma-Aldrich*). Se llevó a cabo la digestión a 37°C durante 1 hora, en agitación. Pasada esta hora, se pasó la digestión dos veces por una aguja 19 gauges, acoplada a una jeringa de 20 mL (*Braun*). La solución se filtró a través de un *cell strainer* de 70 μm de tamaño de poro (*Beckton Dickinson*). El filtrado se centrifugó a 300 x g durante 5 minutos, y el pellet de células se resuspendió en el “medio de cultivo MLEC”, Advanced-DMEM F-12, con 3 g/L de glucosa, suplementado con 50 U/mL de penicilina–estreptomicina, glutamina 2 mM, 30 $\mu\text{g/mL}$ de ECGS, 100 $\mu\text{g/mL}$ heparina bovina y FBS al 20%. La suspensión celular se sembró en placas de 100 mm de diámetro con cobertura matricial (Figura 22A).

La suspensión de células obtenida está compuesta principalmente por, además de células endoteliales, fibroblastos, macrófagos y eritrocitos.

Las MLEC siempre se siembran en placas con una cobertura compuesta por gelatina 0,1%, suplementada con fibronectina (*Sigma-Aldrich*) y colágeno (*Corning*). Se trata de un tipo celular que no se adhiere al plástico, por lo que se necesita esta cobertura que emula la MEC.

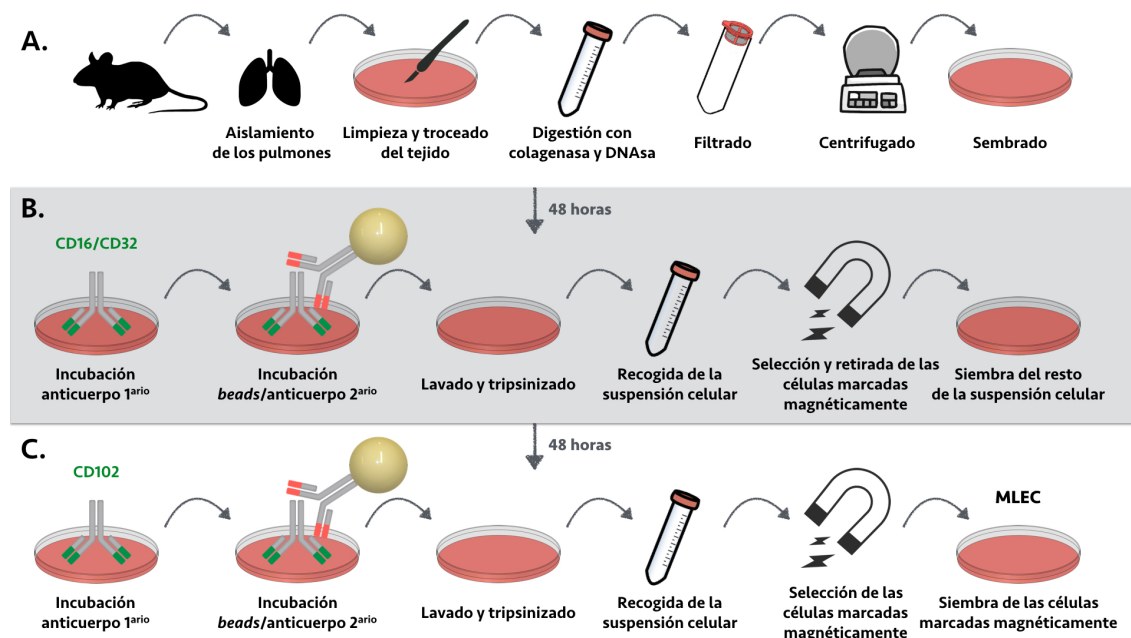


Figura 22. Esquema del protocolo de cultivo de MLEC

A. Aislamiento de las células pulmonares. B. Selección y retirada de los macrófagos. C. Selección y siembra de las MLEC. Adaptado de Oblander *et al*, 2005.

7.1.2. Retirada de eritrocitos y macrófagos

Pasadas 48 horas de la obtención y siembra de nuestro cultivo inicial, procedimos a realizar la selección y retirada de eritrocitos y macrófagos del mismo. Los eritrocitos se encuentran en suspensión, por lo que los eliminamos con la simple retirada del medio de cultivo. Los macrófagos son muy abundantes en el cultivo inicial, lo que puede dificultar el crecimiento de las células adherentes, entre las que se encuentran las MLEC. Además, al final llevaremos a cabo una selección específica de las células endoteliales, utilizando para ello un anticuerpo que reconoce el antígeno CD102 (ICAM-2), que también es expresado por los monocitos y los macrófagos, por lo que interesa antes deshacerse de ellos.

Por ello, en primer lugar, se incubaron las placas con una solución de anticuerpo que reconoce el receptor CD16/CD32. Tras lavar el anticuerpo primario, se incubaron las células con una solución de bolas o *beads* magnéticas recubiertas de anticuerpo secundario. Las condiciones se detallan en la [Tabla 3](#). Se lavó el anticuerpo secundario y se tripsinizaron las células (proceso explicado en el apartado 7.3.1.). La suspensión de células se pasó a un tubo de 15 mL (*Corning*) colocado en un imán (*Thermo Fisher Scientific*). De esta forma, los macrófagos quedaron magnéticamente adheridos a la pared del tubo. Recogimos la suspensión celular libre de macrófagos evitando tocar la pared del tubo con la pipeta. Sembramos la suspensión de células en una placa de 100 mm de diámetro con cobertura ([Figura 22B](#)).

7.1.3. Selección de células endoteliales

Pasadas 48 horas de la retirada de macrófagos, procedimos a realizar la selección y siembra de las células endoteliales, con las que después trabajamos.

Para ello, en primer lugar, se incubaron las placas con una solución de anticuerpo que reconoce el antígeno CD102. Tras lavar el anticuerpo primario, se incubaron las células con la misma solución de *beads* magnéticas recubiertas de anticuerpo secundario que se había utilizado para la retirada de macrófagos. Se lavó el anticuerpo secundario, se tripsinizaron las células y se pasó la suspensión a un tubo de 15 mL colocado en un imán, igual que anteriormente. En este caso fueron las células endoteliales las que quedaron adheridas a la pared del tubo. Retiramos la suspensión celular con todas las células excepto las endoteliales, evitando tocar la pared del tubo con la pipeta. Resuspendimos las células de la pared del tubo en “medio de cultivo MLEC”. Sembramos la suspensión de células en una placa de 60 mm de diámetro con cobertura ([Figura 22C](#)). Se consideró que las células sembradas tras este paso del protocolo se encontraban en fase 0.

Tabla 3. Anticuerpos para la obtención del cultivo primario de MLEC

| Epítipo | Hospedador | Dilución | Anticuerpo secundario |
|-------------|------------|--------------|--|
| CD16 / CD32 | Rata | 1:150 en PBS | Beads magnéticas oveja anti-IgG de rata 1:60 en Advanced DMEM F-12, con FBS al 20%. |
| CD102 | Rata | 1:300 en PBS | Beads magnéticas oveja anti-IgG de rata 1:300 en Advanced DMEM F-12, con FBS al 20%. |

7.1.4 Mantenimiento de las MLEC

Estas células crecen formando colonias, y presentan el aspecto típico de adoquinado de las células endoteliales en cultivo. En la [Figura 23A](#) se pueden ver estas células, así como algunas *beads* magnéticas que aún conservan unidas.

Se hicieron pases 1:2 cada 48 horas, como se indica en el apartado 7.3.1., sembrándolas siempre en placas de 60 mm con cobertura. En todo momento se utilizó el “medio MLEC” indicado.

Se trabajó con células entre pases 3 y 6. No es hasta pase 3 cuando conseguimos una cantidad de células adecuada. Tras el pase 6, las MLEC comienzan a perder sus características.

7.2. Línea de células endoteliales EA.hy926

Nos servimos además de una línea de células endoteliales establecida, que nos ayudó a confirmar y ampliar los estudios sobre el efecto de la sobreexpresión de las isoformas de endoglinina en la biología celular.

La línea celular endotelial EA.hy926 *wild type* fue adquirida en ATCC. Estas células se generaron a partir del cultivo primario de células umbilicales humanas, al fusionarlas con un clon de células A549 tioguanina-resistentes mediante exposición a polietilenglicol. Los clones híbridos se seleccionaron en medio HAT, y fueron testados para factor antigénico VIII.

7.2.1. Mantenimiento de las EA.hy926

Para mantener estas células se utilizó medio de cultivo DMEM, con 4,5 g/L de glucosa, suplementado con 50 U/mL de penicilina–estreptomina y enriquecido con FBS al 10%. El medio de cultivo se cambió cada 48 horas. Cuando las células estaban confluentes, se hicieron pases en dilución 1:5 o 1:10. En la [Figura 23B](#) se pueden ver estas células creciendo en cultivo.

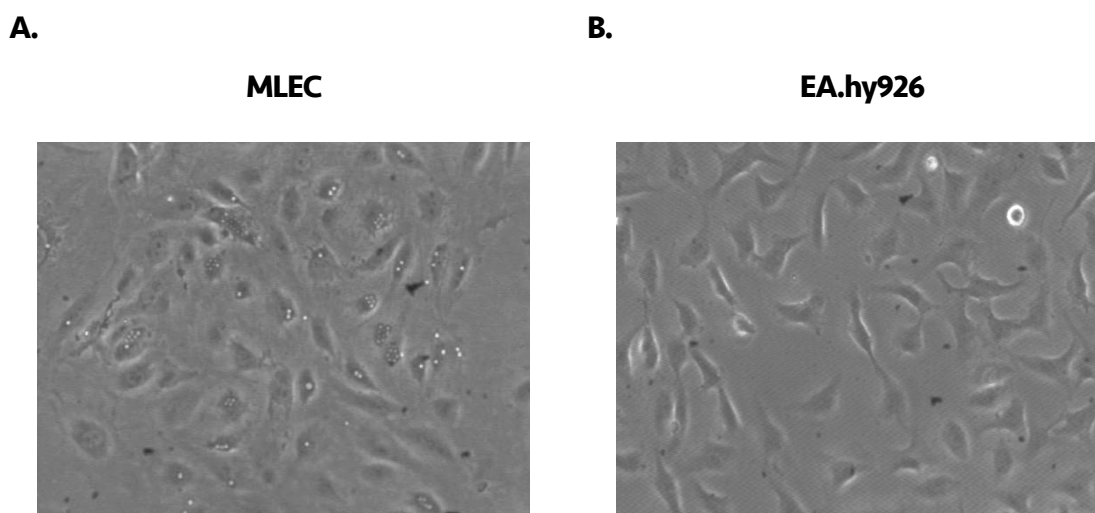


Figura 23. Células utilizadas para este trabajo, creciendo en cultivo

A. Microfotografía de las MLEC creciendo en medio de cultivo Advanced-DMEM F-12. B. Microfotografía de las células EA.hy926 creciendo en medio de cultivo DMEM. Imágenes tomadas con un microscopio óptico de contraste de fases (20 aumentos).

7.3. Técnicas básicas en cultivos celulares

7.3.1. Tripsinización celular

Las células endoteliales son adherentes, por lo que para su mantenimiento se transfirieron al material de trabajo adecuado (placas Petri, cubreobjetos, etc).

Se utilizó la técnica de la tripsinización celular para levantar las células adheridas y volverlas a sembrar en otro soporte. Después de retirar el medio y lavar con PBS, se añadió tripsina-EDTA (tripsina 0,25%, EDTA 0,02%; *Thermo Fisher Scientific*) para romper los enlaces de cationes bivalentes que unen las células a la superficie de la placa, o a la cobertura de gelatina en su caso. La acción de la tripsina se detuvo aproximadamente a los 3 minutos con medio de cultivo y a continuación las células se transfirieron a un tubo. La suspensión celular se centrifugó

a 600 x g durante 3 minutos. El precipitado se resuspendió en la cantidad adecuada de medio de cultivo, dependiendo de su posterior utilización.

Si el experimento lo requería, en este punto se procedió al recuento celular.

7.3.2. Recuento celular

Después de tripsinizar las células, una muestra de la suspensión celular se mezcló en proporción 1:1 con azul de trypan, que es capaz de penetrar a través de la membrana de células muertas o dañadas, pero no de células vivas, que se observan refringentes sobre el fondo azul del medio. A continuación, 10 μ L de esta mezcla se depositaron en una cámara de contaje y se introdujo en el contador electrónico *Countess® Automated Cell Counter (Thermo Fisher Scientific)*. Este contador es capaz de discriminar las células viables de las no viables, ofreciendo estos valores en número de células por mililitro. El recuento se hizo siempre por duplicado.

7.3.3. Congelación y descongelación de las líneas celulares

Para el mantenimiento de las líneas celulares, tanto las MLEC como las células EA.hy926 se congelaron en distintos pases. En el caso de las MLEC, se congelaron células en pases entre 2 y 5, para poder posteriormente utilizarlas.

Para congelar las células, en primer lugar, se tripsinizaron de la forma explicada anteriormente. Las células se resuspendieron en 2 mL de medio frío con FBS al 50% y DMSO al 10%. Para cada línea se utilizó su medio de cultivo específico. La suspensión celular resultante se pasó a un vial de crioconservación (*Thermo Fisher Scientific*) que se almacenó dentro de un recipiente relleno de isopropanol, en el que la temperatura va disminuyendo lenta y gradualmente siguiendo un gradiente de 1°C por minuto cuando se introduce en un ultracongelador a -80°C. Después de 24 horas, las células se almacenaron en un tanque de nitrógeno líquido.

En el caso de las MLEC, para tener células suficientes, congelamos 2 placas de 60 mm llenas en un criovial. Para las EA.hy926 se congelaron entre $7,5 \times 10^5$ y 10^6 células por criovial.

Para su descongelación, se introdujeron los viales en un baño de agua a 37°C y, una vez descongelados, se transfirió rápidamente el contenido a 10 mL del medio de cultivo específico de cada línea celular. Se centrifugó la suspensión celular a 600 x g durante 3 minutos. El precipitado se resuspendió en la cantidad adecuada de medio de cultivo y se sembraron las células en una placa de cultivo.

7.3.4 Generación de clones estables de EA.hy926

Para la realización de este trabajo, las células de la línea EA.hy926 fueron infectadas con un vector portador del gen de endoglina larga o corta (células *L-ENG^t* o *S-ENG^t* respectivamente), o bien con el vector vacío (células *Mock*). El vector ha sido anteriormente descrito en el apartado 2 de “Materiales y métodos”. La infección la llevó a cabo la Dra. Elena Llano (Centro de Investigación del Cáncer, CSIC, Salamanca).

Según el protocolo aportado, se transfectó la línea celular 293T con el vector retroviral portador del gen de endoglina ya descrito –bien L-endoglina, bien S-endoglina o bien el vector vacío–, y el pCL-Ampho *Retrovirus Packaging Vector*. Se trata de una línea celular portadora de los genes virales en su genoma, por lo que se le denomina “empaquetadora de virus que, en nuestro caso, serán portadores del gen de L-endoglina o S-endoglina en cada caso. A las 48 horas, se recogió el medio de cultivo rico en partículas víricas (primer sobrenadante), se pasó por un filtro de 0,45 μm (*Millipore*), se centrifugó a 8.000 $\times g$ durante 8 minutos y se suplementó con 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de polibrene (*Sigma-Aldrich*). Además, se recogió un segundo sobrenadante 8 horas más tarde. Para la infección, se incubaron 8×10^5 células EA.hy926 *WT* con el primer sobrenadante durante 8 horas a 37°C. El proceso se repitió con el segundo sobrenadante. La selección de las células infectadas se llevó a cabo a las 24 horas mediante el tratamiento con 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de puromicina durante 3 días.

7.4 Ensayos de proliferación celular

7.4.1 Recuento directo del número de células

Esta técnica requiere un elevado número de células, por lo que sólo se llevó a cabo con la línea EA.hy926.

Se sembró el mismo número de células de cada una de las tres líneas, por duplicado. Uno de los duplicados se recontó a las 8 horas, cuando las células aún no han comenzado a dividirse, como control de siembra. El otro duplicado se recontó a las 72 horas.

Los datos se representaron como la media de 3 experimentos.

7.4.2 ELISA de BrdU

El ensayo de inmunoadsorción enzimática (ELISA, del inglés, *Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay*) es un método cuantitativo basado en la detección de un antígeno de

una muestra mediante anticuerpos que, directa o indirectamente, producen una reacción cuantificable espectrofotométricamente (Engvall & Perlmann, 1971).

En este trabajo, utilizamos un ELISA para medir la cantidad de BrdU (5-bromo-2-desoxiuridina) incorporada durante la síntesis del ADN en la proliferación celular (Roche), como aproximación a la tasa de proliferación de las células en cultivo.

En primer lugar, sembramos 10^3 células por pocillo, por triplicado, en placas de 96 pocillos. A las 24 horas de haber sembrado las células, las incubamos con la solución de BrdU durante 4 horas en el caso de las EA.hy926, y durante 24 horas en el caso de las MLEC, puesto que éstas proliferan más despacio. Como controles negativos, se sembraron respectivos pocillos de células de las tres líneas a las que no se les añadió la solución de BrdU. Una vez transcurrido el tiempo de incorporación de BrdU, se aspiraron los pocillos y se comenzó con el protocolo del ELISA.

Tras fijar las células con una solución de fijación / desnaturalización durante media hora, se incubaron durante 90 minutos con una solución de anticuerpo primario monoclonal conjugado con peroxidasa, que se une específicamente a la BrdU incorporada en el ADN celular. Se lavaron los pocillos 3 veces con PBS 1X y se añadió la solución sustrato, consistente en tetrametil-benzidina. Durante la primera media hora de reacción se midió la placa en un lector a una longitud de onda de 370 nm, utilizando una longitud de onda de referencia de 492 nm. La señal será tanto mayor cuanto más BrdU se haya incorporado, es decir, cuanto más se hayan dividido las células. Los datos se analizaron con el *software* acoplado al lector de ELISA, Gen5 (Bio-Tek).

Los datos se representaron como la media de 3 experimentos.

7.5. Ensayos de migración e invasión celular

7.5.1. Ensayo de cierre de herida o *scratch*

El ensayo de cierre de herida permite determinar la velocidad a la que las células migran, cuando se desplazan a través de una “herida”, “*scratch*” o región sin células en el soporte en el que están sembradas.

Se sembró un número de células EA.hy926 Mock, *L-ENG^t* y *S-ENG^t* en placas de 6 pocillos, de tal forma que al día siguiente las células de cada pocillo estuviesen confluentes, esto es, 3×10^5 células por pocillo, por duplicado. Al día siguiente, con la ayuda de una punta de

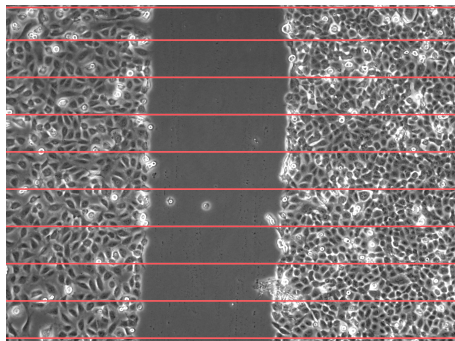
micropipeta de $2\ \mu\text{L}$, se practicaron 6 *scratches*, 3 horizontales y 3 verticales, en la monocapa de células. Se lavaron los restos celulares y se incubaron las células con medio fresco.

Con la ayuda de una cámara acoplada a un microscopio de contraste de fases, se tomaron fotos de 4 regiones por cada pocillo, cada 30 minutos durante 20 horas. Las células se mantuvieron en todo momento en una atmósfera a 37°C , y CO_2 al 5%.

Se tomaron las fotografías iniciales de cada región, y aquellas correspondientes a un tiempo en el que no se hubiese cerrado completamente ningún *scratch*, en nuestro caso, 14,5 horas. Con ayuda de una plantilla, se midió la anchura de del *scratch* inicial en 10 puntos diferentes de cada región fotografiada (Figura 24A), así como la distancia en esos mismos 10 puntos transcurrido el tiempo indicado (Figura 24B). La diferencia entre estas dos distancias se consideró la distancia migrada por las células en ese tiempo, es decir, la velocidad de migración celular.

Los datos se representaron como la media de 3 experimentos.

A.



B.

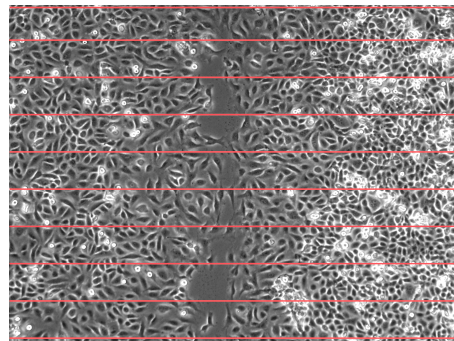


Figura 24. Ensayo de cierre de herida o *scratch*

A. Microfotografía de las células EA.hy926 confluentes a las que se les acaba de practicar el *scratch* en la monocapa. B. Misma región de células tras 14,5 horas en cultivo.

Este experimento no se pudo llevar a cabo con las MLEC porque necesitan cobertura para crecer en placa. La realización de la herida elimina la cobertura en esa región, por lo que las células no migran sobre ella.

7.5.2. Ensayo de migración a través de *transwell*

Esta técnica permite medir la capacidad de las células para migrar a través de una membrana con poros de $8\mu\text{m}$.

Se marcaron las células, bien las MLEC o bien las EA.hy926, con calceína-AM. Se sembraron 6×10^4 células en el compartimento superior del *transwell* en medio de cultivo sin FBS para las EA.hy926, y con FBS al 5% para las MLEC. El compartimento inferior se llenó con medio con FBS al 10% para las EA.hy926, y FBS al 20% para las MLEC, en ambos casos suplementado con 5 ng/mL de VEGF murino. Se generó así un gradiente de citoquinas que imita las condiciones que tienen lugar en la angiogénesis (Figura 25). Se sembró una muestra de la suspensión de cada línea celular en un pocillo como control de siembra.

Para analizar la capacidad de las células de invadir y migrar a través de la matriz extracelular, se utilizó el mismo diseño experimental pero, en este caso, se sembraron las células sobre *transwell* con $100\mu\text{L}$ de Matrigel®.

En cualquiera de los dos casos, se midió la fluorescencia del compartimento inferior a las 0, 2, 4, 6, 8, 24 y 48 horas. Gracias a la utilización de *transwell* con *FluoroBlock*TM (Corning), es decir, con la membrana porosa opaca, se pudo determinar la fluorescencia sólo de las células que habían pasado a través del *transwell* al compartimento inferior.

Los datos se representaron como la media de 3 experimentos.



Figura 25. Esquema del experimento con *transwell*

Compartimentos superior e inferior. Dependiendo del objetivo del estudio, bien invasividad o bien migración, se utilizó o no Matrigel® en el *transwell*.

7.6. Ensayo de formación de estructuras similares a capilares *in vitro*

Una característica de las células endoteliales es su capacidad para formar estructuras reticuladas bidimensionales al cultivarlas sobre una matriz, ya sea de Matrigel®, colágeno, fibrina u otros componentes poliméricos (Francescone III *et al*, 2011).

7.6.1. Siembra de las células en Matrigel® para la formación de “pseudocapilares”

Las células de la línea EA.hy926 infectadas fueron sembradas sobre 300 μL de Matrigel® polimerizado en placas de 24 pocillos, por duplicado, y se incubaron a 37°C, 5% CO₂ durante 12 horas, tiempo suficiente para la formación de pseudocapilares.

Transcurrido ese tiempo, se fotografiaron los pseudocapilares a 10 aumentos, utilizando un microscopio de contraste de fases. Se determinó el centro del pocillo, a partir del cual se tomaron las fotografías: para cada uno de ellos, se obtuvo una imagen final formada por 25 imágenes, 5 x 5, que tenían como centro el centro del pocillo. Así se obtuvo una imagen aleatoria que abarcaba la mayor parte del pocillo, y que posteriormente se analizó.

7.6.2. Análisis y cuantificación de las imágenes

Para las imágenes obtenidas, se cuantificaron la cantidad de ramificaciones y puntos de unión, así como la longitud media de las ramificaciones.

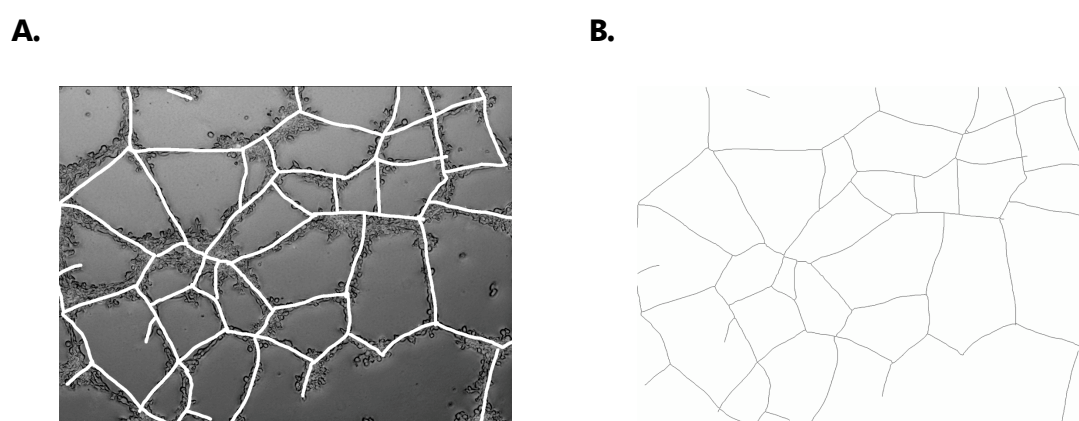


Figura 26. Análisis digital de los pseudocapilares en Matrigel®

A. Microfotografía de las células EA.hy926 formando pseudocapilares tras 12 horas en cultivo en Matrigel®. B. Imagen que ofrece el software *Fiji* tras aplicar la herramienta “skeletonize”.

Para el análisis, se utilizó el *software Fiji*. Las imágenes fueron digitalizadas, y el patrón obtenido se convirtió en un esqueleto de ramificaciones y nexos de unión gracias a la herramienta “*skeletonize*” en 2D de *Fiji* (Figura 26). Sobre este esqueleto digitalizado de las estructuras bidimensionales, el *software* dibuja y recuenta las ramificaciones y los nexos.

Los datos se representaron como la media de 3 experimentos.

7.7. Análisis de la expresión de proteínas mediante inmunofluorescencia de células en cultivo

Las células se sembraron sobre cubreobjetos de cristal estériles. Una vez alcanzada la confluencia adecuada, se lavaron con PBS 1X. A continuación, se fijaron las células con PFA al 4% (*Sigma-Aldrich*) y, tras un lavado con PBS, se acompañó el PFA con NH_4Cl 4mM para impedir su interferencia posterior. Los cubreobjetos se incubaron con solución de bloqueo, consistente en BSA al 2% (del inglés, *Bovine Serum Albumina*) y se lavaron con PBST (PBS, Tween-20 al 0,05%; *Sigma-Aldrich*). Las células se incubaron con anticuerpo primario, durante 3 horas a temperatura ambiente. Tras la incubación, se realizaron 3 lavados con PBS 1X y se incubaron 45 minutos con anticuerpo secundario fluorescente. Los anticuerpos se prepararon a la concentración indicada en la Tabla 4. Después de la incubación con el anticuerpo secundario, se lavó 3 veces con PBS 1X y se tiñeron los núcleos incubando los cubreobjetos en una solución acuosa 2 μM de Hoechst 33258 (*Thermo Fisher Scientific*) durante unos segundos. En último lugar se montaron los cubreobjetos sobre un portaobjetos utilizando 10 μL de ProLong Gold Antifade. Analizamos las preparaciones en un microscopio de contraste de fases.

Tabla 4. Condiciones inmunofluorescencia de células en cultivo

| Epítipo | Anticuerpo | Fluoróforo | Hospedador | Dilución |
|------------------|------------|-----------------|------------|-----------------------------|
| Endoglina humana | Primario | - | Ratón | Ninguna |
| IgG de ratón | Secundario | AlexaFluor® 568 | Burro | 1:300 en BSA al 0,5% en PBS |

7.8. Análisis de la expresión de proteínas mediante citometría de flujo

Las células en cultivo, tanto las MLEC como las células EA.hy926 se tripsinizaron y se resuspendieron en 100 μL de PBS/CM 1X (PBS, CaCl_2 1 mM, MgSO_4 1 mM), asegurándonos de que teníamos al menos 10^5 células.

Tras centrifugar la suspensión celular a 600 \times g durante 3 minutos, se añadió el anticuerpo frente a la proteína de interés, marcado con un fluoróforo, que viene detallado en la [Tabla 5](#). Tras 15 minutos de incubación a temperatura ambiente, se centrifugaron las células 600 \times g durante 3 minutos y se resuspendieron en PBS/CM 1X, repitiendo este procedimiento dos veces más. Finalmente se resuspendieron las células en unos 250 μL de PBS/CM 1X.

Tabla 5. Condiciones citometría de flujo

| Epítopo | Fluoróforo | Hospedador | Dilución |
|------------------|-------------------|------------|----------------|
| Endoglina humana | PE (ficoeritrina) | Ratón | 1:20 en PBS/CM |

La suspensión celular marcada se hizo pasar por un citómetro de flujo modelo FACScalibur™ (BD Biosciences), instalado en el Centro de Investigación del Cáncer (CSIC, Salamanca).

Se adquirieron 10^4 células por muestra de MLEC y 2×10^4 células por muestra de células EA.hy926. Se hizo el experimento por triplicado.

Los resultados se representan como un experimento de cada uno de los modelos celulares MLEC o EA.hy926, representando en cada uno las líneas *L-ENG^r* o *S-ENG^r* y sus respectivos controles.

8. Análisis del nivel de expresión de proteínas por *Western blot*

El método del *Western blot* (Gallagher *et al*, 2004) permite la identificación de proteínas de un extracto celular o tejido. Se basa en la separación de las proteínas de una muestra en un gel de poliacrilamida en función de su tamaño, y su posterior transferencia a una membrana. En dicha membrana son reconocidas mediante la utilización de anticuerpos específicos contra las proteínas que se desean identificar (anticuerpos primarios), y anticuerpos secundarios, que

reaccionan con los anticuerpos primarios y están conjugados con la enzima peroxidasa de rábano picante (HRP, del inglés, *HorseRadish Peroxidase*) que, al reaccionar con su sustrato, produce una reacción fácilmente detectable y proporcional a la cantidad de proteína de la muestra.

8.1. Obtención de extractos de proteínas de tejidos y células

Para la extracción de proteínas de tejido, se pulverizaron los tejidos en hielo seco y se pesaron 20-30 mg del pulverizado. Se lisó el tejido con 200 μL de tampón de lisis (Tris base 20 mM, pH 7,5; NaCl 140 mM, EDTA 50 mM, glicerol al 10% e IGEPAL CA-630 al 1%), en frío, al que se añadieron inhibidores de proteasas y fosfatasa. Se lisó la muestra con el uso de micropistilos.

Las placas con las células en cultivo se colocaron sobre hielo para ralentizar el metabolismo celular. Se lavaron con PBS 1X frío para retirar el medio de cultivo y posibles restos celulares y se lisaron con tampón de lisis frío, al que se añadieron inhibidores de proteasas y fosfatasa. Se lisó la muestra con el uso de rascadores.

En ambos casos, el lisado celular se centrifugó a $14.600 \times g$ a 4°C durante 10 minutos. Después de la centrifugación, se recogió el sobrenadante (extracto de proteínas) y las muestras se almacenaron a -20°C hasta su uso.

8.2. Determinación de la concentración de proteínas

Para la cuantificación de la concentración proteica de nuestros extractos celulares, se siguió el protocolo del kit comercial colorimétrico DCTM Protein Assay (*Bio-Rad*), basado en el método de Lowry (Lowry *et al*, 1951). Para las muestras de tejido, se hizo previamente una dilución 1:8 de la muestra en tampón de lisis. Se hizo reaccionar una muestra de cada uno de los extractos proteicos, así como de cada uno de los puntos de una recta patrón (obtenida mediante la dilución seriada de una dilución proteica de concentración conocida), con los reactivos del kit. Se midió la absorbancia del producto de reacción a 720 nm en un lector de placas de ELISA (*BioTek*). Los valores de absorbancia de las muestras problema se extrapolaron en la recta de absorbancias obtenida a partir de las diluciones seriadas, utilizando el *software* Gen5.

8.3. Preparación de las muestras y electroforesis

Se prepararon las muestras en condiciones desnaturalizantes añadiendo tampón de carga (Tris 125 mM, glicerol al 10%, SDS al 2%, β -mercaptoetanol al 1% y azul de bromofenol al 0.0005%; pH 6,8), y se hirvieron a 100°C durante 3 minutos (Laemmli, 1970).

Las proteínas se separaron mediante una electroforesis vertical en gel, o SDS-PAGE (del inglés, *Sodium Dodecyl Sulphate - PolyAcrylamide Gel Electrophoresis*), con distinto porcentaje de poliacrilamida según el tamaño de la proteína a analizar (Tris base 0,4 M, pH 8,8; APS al 0,1%, TEMED al 0,08% y acrilamida diluida al porcentaje deseado). El gel se sometió posteriormente a una electroforesis, en cubetas *Mini-PROTEAN®III* (Bio-Rad) sumergido en tampón de electroforesis (Tris 25 mM; glicina 192 mM y SDS 1,7 mM) y aplicando un voltaje constante de 130 voltios (V). En paralelo a las muestras, cargamos en el gel un marcador de proteínas de pesos moleculares conocidos (*Thermo Fisher Scientific*).

8.4. Transferencia

Las proteínas separadas e incluidas en el gel de acrilamida se transfirieron a una membrana de difluoruro de polivinilideno (PVDF; del inglés, *PolyVinylidene Fluoride*, Pall Corporation).

La transferencia se llevó a cabo mediante el método en húmedo en la cubeta *Mini PROTEAN®III*, a una intensidad de corriente constante de 400 mA durante 1 hora, en tampón de transferencia (glicina 192 mM, Tris 25 mM, pH 8,3) y en hielo.

8.5. Bloqueo e incubación con los anticuerpos

Previamente a la incubación con anticuerpos, se procedió al bloqueo de los lugares de la membrana no ocupados por proteínas. Para ello, una vez finalizada la transferencia se lavó la membrana con tampón de lavado (Tween-20 al 0.1%, NaCl 150 mM, Tris 20 mM, pH 7.5) y se incubó con tampón de bloqueo (BSA en tampón de lavado; la concentración de BSA depende de la proteína estudiada, variando entre el 1 y el 5%), durante 1 hora a temperatura ambiente (o toda la noche a 4°C), en agitación.

A continuación, se incubó la membrana con el anticuerpo primario, diluido en solución de bloqueo, durante al menos 90 minutos a temperatura ambiente (o toda la noche a 4°C), en

agitación. Las condiciones a las que se emplearon los anticuerpos se encuentran en la [Tabla 6](#). Tras la incubación con el anticuerpo primario, se hicieron 3 lavados de 5 minutos con tampón de lavado y se incubó la membrana con el correspondiente anticuerpo secundario (una inmunoglobulina, IgG, conjugada con HRP), diluido en tampón de lavado, durante 30-45 minutos, a temperatura ambiente, en agitación. Se hicieron 3 lavados de 15 minutos del anticuerpo secundario.

Tabla 6. Anticuerpos y condiciones de Western blot

| Epítipo | kDa | Anticuerpo primario | Anticuerpo secundario |
|----------------------------------|------------|----------------------------|------------------------------|
| Endoglina humana | 92 | AcP de conejo 1:1.000 | Anti-conejo 1:15.000 |
| HA tag | 92 | AcM de ratón 1:1.000 | Anti-ratón 1:15.000 |
| β-actina | 42 | AcM de ratón 1:5.000 | Anti-ratón 1:15.000 |
| Tubulina | 55 | AcM de ratón 1:1.000 | Anti-ratón 1:15.000 |

8.6. Revelado

Para la detección de la señal ofrecida por el anticuerpo secundario, se utilizó un sistema basado en la oxidación del luminol potenciada con fosfo-iodofenol.

Las membranas se incubaron durante un minuto con una solución basada en estos reactivos (Tris 0,1M, pH 9,35; luminol 2,2 mM, p-iodofenol 2,2 mM), suplementada con H₂O₂ al 0,03-0,06%. La catálisis del H₂O₂ por la HRP unida al anticuerpo secundario libera O₂, que oxida el luminol. El luminol oxidado emite luminiscencia, señal que será tanto mayor cuanto más proteína haya, puesto que unirá mayor cantidad de anticuerpo y habrá más catálisis enzimáticas en ese punto.

Inmediatamente y en la oscuridad, se impresionó la membrana en una película de autorradiografía, que quedará velada en aquellas zonas donde la membrana emita luminiscencia, tanto más cuanto mayor sea ésta.

Tras su exposición, se introdujo la película en una máquina de revelado que sumerge las películas en los líquidos de revelado, fijado y lavado, sucesivamente. Por último, la película obtenida fue digitalizada.

9. Análisis del nivel de expresión génica por qPCR

9.1. Extracción de ARN

9.1.1. Extracción de ARN de células en cultivo

Se sembraron las células en placas de 35 mm y se dejó que alcanzaran un estado de subconfluencia (aproximadamente del 90%). Cuando estuvieron listas, se empleó el kit comercial NucleoSpin®RNA II (*Macherey-Nagel*) para aislar el RNA. Las células se lisaron en el tampón RA1 del kit, suplementado con β -mercaptoetanol al 1%. El lisado se pasó por una columna de filtrado para limpiar la muestra. El eluido filtrado se pasó a una columna con una membrana que retiene ácidos nucleicos. Tras ajustar las condiciones para la unión de los ácidos nucleicos a la membrana, ésta se incubó con ADNasa recombinante, que digiere el ADN. Una vez hubo sólo ARN en la membrana, se hicieron 3 lavados con dos tampones de lavado diferentes, y se eluyó el ARN en H₂O DEPC.

El ARN obtenido se cuantificó en un espectrofotómetro Nanodrop ND-1000 (*Thermo Fisher Scientific*) y se almacenó a -80°C .

9.1.2. Extracción de ARN de *plugs* y anillos de aorta

La purificación de ARN de células contenidas en Matrigel® ofrece peor rendimiento, por lo que adaptamos el protocolo del kit anteriormente descrito añadiendo $0,2 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ de proteinasa K al lisado. Se incubó el lisado con proteinasa K durante 10 minutos a temperatura ambiente, y otros 10 minutos a 55°C . La muestra digerida se centrifugó a $10.000 \times g$ durante 3 minutos. El protocolo continuó con normalidad utilizando como muestra el sobrenadante, en el que nos hemos deshecho de las proteínas de la matriz fibrosa que constituía el Matrigel®.

Utilizamos el kit NucleoSpin® RNA II para las muestras de *plugs* y el kit NucleoSpin® RNA XS, adaptado para muestras pequeñas, para los *sprouts* de anillos de aorta. En la [Figura 27](#) se muestran las columnas de unión de ácidos nucleicos de ambos kits al detalle.

9.1.3. Extracción de ARN de retina y otros tejidos

Se empleó el mismo kit NucleoSpin® RNA II, tanto para las retinas de ratones de 17 días de edad, como para las muestras de corazón, pulmón, riñón e hígado de ratones adultos.

En este caso, al tratarse de un tejido, nos ayudamos de micropistilos para su homogenizado en el tampón de lisis del kit.

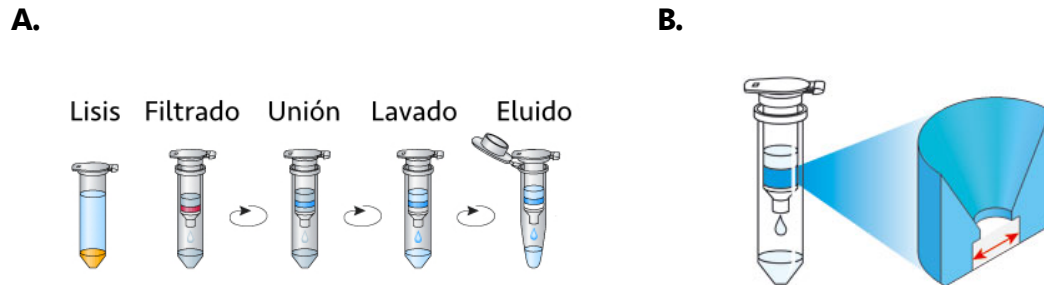


Figura 27. Kit de extracción de ARN: NucleoSpin® RNA

A. Esquema del protocolo. B. Detalle de las columnas NucleoSpin® RNA XS, con una membrana más pequeña para muestras pequeñas.

9.2. Obtención de ADNc

Para el análisis de la expresión génica necesitamos utilizar ADN como sustrato de la reacción. Las transcriptasas reversas virales, descubiertas en 1970, sintetizan ADN copia a partir de ARN (Baltimore, 1970; Temin & Mizutani, 1970), lo que permite obtener ADNc a partir del ARNm purificado de nuestras muestras (Kacian & Myers, 1976).

Con el fin de sintetizar ADNc, se diluyeron 250 ng de ARN de cada muestra con agua DEPC hasta un volumen final de 16 μL . Se añadieron 4 μL de la *iScript RT Supermix 5X* (Bio-Rad), que contiene transcriptasa reversa, dNTP, oligo(dT), *random primers*, inhibidor de RNAsas, estabilizadores de MgCl_2 y el tampón de reacción. Los 20 μL totales fueron incubados en un termociclador MyCycler (Bio-Rad) a 25°C durante 5 minutos, seguidos de 30 minutos a 42°C y 5 minutos finales a 85°C.

El ADNc obtenido se almacenó a -20°C.

9.3. Preamplificación del ADNc

En determinadas muestras, el ARN obtenido no permite obtener suficiente ADNc, por lo que nuestro equipo de qPCR no es capaz de determinar de forma precisa la expresión relativa de

un determinado gen. Fue necesario llevar a cabo un paso previo de “preamplificación”. Esto sucedió para las muestras obtenidas a partir de *plugs* y de *sprouts* anillos de aorta.

La preamplificación consiste en una reacción de PCR convencional de 10-12 ciclos, en la que no es necesario utilizar ningún compuesto de tinción del ADN –en nuestro caso *SYBR-Green*– y que rinde una mayor cantidad de ADNc que utilizar como punto de partida para la qPCR. La base de la reacción de PCR se detalla en el apartado 9.6 de estos “Materiales y métodos”.

Para la preamplificación, se preparó un *pool* de cebadores específicos para los genes de interés. Los cebadores de preamplificación utilizados, *PrimePCR Preamp Assays 2X* (*Bio-Rad*) se detallan en la [Tabla 7](#). Se utilizó la *SsoAdvanced PreAmp Supermix* (*Bio-Rad*), que contiene una ADN polimerasa de nueva generación, dNTP, sales, potenciadores de la reacción y estabilizadores. Utilizamos 9 μL de nuestra muestra de ADNc, a los que añadimos 2 μL de H_2O DEPC, 5 μL del *pool* de cebadores y 25 μL de la Supermix. Los 50 μL totales fueron incubados en un termociclador *MyCycler* (*Bio-Rad*) a 95°C durante 3 minutos, seguidos de 12 ciclos de 95°C durante 15 segundos y 58°C durante 4 minutos.

Tabla 7. Cebadores comerciales para preamplificación

| Gen diana | Referencia | Gen diana | Referencia |
|---------------|----------------|---------------|----------------|
| Eng | qMmuCED0046322 | Tek | qMmuCID0015486 |
| Pecam1 | qMmuCID0005317 | Cdh5 | qMmuCID0005343 |
| Prom1 | qMmuCED0047306 | Tjp1 | qMmuCID0005277 |
| Cd34 | qMmuCED0044193 | Cspg4 | qMmuCID0022407 |
| Dll4 | qMmuCID0016240 | Pdgfrb | qMmuCED0045914 |
| Kdr | qMmuCID0005890 | Acta2 | qMmuCID0006375 |
| Notch1 | qMmuCED0045879 | Pdgfb | qMmuCID0006375 |
| Jag1 | qMmuCID0022326 | Cxcl12 | qMmuCID0019961 |

Una muestra del ADNc obtenido se diluyó 1:5 en H_2O DEPC. Para las qPCR utilizamos la muestra diluida. La muestra sin diluir y la dilución se almacenaron a -20°C.

9.4. Reacción de PCR para muestras preamplificadas

La preamplificación tiene la limitación de que rinde ADNc de la región que se preamplifica para cada gen, no de todo el ADNc obtenido a partir de los ARNm completos. Esto hace necesario, en la posterior PCR, utilizar una pareja de cebadores que anille en una zona comprendida en esa región. En este caso utilizamos los cebadores comerciales *PrimePCR Assays* (*Bio-Rad*) correspondientes a los cebadores de preamplificación utilizados, y detallados en la [Tabla 8](#). Dado que desconocemos la secuencia de los cebadores, no podemos conocer las características del amplicón.

Tabla 8. Cebadores comerciales para qPCR

| Gen diana | Referencia | Gen diana | Referencia |
|------------------|-------------------|------------------|-------------------|
| Eng | qMmuCID0010792 | Tek | qMmuCID0015486 |
| Pecam1 | qMmuCID0005317 | Cdh5 | qMmuCID0005343 |
| Prom1 | qMmuCED0047306 | Tjp1 | qMmuCID0005277 |
| Cd34 | qMmuCED0044193 | Cspg4 | qMmuCID0022407 |
| Dll4 | qMmuCID0016240 | Pdgfrb | qMmuCED0045914 |
| Kdr | qMmuCID0005890 | Acta2 | qMmuCID0006375 |
| Notch1 | qMmuCED0045879 | Pdgfb | qMmuCID0017307 |
| Jag1 | qMmuCID0022326 | Cxcl12 | qMmuCID0019961 |

9.5. Diseño de cebadores para qPCR

Para el análisis de la expresión de los genes de interés en aquellas muestras que no habían sido preamplificadas, fue necesario diseñar secuencias de cebadores y comprobar su eficacia en la amplificación de una sola secuencia génica específica.

Para el diseño de cebadores, se utilizó la base de genes del NCBI (*National Center for Biotechnology Information, USA*). Gracias a su herramienta *Primer-BLAST*, se seleccionó la pareja de cebadores que se consideró que mejor reunía los requisitos, a saber, longitud del amplicón en torno a 100 pares de bases, porcentaje de pares GC en torno al 50%, y grado de autocomplementariedad bajo.

Para comprobar el funcionamiento de la pareja de cebadores en cada caso, se llevaron a cabo dos pruebas. En primer lugar, un gradiente de temperaturas consistente en una qPCR que utiliza diferentes temperaturas de anillamiento. Esta prueba nos permitió, por una parte, elegir la

temperatura de anillamiento a la que mejor funcionasen nuestros cebadores, esto es, que ofreciese un Ct más bajo (ver apartado 9.6). Por otro lado, el análisis de la curva de *melting* del producto de PCR, nos permitió saber si se había amplificado un solo producto o habían habido amplificaciones inespecíficas que invalidasen el uso de estos cebadores. Cabría la posibilidad de que dos productos de PCR de diferente longitud tuviesen una curva de *melting* similar por su composición en pares de bases, por lo que llevamos a cabo una electroforesis en gel de agarosa de los productos de qPCR obtenido en la anterior prueba. Esto nos permitió comprobar que nuestra pareja de cebadores sólo ofrecía un producto de PCR.

Posteriormente, comprobamos la eficiencia de amplificación de nuestra pareja de cebadores, amplificando diluciones seriadas 1:3 de una muestra, y comprobando que el producto de PCR obtenido en cada muestra conservaba la proporción con respecto a la muestra sin diluir. Así, se elaboró una recta que enfrentaba el Ct con la dilución de la muestra. Se dieron por válidas rectas con un valor de R^2 superior a 0,99. Además, la eficiencia, es decir, la proporción de ADN que rendía la reacción de PCR en cada muestra, o pendiente de la recta, debía estar entre el 90 y el 110%.

Un resultado positivo en ambas pruebas validaba nuestros cebadores para su uso.

Las parejas de cebadores de diseño propio utilizadas en este trabajo se detallan en la [Tabla 9](#).

9.6. PCR cuantitativa, qPCR o PCR a tiempo real

La técnica de PCR consiste en la amplificación de regiones específicas de ADN gracias a la utilización de cebadores específicos que anillan a ambos flancos de dicha región, y a la acción de una enzima ADN polimerasa que sintetiza ADN nuevo mediante la copia de la secuencia de dicha región gracias a la elongación de los cebadores (Bessman *et al*, 1958). Se denomina “en cadena” porque esta copia se lleva a cabo durante sucesivos ciclos, que llevará a la amplificación exponencial del ADN en cuestión (Mullis *et al*, 1986). Se puede llevar a cabo partiendo de ADN genómico o de ADNc obtenido a través de la retrotranscripción del ARN.

La PCR a tiempo real o qPCR permite monitorizar la cantidad de ADN al final de cada ciclo de amplificación gracias a la utilización de un fluoróforo que se une a ese ADN cuando está en estado de doble cadena (Woo *et al*, 1998). El *software* acoplado al termociclador registra la emisión de fluorescencia de cada una de las muestras a lo largo de la PCR y genera una curva de amplificación sigmoidea.

Tabla 9. Cebadores de diseño propio y condiciones de PCR

| Gen diana | Secuencia de los cebadores (5' → 3') | Tª de anillamiento | Longitud amplicón (pb) |
|---------------|--|--------------------|------------------------|
| ENG | AGGTGCTTCTGGTCCTCAGT CCTCAAGGATCTGGGTCT | 65 | 167 |
| S-ENG | GGAAGTCCATAGGACTGTCTTCA CACTGTGGGGCCTGGGGTA | 65 | 192 |
| Eng | GACTTCAGATTGGAATACCTTGG CAGTGCCGTGTCTTTCTGTAAT | 59 | 108 |
| Pecam1 | CGGTTATGATGATGTTTCTGGA AAGGGAGGACACTTCCACTTCT | 59 | 106 |
| Cd34 | GGGTAGCTCTCTGCCTGATG TGGCTGGTACTTCCAGGGAT | 59 | 151 |
| Cd133 | ATTAAGTGAAGGAGCCCAGC GAACGGTCTCCAAGGTGGTC | 59 | 116 |
| Kdr | GGCGACTATGTTTGCTCTGC GCCATGCGCTCTAGGATGAT | 59 | 86 |
| Notch1 | CAGTGCAACCCCTGTATGA TCTAGGCCATCCCCTCACA | 59 | 101 |
| Tek | AACAAGAGCGAGTGGACCAT TCCATGGCGCCTTCTACTAC | 59 | 186 |
| Cdh5 | ATTGGCCTGTGTTTTCCGAC CACAGTGGGGTCATCTGCAT | 59 | 110 |
| Pdgfrb | AGGACAACCGTACCTTGGGTGACT CAGTTCTGACACGTACCGGGTCTC | 59 | 89 |
| Rps13 | GATGCTAAATTCCGCCTGAT TAGAGCAGAGGCTGTGGATG | 59 | 120 |
| Actb | TCTACAAATGTGGCTGAGGACT GAGGGACTTCTGTAACTT | 59 | 117 |

La PCR se preparó sobre un volumen final de 20 μL . En los casos en los que utilizamos cebadores “caseros”, se mezcló 1 μL de cDNA, 10 μL de la *Supernix iQ™ SYBR® Green* (Bio-Rad), 0,4 μL de cada cebador y 8,2 μL de H_2O mQ. Para cebadores comerciales, se mezcló 1 μL de

cDNA, 10 μL de la *Supermix iQTMSYBR[®] Green*, 1 μL del *PrimePCR Assay* y 8 μL de H_2O mQ. La reacción se llevó a cabo en un termociclador *iQTM 5 (Bio-Rad)*, empleando un protocolo que incubó la reacción a 95°C durante 5 minutos, seguidos de 40 ciclos de 30 segundos a 95°C, 30 segundos a la temperatura de anillamiento específica y 30 segundos a 72°C. En el caso de los cebadores comerciales, la temperatura de anillamiento es siempre de 60°C. La cámara acoplada al termociclador toma una imagen de la muestra al final de cada ciclo, detectando la señal fluorescente, mayor cuanto más producto de PCR, al haber más ADN de doble cadena. Una vez terminado el protocolo, la temperatura del termociclador aumenta desde 70°C a 95°C, de forma gradual en ciclos de 10 segundos, con un aumento de 0,5°C en cada ciclo y tomando una fotografía al final de cada ciclo. Esto lleva a la desnaturalización del ADN, obteniendo la curva de *melting* o disociación de nuestro producto de PCR, que debe ser única para confirmar que se trata de un producto único.

El *software* acoplado al termociclador establece una línea de *threshold*, es decir, una línea horizontal que corta a las curvas de amplificación de cada muestra cuando todas ellas están en su fase exponencial. Después calcula los niveles de expresión relativos de las diferentes muestras en función de sus Ct, es decir, del ciclo de amplificación de cada muestra en el que la curva de amplificación en fase exponencial corta la línea de *threshold*. Un Ct más bajo indica una mayor cantidad de ADN del gen en cuestión, puesto que significa que en esa muestra se alcanza antes la fase exponencial de amplificación.

Se utilizaron como *housekeeping* la expresión de los ARNm de RPS13 (del inglés, *Ribosomal Protein S13*) y de β -actina en ratón, y del ARNm de GAPDH (del inglés, *Glyceraldehyde 3-Phosphate DeHydrogenase*) en humano.

10. Tratamiento de los datos y análisis estadísticos

Todos los resultados se expresaron como la media \pm el error estándar de la media (EEM). En la experimentación *in vivo* se utilizaron al menos ocho animales para cada grupo, siempre que fue posible, y en la experimentación *in vitro* se hicieron, al menos, tres experimentos.

Se aplicó el test D'Agostino—Pearson a los conjuntos de datos para comprobar si su distribución se ajustaba a una campana de Gauss. En caso afirmativo, se aplicaron test estadísticos paramétricos, y se utilizaron test no paramétricos para analizar conjuntos de datos que no presentaban una distribución normal. El test D'Agostino—Pearson no se puede aplicar

para conjuntos con menos de 8 datos, por lo que en estos casos se aplicó el test de normalidad de Kolmogorov-Smirnov.

Para datos normales, se utilizó el test estadístico de análisis de la varianza (ANOVA) para determinar las diferencias significativas entre más de dos grupos de datos. Consideramos significativo un valor de $p < 0,05$. En caso de encontrar diferencias significativas en el estudio del ANOVA, empleamos el test de Dunnett para las comparaciones “post hoc”. Como test no paramétrico, se empleó el test de Kruskal-Wallis, con las mismas condiciones. En este caso, el post-test utilizado fue el test de Dunn’s.

En el análisis de los datos de qPCR, se aplicó una transformación logarítmica del valor de expresión relativa obtenido. Esto permitió transformar la distribución de los datos, con sesgo positivo, en una distribución normal. Una vez transformado el conjunto de datos, se puede conocer si hay *outliers* en la muestra y eliminarlos. Sobre el valor transformado aplicamos los test estadísticos mencionados.

Los análisis estadísticos se llevaron a cabo con Microsoft Excel 2016 y GraphPad Prism 6.

Tabla 10. Relación de reactivos y productos utilizados

| Reactivo / Producto | Referencia | Casa comercial |
|--|-------------|--------------------------|
| ADN polimerasa | 10.003 | Biotoools |
| ADNasa | D5025 | Sigma-Aldrich |
| Advanced-DMEM F-12 | 12634 | Thermo Fisher Scientific |
| Agarosa | 50000 | Lonza |
| Agujas 19 gauges | 4657799 | Braun |
| Agujas 23 gauges | 4657667 | Braun |
| Agujas 25 gauges | 9186158 | Braun |
| APS (Persulfato de amonio) | A3678 | Sigma-Aldrich |
| Azul de bromofenol | B8026 | Sigma-Aldrich |
| Azul de trypan | T10282 | Thermo Fisher Scientific |
| Bisacrilamida | 161-0107 | Bio-Rad |
| BSA (albúmina sérica bovina) | A7906 | Sigma-Aldrich |
| Buprex (buprenorfina) | - | RB Pharmaceuticals |
| Calceína-AM | 17783 | Sigma-Aldrich |
| Cebadores PCR | - | Isogen Life Science |
| Cell strainer | 353250 | Corning |
| Colagenasa | C7926 | Sigma-Aldrich |
| Colágeno bovino tipo I | 354231 | Corning |
| Crioviales | 5000-0020 | Thermo Fisher Scientific |
| Cubreobjetos | 200x200 | Thermo Fisher Scientific |
| DC TM Protein Assay (Lowry) | 5000112 | Bio-Rad |
| Dispasa | 354235 | Corning |
| DMEM | 41966 | Thermo Fisher Scientific |
| DMSO (dimetil sulfóxido) | 154938 | Sigma-Aldrich |
| dNTP | 11277049001 | Roche |
| DTT (ditiotreitól) | D0632 | Sigma-Aldrich |
| ECGS (Suplemento células endoteliales) | GEN-ECGS-50 | Generon |
| EDTA (etilendiaminotetracético) | E5134 | Sigma-Aldrich |
| ELISA BrdU | 11 647 229 | Roche |
| Espermidina | S0266 | Sigma-Aldrich |
| Etanol | 100983 | Merk |

| | | |
|---|-------------|-----------------------------|
| FBS (Suero bovino fetal) | 10270 | Thermo Fisher Scientific |
| FGF murino | 3139-FB | R&D Systems |
| Fibronectina bovina | F1141 | Sigma-Aldrich |
| FITC-lectina | 3450-048-FL | Trevigen |
| Formol 10% | 252931.1214 | PanReac |
| Gelatina | G9391 | Sigma-Aldrich |
| Glicerol | D4751 | Sigma-Aldrich |
| Glicina | 161-0724 | Bio-Rad |
| Glutamina | G8540 | Sigma-Aldrich |
| Ham's F-12 | 21765 | Thermo Fisher Scientific |
| HCl | H/1200/PB15 | Thermo Fisher Scientific |
| Heparina bovina | H-0777 | Sigma-Aldrich |
| Hoechst 33258 | H3569 | Thermo Fisher Scientific |
| Igepal CA-630 | I3021 | Sigma-Aldrich |
| Inhibidores de fosfatasa <i>PhosSTOP</i> | 04 906 837 | Roche |
| Inhibidores de proteasas <i>Complete</i> | 11 697 498 | Roche |
| iScript RT Supermix | 170-8841 | Bio-Rad |
| Isoflurano <i>IsoFlo</i> | 34009XN | Esteve |
| Jeringas 20 mL | 353086 | Braun |
| Jeringuillas 1 mL | 9161406V | Braun |
| KCl | P9333 | Sigma-Aldrich |
| KH₂PO₄ | P5379 | Sigma-Aldrich |
| Luminol | A8511 | Sigma-Aldrich |
| Marcador 1 kb | 10787-018 | Thermo Fisher Scientific |
| Marcador pesos moleculares <i>PageRuler</i>TM | 26616 | Thermo Fisher Scientific |
| Material quirúrgico | - | Fine Science Tools (F.S.T.) |
| Matrigel[®] | 356237 | Corning |
| Membranas de PVDF | 66543 | Pall Corporation |
| Metanol | 34885 | Sigma-Aldrich |
| MillicelleZ slide 8 pocillos | PEZGS0816 | Millipore |
| MTT (metil tetrazolio) | M5655 | Sigma-Aldrich |
| Na₂HPO₄ | 20908 | Sigma-Aldrich |
| NaCl | S3014 | Sigma-Aldrich |

| | | |
|---|-------------|--------------------------|
| NH₄Cl | 141121 | PanReac |
| NucleoSpin® RNA II | 740.955 | Macherey Nagel |
| NucleoSpin® RNA XS | 740.902 | Macherey Nagel |
| p-iodofenol | I10201 | Sigma-Aldrich |
| Películas Fuji Medical X-Ray Film Super RX | 47410 | Fuji Medical |
| Penicilina – Estreptomicina | 15140-122 | Thermo Fisher Scientific |
| PFA (paraformaldehído) | P6148 | Sigma-Aldrich |
| Pipetas de plástico de 5, 10 y 25 mL | - | Corning |
| Placas de cultivo | - | Corning |
| Portaobjetos | 76x26 | Thermo Fisher Scientific |
| ProLong® Gold Antifade | P36934 | Thermo Fisher Scientific |
| Proteínasa K | 03115879001 | Roche |
| Puntas micropipeta con filtro | - | Neptune |
| Puntas micropipeta sin filtro | 2000/80 /16 | Deltalab |
| Rascadores de células | 353086 | Corning |
| RedSafe | 21141 | Intron Biotechnology |
| SDS (Dodecil sulfato sódico) | 152002C | Bio-Rad |
| Suero de cabra | G9023 | Sigma-Aldrich |
| Sutura 5/0 no absorbible | 06185 | Aragó |
| TEMED (tetrametil-etilendiamina) | 142093 | PanReac |
| Transwell con FluoroBlock™ | 351152 | Corning |
| Tripsina 0,25% - EDTA 0,02% | 25200 | Thermo Fisher Scientific |
| Tris base | 443866G | Merck |
| Triton-X100 | X100 | Sigma-Aldrich |
| Tubos de plástico de 1,5 mL | 175508 | Nirco |
| Tubos de plástico de 15 y 50 mL | - | Corning |
| Tubos de plástico de 2 mL | 4092.7N | Deltalab |
| Tween-20 | P7949 | Sigma-Aldrich |
| VEGF murino | 493-MV | R&D Systems |
| β-mercaptoetanol | M6250 | Sigma-Aldrich |

Tabla 11. Relación de anticuerpos utilizados

| Anticuerpo | Ensayo | Referencia | Casa comercial |
|--|-----------------------------|-------------|--|
| Endoglina murina | Inmunofluorescencia retina | MJ7/18 | Hibridoma cedido por el Dr. Bernabéu |
| Anti-IgG de rata Cy3 | Inmunofluorescencia retina | 112-165-003 | Jackson ImmunoResearch |
| CD16 / CD32 | Cultivo MLEC | 553141 | BD Biosciences |
| CD102 | Cultivo MLEC | 553325 | BD Biosciences |
| Beads magnéticas oveja anti-IgG de rata | Cultivo MLEC | 100.35 | Thermo Fisher Scientific |
| Endoglina humana | Inmunofluorescencia células | TEA1/58.1 | Hibridoma cedido por el Dr. Sánchez-Madrid |
| Anti-IgG de ratón AlexaFluor®568 | Inmunofluorescencia células | A10037 | Thermo Fisher Scientific |
| Endoglina humana | Citometría de flujo | 560839 | BD Biosciences |
| Endoglina humana | <i>Western blot</i> | H300 | Thermo Fisher Scientific |
| HA tag | <i>Western blot</i> | 18181 | Abcam |
| β-actina | <i>Western blot</i> | A5441 | Sigma-Aldrich |
| Tubulina | <i>Western blot</i> | DM1A | Millipore |

Tabla 12. Relación de equipos / aparatos utilizados

| Equipos / Aparatos | Casa comercial |
|--|--------------------------|
| Campana de flujo laminar vertical Gelaire TC-48 | Flow Laboratories |
| Cassette de revelado | Amersham |
| Centrífugas | Eppendorf |
| Countess® Automated Cell Counter | Thermo Fisher Scientific |
| Equipo electroforesis PCR | Bio-Rad |
| Equipo de Western blot Mini-Protean®III | Bio-Rad |
| Escáner | Canon |
| Fuente de alimentación Power Pac 3000 | Bio-Rad |
| Imán para tubos de 15 mL | Thermo Fisher Scientific |
| Incubador de células Forma Scientific 3111 | Thermo Fisher Scientific |
| Lector de placas ELISA Elx800 | BioTek |
| Lector de placas ELISA Epoch | BioTek |
| Lector de placas FluoroSkan Ascent | Thermo Fisher Scientific |
| Lupa | Nikon |
| Máquina anestesia inhalatoria | MSS Isoflurane |
| Máquina de revelado Medical X Ray Processor | Kodak |
| Microscopio confocal | Leica |
| Microscopio de contraste de fases 2 ELW 0.3 | Nikon |
| Microscopio de fluorescencia Axiovert 200M | Carl Zeiss |
| Nanodrop (ND-1000) | Thermo Fisher Scientific |
| Termociclador iQ™ 5 | Bio-Rad |
| Termociclador MyCycler™ | Bio-Rad |
| Transiluminador GelDoc | Bio-Rad |
| Ultracongelador | Thermo Fisher Scientific |

Tabla 13. Relación de fabricantes y casas comerciales

| Fabricante o Casa comercial | Dirección |
|--------------------------------|---|
| Abcam | http://www.abcam.com/ |
| Aragó | http://www.laboratorioarago.com/ |
| ATCC | http://www.lgcstandards-atcc.org/ |
| BD Biosciences | http://www.bd.com/ |
| Bio-Rad | http://www.bio-rad.com/ |
| Bio-Tek | http://www.biotek.es/ |
| Biotools | http://biotools.eu/ |
| Braun | http://www.bbraun.es/ |
| Canon | http://www.canon.es/ |
| Corning | https://www.corning.com/ |
| Cultrex Trevigen | https://www.trevigen.com |
| Deltalab | http://www.deltalab.es/ |
| Esteve | http://www.esteve.es/ |
| Fine Scientific Tools (F.S.T.) | http://www.finescience.com/ |
| Generon | http://www.generon.co.uk/ |
| Isogen Life Sciences | http://www.isogen-lifescience.com/ |
| Jackson ImmunoResearch | https://www.jacksonimmuno.com/ |
| Leica | http://www.leica-microsystems.com/ |
| Lonza | http://www.lonza.com/ |
| Macherey Nagel | http://www.mn-net.com/ |
| Millipore | http://www.merckmillipore.com/ |
| Moor | http://moor.co.uk/ |
| Neptune | http://neptunescientific.com/ |
| Nikon | http://www.nikoninstruments.com/ |
| Pall Corporation | http://www.pall.com/ |
| PanReac | http://www.panreac.es/ |
| R&D Systems | https://www.rndsystems.com/ |
| Roche | http://www.roche.es/ |
| Sigma-Aldrich | http://www.sigmaaldrich.com/ |

Resultados

“ Si el resultado confirma la hipótesis, has hecho una medida.
Si el resultado es contrario a la hipótesis, entonces has hecho un descubrimiento. ”

Enrico Fermi

1. Estudio de la sobreexpresión de las isoformas de endoglina humana en el modelo animal desarrollado para el estudio

Para abordar el estudio del papel de endoglina en angiogénesis, en este trabajo se ha utilizado un modelo animal en el que se ha sobreexpresado de forma ubicua endoglina humana, bien L-endoglina en el ratón *L-ENG^t*, o S-endoglina en el ratón *S-ENG^t*. Además se han utilizado ratones C57BL/6J como línea control o *wild type* (Figura 28).

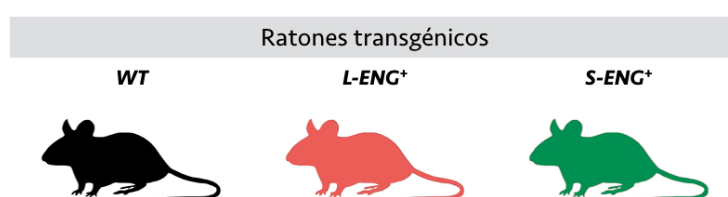
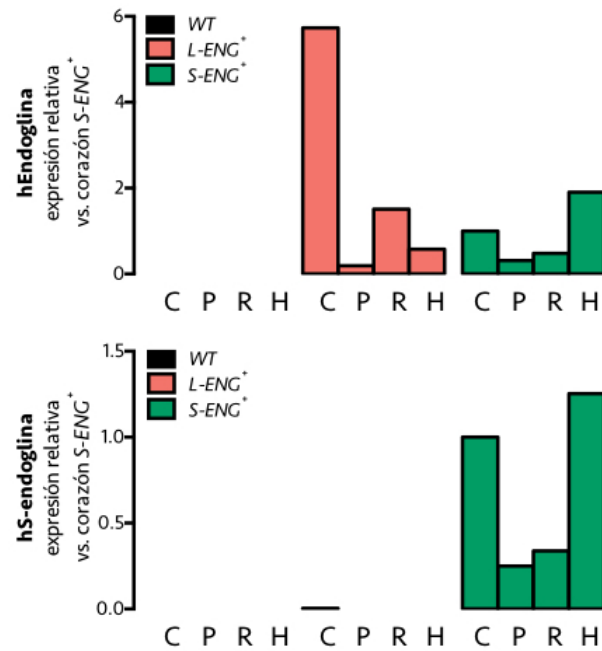


Figura 28. Modelo animal utilizado en el trabajo

Líneas de ratones con los que se ha llevado a cabo este estudio, marcadas con el código de colores empleado. *WT* como controles, y *L-ENG⁺* y *S-ENG⁺*, que sobreexpresan L-endoglina y S-endoglina humanas respectivamente, como ratones problema.

Para comprobar que, efectivamente, estos ratones presentan elevados niveles de una u otra proteína en cada caso, se evaluaron los niveles de expresión de ARNm de las isoformas de endoglina humana en lisados de corazón, pulmón, riñón e hígado de ratones *L-ENG^t*, *S-ENG^t* y ratones *WT*, utilizando para ello cebadores específicos para endoglina humana total y para S-endoglina humana. Además, se analizaron mediante *Western blot* los niveles de endoglina humana en lisados de los mismos órganos de las tres líneas de ratones (Figura 29). No existen anticuerpos que reconozcan específicamente cada una de las isoformas, ya que su epítipo se encuentra en el dominio extracelular de endoglina, por lo que sólo podemos diferenciar ambas isoformas por la altura de la banda de *Western blot*, esto es, por la movilidad electroforética de la proteína.

A.



B.

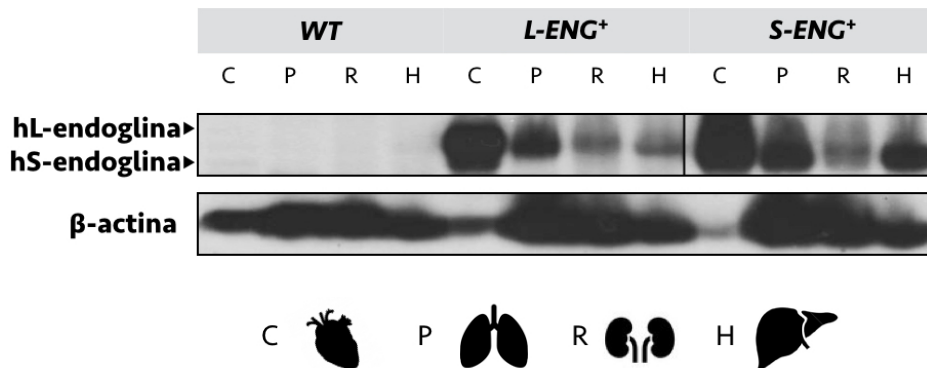


Figura 29. Expresión de endogлина humana en tejido

A. Análisis de la expresión del ARNm de endogлина total y S-endogлина humanas en tejido de ratones *WT*, *L-ENG*⁺, *S-ENG*⁺, analizada mediante qPCR. B. Niveles de la proteína endogлина humana en tejido de ratones *WT*, *L-ENG*⁺, *S-ENG*⁺, analizados mediante *Western blot*.

En la [Figura 29](#) se observa cómo, en los tejidos analizados, los ratones *L-ENG*⁺ sobreexpresan L-endogлина humana, los ratones *S-ENG*⁺ sobreexpresan S-endogлина humana, mientras que los ratones control *WT* no expresan ninguna de las isoformas de endogлина de origen humano.

2. Descripción general comparativa de las líneas de ratones utilizadas

En un primer momento, comprobamos si los ratones transgénicos *L-ENG⁺* y *S-ENG⁺* presentaban características generales similares a los ratones *WT*. Para ello, analizamos el tamaño de las camadas obtenidas a partir de los cruces de estos ratones. Además, pesamos a los ratones a lo largo de su etapa de crecimiento hasta los 6 meses, cuando se consideran completamente adultos. Se pesaron numerosos ratones, machos y hembras, de cada línea de transgénico pero, debido a la variabilidad de la *n* de que disponíamos, descartamos los valores más altos y más bajos para finalmente quedarnos con los valores de 4 hembras y 5 machos de cada línea *WT*, *L-ENG⁺* y *S-ENG⁺*, para cada punto de tiempo. Los resultados se muestran en la **Figura 30**:

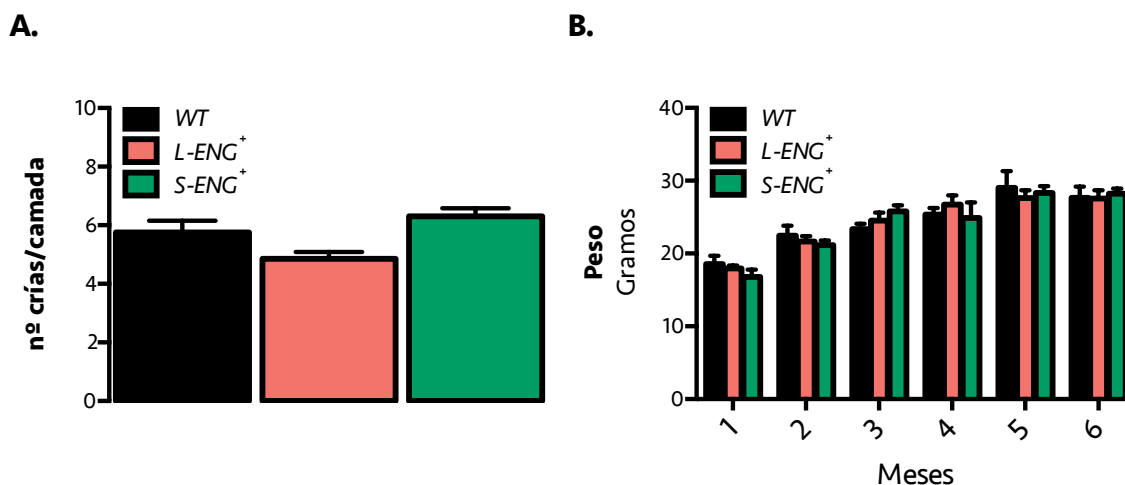


Figura 30. Tamaño de las camadas y peso de los ratones

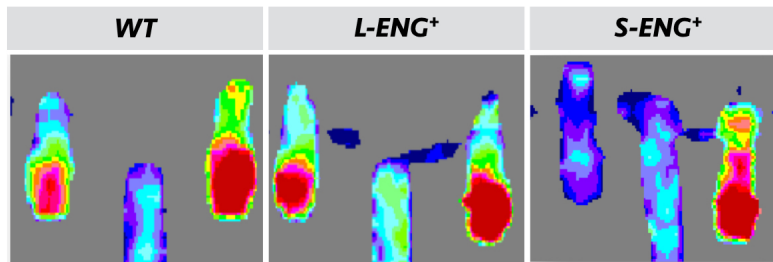
A. Tamaño de las camadas obtenidas en los cruces de ratones *WT*, *L-ENG⁺* y *S-ENG⁺*. *WT* (*n*=24), *L-ENG⁺* (*n*=62) y *S-ENG⁺* (*n*=50). B. Peso de los ratones de las tres líneas genéticas durante su crecimiento. *WT* (*n*=9), *L-ENG⁺* (*n*=9) y *S-ENG⁺* (*n*=9). Cada barra representa la media ± EEM. Test estadístico ANOVA de una vía para el tamaño de las camadas y ANOVA de doble vía de medidas repetidas para el peso.

No se observan diferencias significativas en cuanto al número de crías por camada en los cruces de ratones *L-ENG⁺* y *S-ENG⁺* con respecto a las camadas de cruces de ratones *WT*. Tampoco se observan diferencias estadísticamente significativas en el peso de estos ratones, si comparamos los transgénicos *L-ENG⁺* y *S-ENG⁺* con los controles *WT*.

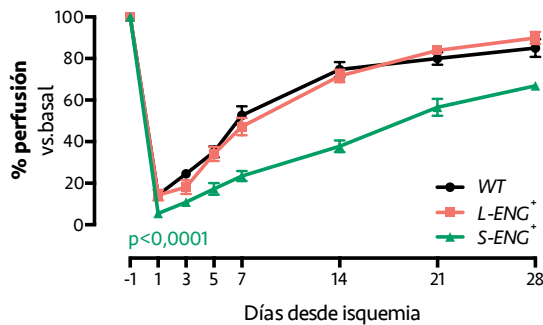
3. Estudio del efecto de la sobreexpresión de endoglina en la reperfusión post-isquémica

Nuestro primer abordaje para estudiar el efecto de la sobreexpresión de endoglina en la formación de vasos sanguíneos consistió en el estudio de la dinámica de reperfusión de las extremidades traseras del ratón tras someterles a isquemia femoral unilateral. El modelo ha sido previamente descrito y validado, como se indica en la sección 3 del apartado de “Materiales y métodos” (Limbourg *et al*, 2009).

A.



B.



C.

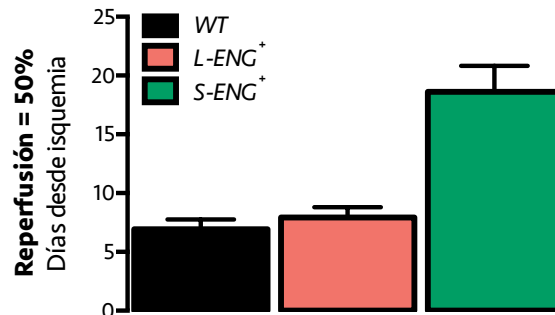


Figura 31. Reperfusión post-isquémica de la extremidad del ratón

A. Imágenes representativas de la perfusión de la extremidad isquémica de las tres líneas de ratones utilizadas tras 14 días de isquemia. B. Evolución de la perfusión a través de la extremidad del ratón sometida a isquemia, durante 28 días. La perfusión se representa como tanto por ciento con respecto a la perfusión de la pata antes de la isquemia, tomando como control de perfusión constante la extremidad contralateral, no isquémica. Cada punto representa la media \pm EEM. C. Valor de x interpolado para $y=50 \pm$ límites mínimo y máximo, con un intervalo de confianza del 95%. WT (n=9), L-ENG⁺ (n=9) y S-ENG⁺ (n=9). Test estadístico ANOVA de doble vía de medidas repetidas.

En la [Figura 31A](#) se muestran tres imágenes representativas del grado de perfusión de las extremidades traseras isquémica y no isquémica, de un ratón de cada una de las tres líneas en estudio. En la [Figura 31B](#) se muestra el resultado de la medición de la evolución de la perfusión tisular en las extremidades traseras tras isquemia femoral, en ratones *WT*, *L-ENG^t* y *S-ENG^t*, durante cuatro semanas. Dado que la recuperación de la perfusión es más rápida en los primeros días, durante la primera semana se tomaron medidas cada dos días, y después se tomaron medidas una vez por semana. De cada curva de reperfusión, correspondiente a cada línea de ratones, se obtuvo la curva de regresión utilizando un modelo de ecuación cúbica. De la ecuación obtenida, se interpoló el número de días (valor de x) que se tardaba en cada una de ellas en alcanzar una tasa de reperfusión (valor de y) del 50% de los niveles basales, que se representa en la [Figura 31C](#).

Como se observa en la figura, la sobreexpresión de L-endogлина no conlleva ninguna diferencia en cuanto a la tasa de reperfusión post-isquémica, al compararla con la de ratones control (*WT*). Por el contrario, la sobreexpresión de S-endogлина lleva a un retraso de la perfusión de la extremidad, con respecto a la reperfusión en ratones *WT*, que se observa ya en el primer día tras haber practicado la isquemia. Frente a los 7-8 días que tardan los ratones *WT* y *L-ENG^t* en alcanzar unos niveles de perfusión del 50% del basal en la extremidad isquémica, los ratones *S-ENG^t* necesitan aproximadamente 18,5 días para hacerlo. Tanto es así que dos ratones *S-ENG^t* fueron descartados del estudio porque la extremidad isquémica no experimentó reperfusión y se les llegó a atrofiar; esto sólo sucedió en este grupo experimental. Las diferencias en reperfusión de los ratones *S-ENG^t* con los otros grupos experimentales se mantienen, incluso se acentúan, a lo largo del periodo de recuperación.

4. Estudio del efecto de la sobreexpresión de endogлина en la angiogénesis *in vivo*

Aunque el estudio anterior nos permitió demostrar el papel esencial de endogлина en la reperfusión post-isquémica, también utilizamos otras aproximaciones metodológicas que nos permitiesen evaluar aspectos concretos del proceso de angiogénesis propiamente dicho.

Para ello, empleamos dos modelos de angiogénesis *in vivo*. Por un lado, estudiamos la vascularización de la retina del ratón y, por otro lado, llevamos a cabo el EDAIV (Ensayo Directo de Angiogénesis *In Vivo*), modelos descritos en las secciones 4 y 5 de “Materiales y métodos”. En ambos casos, además de analizar el endotelio de los vasos formados, se estudió la expresión génica de marcadores endoteliales, recogidos en la [Tabla 14](#):

Tabla 14. Relación de marcadores endoteliales analizados por qPCR

| Gen | Proteína | Marcador de |
|---------------|----------------------|--|
| <i>Eng</i> | Endogлина | Endotelio , CMLV, pericitos, células hematopoyéticas, sincitiotrofoblastos placentarios, fibroblastos, condrocitos, células mesangiales renales, células estrelladas hepáticas (Gougos & Letarte, 1988b; Buhring <i>et al</i> , 1991; Gougos <i>et al</i> , 1992; Lastres <i>et al</i> , 1992; St-Jacques <i>et al</i> , 1994a; Zhang <i>et al</i> , 1996; Conley <i>et al</i> , 2000; Arthur <i>et al</i> , 2000; Rodriguez-Barbero <i>et al</i> , 2001; Parker <i>et al</i> , 2003; Meurer <i>et al</i> , 2005; Mahmoud <i>et al</i> , 2009; Rivera & Brekken, 2011). |
| <i>Pecam1</i> | Pecam1 o CD31 | Endotelio , plaquetas, células hematopoyéticas (Park <i>et al</i> , 2010). |
| <i>Cdh5</i> | VE-cadherina | Endotelio (Dejana & Orsenigo, 2013). |
| <i>Tjp1</i> | Tjp1 o ZO-1 | Epitelio, endotelio (González-Mariscal <i>et al</i> , 2000). |
| <i>Tek</i> | Tie2 | Endotelio (Jones & Dumont, 2000). |

4.1. Estudio del efecto de la sobreexpresión de endogлина en la respuesta angiogénica fisiológica en retina

4.1.1. Análisis de la vasculatura de la retina

En primer lugar, analizamos la estructura vascular de retinas de crías de 6 días de vida *WT*, *L-ENG^t* y *S-ENG^t*. Se llevó a cabo el marcaje de los vasos de la retina en preparaciones *whole-mount* de las mismas, empleando para ello FITC-lectina. Además, se hizo un co-marcaje mediante la inmunofluorescencia de endogлина de ratón. Se utilizaron al menos 3 ratones por cada línea.

El primer resultado que observamos fue una evidente mayor expresión de endogлина en el frente de vascularización, es decir, en los vasos más externos de la retina, que están sufriendo angiogénesis a medida que la retina crece, en comparación con los vasos ya formados y estabilizados. Además, ambos tipos de vasos se diferencian claramente por su morfología. Este dato está en consonancia con lo que ya se ha dicho anteriormente en la bibliografía (Barnett *et al*, 2014) y que venimos defendiendo en este trabajo, que es que los niveles de endogлина aumentan en las células endoteliales activas que están llevando a cabo la angiogénesis. Una imagen representativa se recoge en la [Figura 32](#):

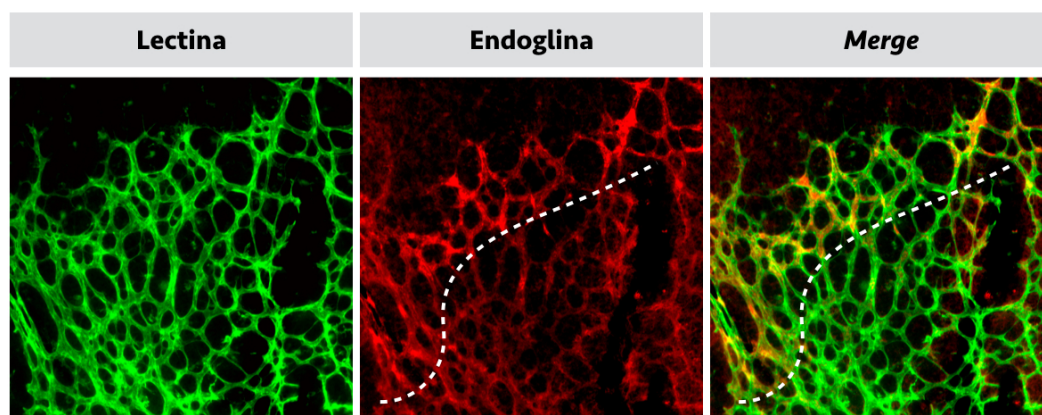


Figura 32. Expresión de endoglina en los vasos de la retina en angiogénesis

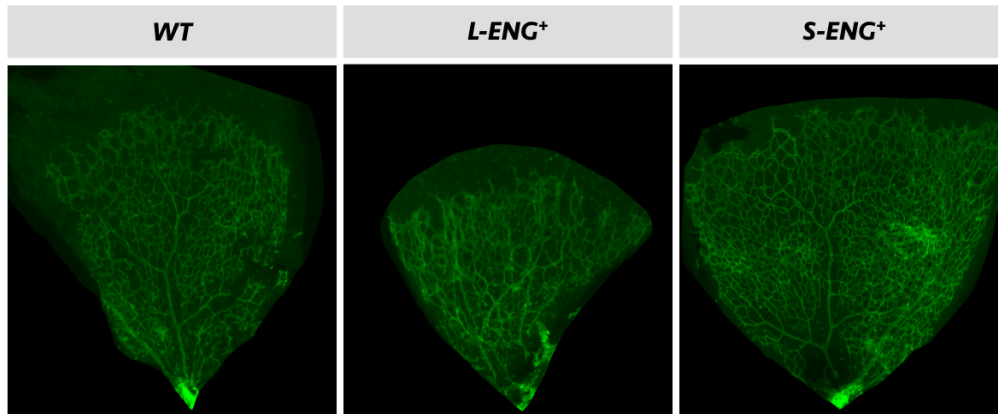
Microfotografía de la retina de un ratón *WT* a los 6 días post-natales, en la que se marca el endotelio vascular (lectina, en verde) y endoglina de ratón (en rojo). Imagen representativa que muestra cómo la expresión de endoglina es más intensa donde está teniendo lugar la angiogénesis activa, esto es, en el frente angiogénico, en comparación con vasos más internos y estables.

Quisimos analizar la estructura de la vasculatura de la retina de estos ratones, para conocer el efecto de la sobreexpresión de L-endoglina o S-endoglina. Para ello, analizamos las microfotografías con el *software Fiji*.

En primer lugar, medimos la distancia que había alcanzado el frente vascular en las retinas de cada uno de los ratones, para aproximarnos a la tasa de vascularización, expresada como longitud invadida por vasos desde el centro de la retina, en la progresión del plexo vascular. Los resultados aparecen en la [Figura 33](#).

Mientras que la sobreexpresión de S-endoglina no supone ninguna alteración en este parámetro, la sobreexpresión de L-endoglina lleva a la formación de un árbol vascular más reducido en cuanto al desarrollo del plexo vascular de la retina, cuando se compara con el de los ratones controles, *WT*.

A.



B.

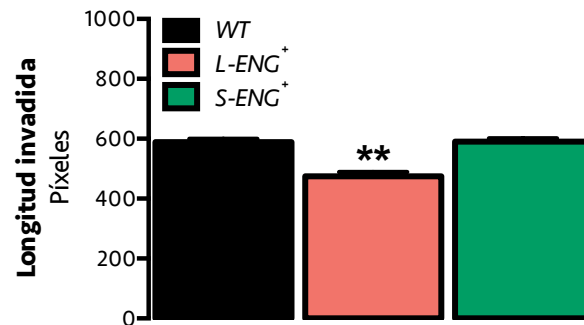


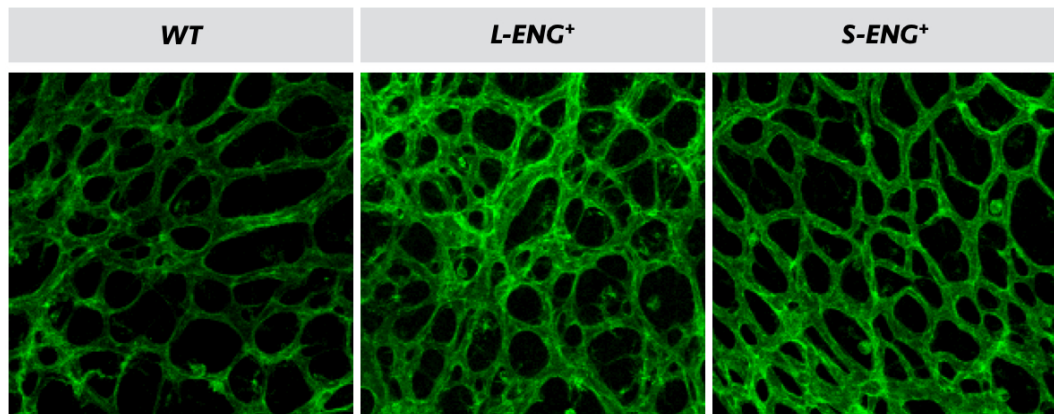
Figura 33. Grado de vascularización de la retina

A. Microfotografía de la retina. Imagen representativa que muestra un lóbulo del *whole mount* de la retina de cada una de las líneas de ratón. B. Cuantificación de la distancia invadida por vasos o progresión del plexo vascular. Cada barra representa la media \pm EEM. WT (n=7), L-ENG⁺ (n=3) y S-ENG⁺ (n=6). Test estadístico ANOVA de una vía: ** p<0,01 vs. WT.

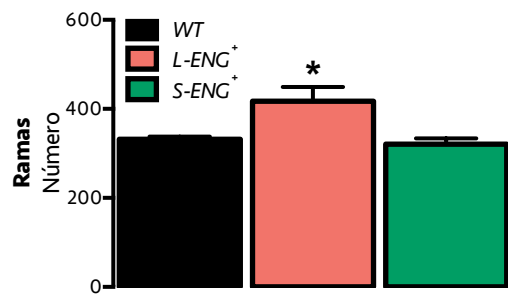
Figura 34. Estructura de la vasculatura de la retina normal y efecto de la sobreexpresión de las isoformas de endoglin

A. Microfotografía de la retina: imagen representativa que muestra un campo de la retina de cada una de las líneas de ratón. Cuantificación de los componentes estructurales del árbol vascular: ramas (B), nexos (C), longitud promedio de las ramas (D), longitud máxima de las ramas (E) y cálculo de la longitud total de vasos por campo o densidad (F). Cada barra representa la media \pm EEM. WT (n=7), L-ENG⁺ (n=3) y S-ENG⁺ (n=6). Test estadístico ANOVA de una vía para puntos de unión y longitudes, y Kruskal-Wallis para ramas: * p<0,05 vs. WT; ** p<0,01 vs. WT.⇒

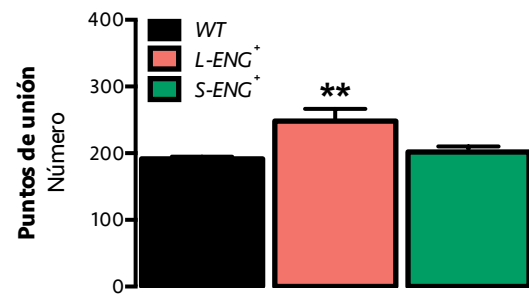
A.



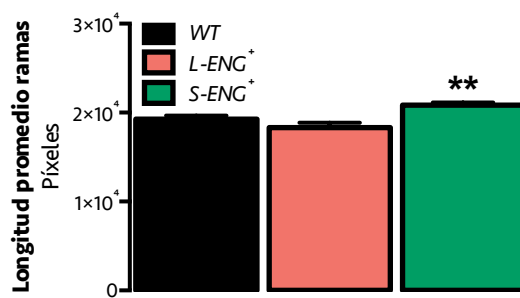
B.



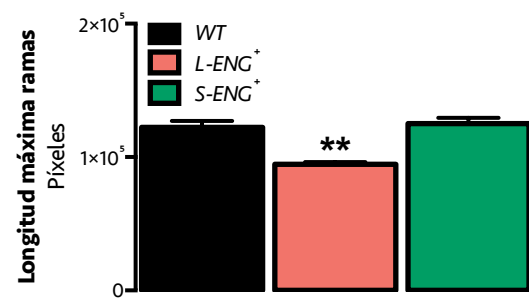
C.



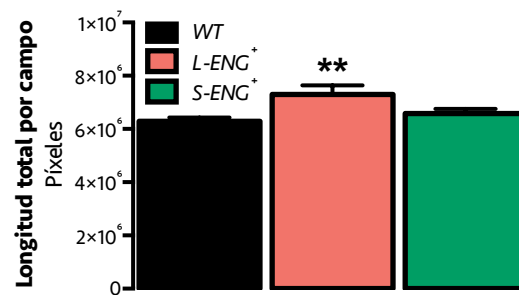
D.



E.



F.



Por otra parte, *Fiji* permite generar un esqueleto digital a partir del árbol vascular de cada retina. El análisis de este esqueleto nos permitió evaluar parámetros como el número de ramificaciones, el número de puntos de unión y la longitud de cada segmento o rama. Los resultados se representan en la [Figura 34](#), junto con imágenes representativas de las proyecciones máximas de retinas de las tres líneas de animales transgénicos utilizadas.

La sobreexpresión de L-endogлина supone la formación de una estructura vascular más ramificada y con ramas más cortas que en las retinas *WT*, que presenta una mayor densidad de vasos por campo. El número de ramificaciones y puntos de unión en ratones *S-ENG^f* es similar a los de ratones *WT*, mientras que la longitud promedio de las ramas es mayor.

4.1.2. Análisis de la expresión génica de marcadores endoteliales en retina

Estudiamos en retina, mediante qPCR, la expresión relativa de genes que son marcadores de endotelio, para aproximarnos a la abundancia de ese tipo celular en dicho tejido. La relación de genes analizados está recogida en la [Tabla 14](#).

Analizamos así el contenido en células endoteliales de las retinas de los ratones *WT*, *L-ENG^f* y *S-ENG^f*, a día 17 postnatal, mediante el análisis de estos marcadores específicos de endotelio.

Los resultados de PCR los representamos mediante *box plots*: estas cajas nos permiten conocer la distribución y dispersión de las observaciones, la media, representada con una cruz, la mediana, correspondiente a la barra horizontal, y los percentiles 10 (bigote inferior) y 90 (bigote superior).

En la [Figura 35](#), podemos ver que la sobreexpresión de S-endogлина reduce significativamente el contenido en células endoteliales en la retina si se comparan con las de ratones *WT*, tal como indica el análisis de la expresión de *Eng*, *Pecam1* y *Cdh5*. Las retinas de ratones *L-ENG^f* muestran una muy ligera tendencia a tener menos células endoteliales que las de *WT*, que sólo parece significativa según el análisis de *Tie2*, y en ningún caso es tan clara como en las retinas *S-ENG^f*, por lo que no consideramos que haya diferencias en el contenido endotelial.

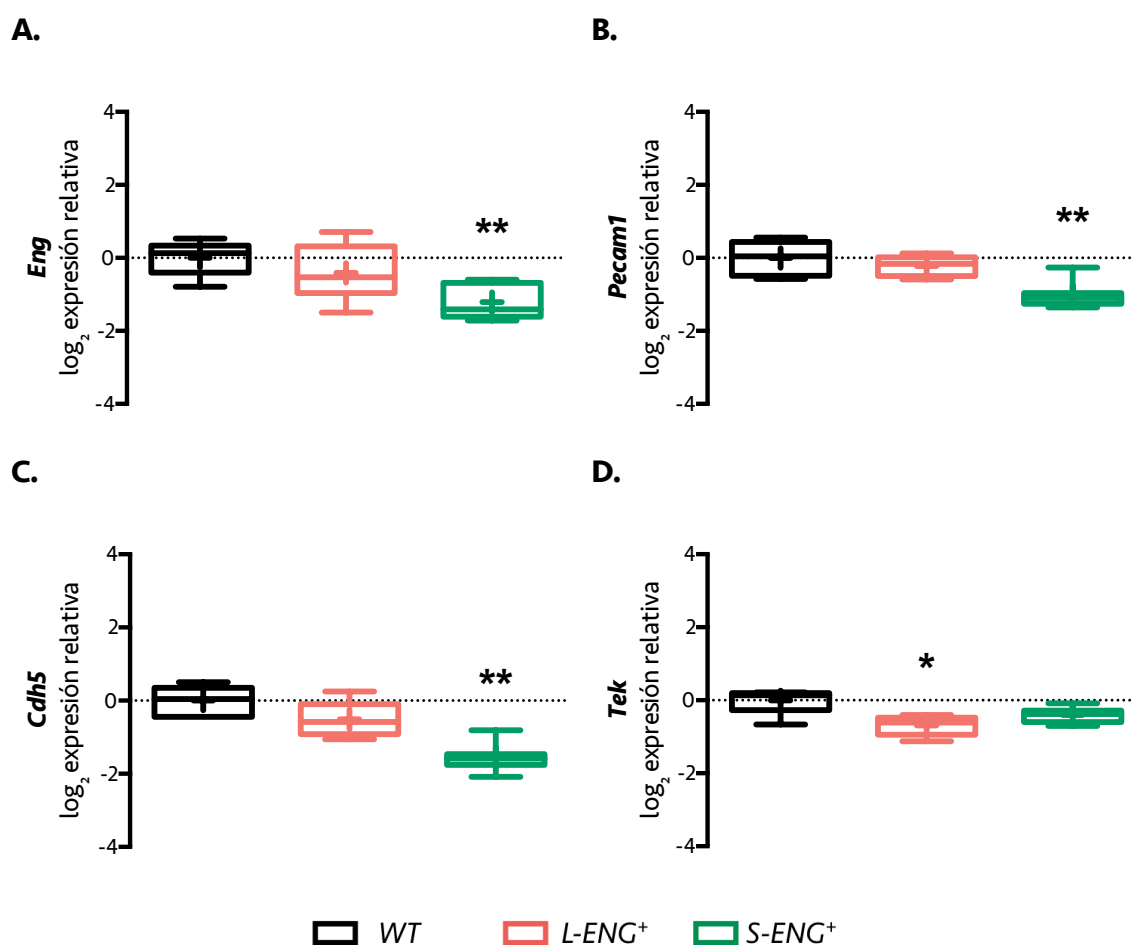


Figura 35. Expresión de marcadores endoteliales en retina

Análisis mediante qPCR de los niveles de expresión de *Eng* (A), *Pecam1* (B), *Cdh5* (C) y *Tek* (D). Los valores se representan como el logaritmo en base dos de la expresión relativa de cada muestra con respecto de las muestras WT. Se representa un *box plot* 10-90 percentil. WT (n=5), L-ENG⁺ (n=5) y S-ENG⁺ (n=7). Test estadístico ANOVA de una vía para *Eng*, *Pecam1* y *Cdh5* y Kruskal-Wallis para *Tek*: * $p < 0,05$ vs. WT; ** $p < 0,01$ vs. WT.

4.2. Estudio del papel de la sobreexpresión de endogлина en el Ensayo Directo de Angiogénesis *In Vivo*

4.2.1. Análisis de invasión endotelial en el Ensayo Directo de Angiogénesis *In Vivo*

Implantamos los angiorreactores bajo la piel del lomo de ratones WT, L-ENG⁺ y S-ENG⁺ y, tras 9 días, los extrajimos y fotografiamos. Se muestra un ejemplo de las fotografías de los tubos en la [Figura 18B](#) del apartado 5.1 de “Materiales y métodos”.

La angiogénesis que ha tenido lugar dentro de los tubos se puede observar a simple vista, puesto que los vasos estabilizados se rellenan con sangre. Así, podemos cuantificar la distancia invadida por vasos, desde el extremo abierto del angiorreactor hasta el frente al que llega la sangre. Medimos dicha distancia utilizando el *software Fiji*.

En la siguiente figura se muestra la cuantificación de la distancia invadida por vasos, en angiorreactores implantados en ratones *WT*, *L-ENG⁺* y *S-ENG⁺*. Se utilizaron al menos 10 ratones por cada línea.

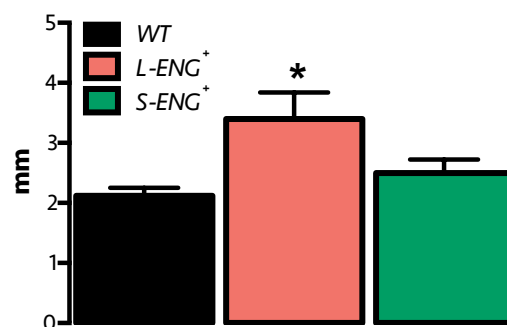


Figura 36. Distancia invadida por los vasos en los angiorreactores

Estimación de la distancia invadida por los vasos en los angiorreactores, mediante la medida, en milímetros, del alcance de la sangre, tras 9 días desde la implantación de los tubos. Cada barra representa la media \pm EEM. *WT* (n=16), *L-ENG⁺* (n=28) y *S-ENG⁺* (n=20). Test estadístico ANOVA de una vía: * $p < 0,05$ vs. *WT*.

Como se muestra en la [Figura 36](#), en los ratones *L-ENG⁺* observamos una mayor invasividad del Matrigel® en respuesta a un estímulo angiogénico por parte de las células endoteliales, que en los *WT*. Esto podría deberse a una inducción del *sprouting*, o a una mayor capacidad de proliferación y/o de invasión de la MEC de las células endoteliales con niveles aumentados de L-endoglina. En los ratones *S-ENG⁺* no se observan diferencias con los *WT* en este parámetro.

Para conocer la cantidad de células endoteliales en los angiorreactores, y saber si la mayor invasividad en los tubos implantados en ratones *L-ENG⁺* se debe a un mayor número de células en éstos que en los de controles y los ratones *S-ENG⁺*, extrajimos el contenido de los tubos y cuantificamos la cantidad de células endoteliales que los habían invadido mediante un marcaje fluorescente ([Figura 37](#)). Se utilizaron al menos 8 ratones por cada línea.

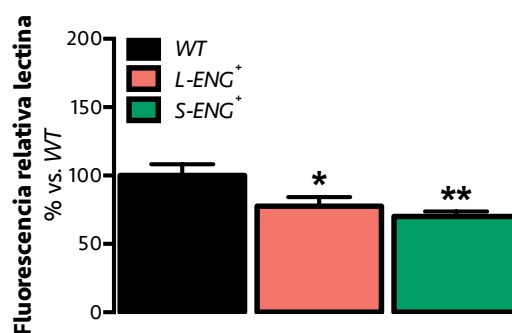


Figura 37. Cantidad de células endoteliales que invaden los angiorreactores

Medida del marcaje fluorescente del endotelio en la muestra contenida en los angiorreactores tras 9 días desde su implantación. La fluorescencia se representa como tanto por ciento con respecto a la fluorescencia de las muestras *WT*. Cada barra representa la media \pm EEM. *WT* (n=11), *L-ENG⁺* (n=11) y *S-ENG⁺* (n=16). Test estadístico de Kruskal-Wallis: * $p < 0,05$ vs. *WT*; ** $p < 0,01$ vs. *WT*.

La cuantificación de la señal fluorescente indica que el número de células endoteliales es menor en los ratones *L-ENG⁺* y *S-ENG⁺* que en los *WT*. No hay diferencias estadísticas entre los grupos *L-ENG⁺* y *S-ENG⁺*.

4.2.2. Análisis de la expresión génica en un ensayo de angiogénesis *in vivo*

Quisimos evaluar posibles alteraciones en la expresión de marcadores endoteliales en las células de los vasos formados en el interior de *plugs* de Matrigel®, que imitan lo que sucede en los angiorreactores. Para ello, analizamos mediante qPCR la expresión de los genes recogidos en la [Tabla 14](#).

Se analizaron al menos 8 *plugs*, de un mínimo de 6 ratones diferentes. Los resultados se recogen en la [Figura 38](#).

Como se observa en la figura, no se encontraron diferencias significativas entre las líneas de ratones en estudio, en lo que respecta a ninguno de los cinco marcadores de endotelio analizados.

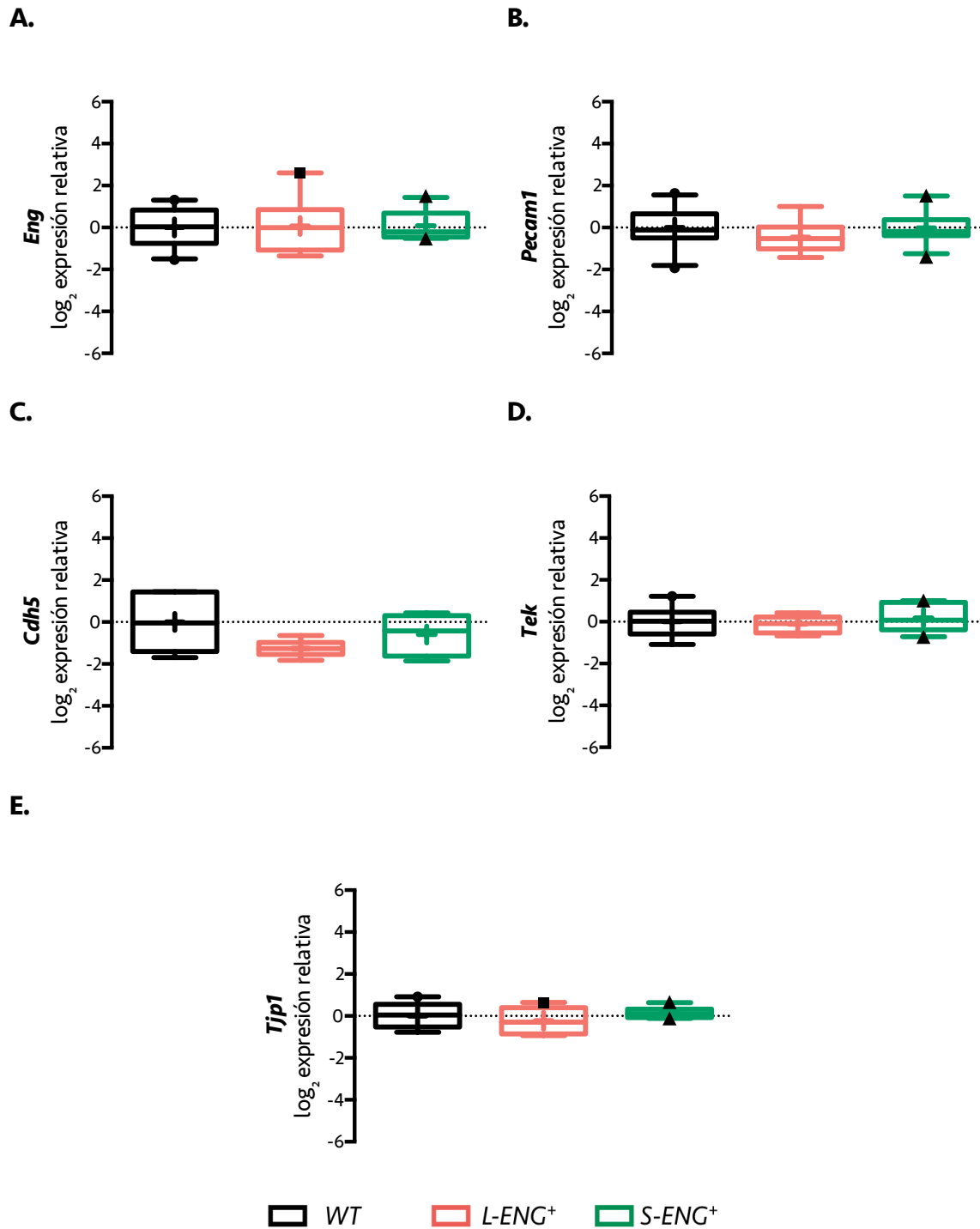


Figura 38. Expresión de marcadores endoteliales en los *plugs* de Matrigel®

Análisis mediante qPCR de los niveles de expresión de *Eng* (A), *Pecam1* (B), *Cdh5* (C), *Tek* (D) y *Tjp1* (E). Los valores se representan como el logaritmo en base dos de la expresión relativa de cada muestra con respecto de las muestras WT. Se representa un *box plot* 10-90 percentil. WT (n=9), L-ENG⁺ (n=8) y S-ENG⁺ (n=10). Test estadístico ANOVA de una vía.

5. Estudio del efecto de la sobreexpresión de endogлина en el proceso de *sprouting*

La angiogénesis se inicia con el proceso de *sprouting*, por lo que nos planteamos si este proceso estaría alterado en respuesta a la sobreexpresión de alguna de las isoformas de endogлина.

Para analizar el proceso de *sprouting*, nos valimos en primer lugar de las muestras que ya teníamos de los modelos de angiogénesis *in vivo*, donde analizamos mediante qPCR la expresión de marcadores de regulación de la selección *tip/stalk* durante el proceso de *sprouting*. Además, analizamos la expresión de dos marcadores de precursores endoteliales, puesto que se sabe que estas células participan en el *sprouting* directamente. Cambios en las proporciones de estos marcadores en los ratones *L-ENG^f* o *S-ENG^f*, indicarían una respuesta angiogénica alterada con respecto a los ratones *WT*. Los genes analizados se recogen en la [Tabla 15](#).

Tabla 15. Relación de marcadores de *sprouting* analizados mediante qPCR

| Gen | Proteína | Marcador de |
|---------------|----------------------------|--|
| <i>Dll4</i> | Dll4 | Células <i>tip</i> (Adams & Alitalo, 2007; Benedito <i>et al</i> , 2009; Blanco & Gerhardt, 2013). |
| <i>Kdr</i> | VEGFR2 o Flk1 | Células <i>tip</i> , precursores endoteliales (Peichev <i>et al</i> , 2000; Jakobsson <i>et al</i> , 2010). |
| <i>Notch1</i> | Notch1 | No se conoce su regulación en el <i>sprouting</i> |
| <i>Jag1</i> | Jagged1 | Células <i>stalk</i> (Benedito <i>et al</i> , 2009; Blanco & Gerhardt, 2013). |
| <i>Cd34</i> | CD34 | Precursores endoteliales , precursores hematopoyéticos, células <i>tip</i> (Siemerink <i>et al</i> , 2012; Sidney <i>et al</i> , 2014; Joo <i>et al</i> , 2015). |
| <i>Prom1</i> | Prominina-1 o CD133 | Precursores endoteliales (Peichev <i>et al</i> , 2000). |

Además, quisimos completar este estudio con un ensayo de *sprouting* a partir de anillos de aorta *ex vivo*, cuyos resultados se describen más adelante.

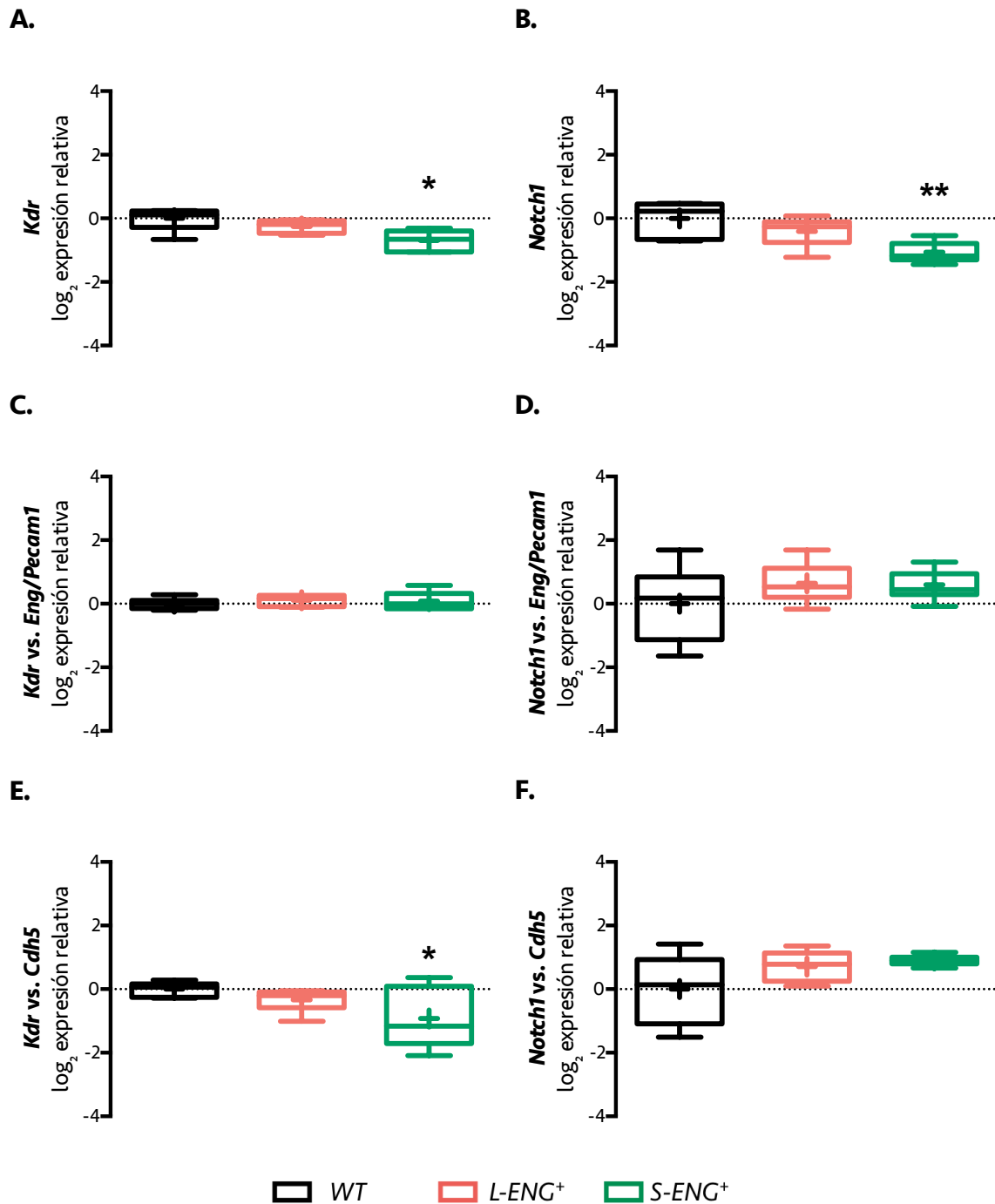


Figura 39. Expresión de marcadores de *sprouting* en retina

Análisis mediante qPCR de los niveles de expresión de *Kdr* (A), *Notch1* (B), *Kdr vs. Eng/Pecam1* (C), *Notch1 vs. Eng/Pecam1* (D), *Kdr vs. Cdh5* (E) y *Notch1 vs. Cdh5* (F). Los valores se representan como el logaritmo en base dos de la expresión relativa de cada muestra con respecto de las muestras WT. Se representa un *box plot* 10-90 percentil. WT (n=5), *L-ENG*⁺ (n=5) y *S-ENG*⁺ (n=6). Test estadístico ANOVA de una vía, excepto Kruskal-Wallis para *Kdr*: * $p < 0,05$ vs. WT; ** $p < 0,01$ vs. WT.

5.1. Análisis de la expresión marcadores de *sprouting* en retina

Las características del tejido supusieron una limitación en cuanto a la cantidad de ARN que fuimos capaces de aislar. Por esta razón, sólo pudimos analizar la expresión de los genes *Kdr* y *Notch1* en retinas. Expresamos los niveles los mensajeros corregidos por los niveles de expresión de los genes *housekeeping* (*Rps13* y *Actb*) así como en función de marcadores de endotelio. Se analizaron 8 retinas por línea de ratón. Los resultados se recogen en la [Figura 39](#).

Nuevamente, la proporción de células que expresan *Kdr* y *Notch1* es menor en las retinas de ratones *S-ENG^t* que en las de *WT*, como sucedía con los marcadores endoteliales. Pero al expresar los niveles de mensajero de estos dos genes en función de la abundancia relativa de células endoteliales, observamos que no hay ninguna diferencia en su expresión en los ratones *L-ENG^t* y *S-ENG^t*, con respecto a los controles *WT*, excepto al expresar *Kdr* en función de la expresión de *Cdh5*, donde se mantienen las diferencias de los ratones *S-ENG^t* con los *WT*.

En cuanto a la cantidad de células que expresan *Cd34* y *Prom1* en retina, no se observaron diferencias entre los ratones *L-ENG^t* y *S-ENG^t*, y los ratones control ([Figura 40](#)).

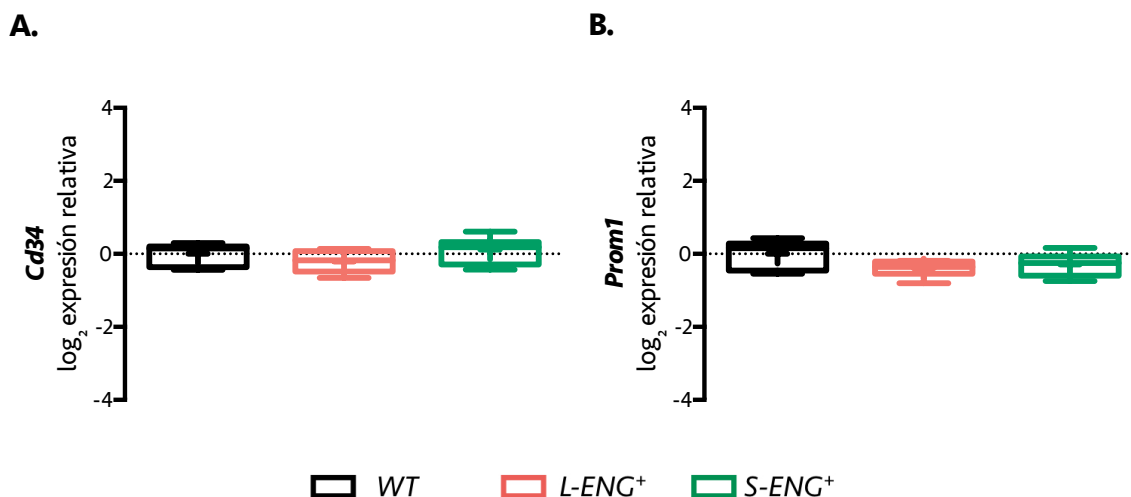


Figura 40. Expresión de marcadores de precursores endoteliales en retina

Análisis mediante qPCR de los niveles de expresión de *Cd34* (A) y *Prom1* (B). Los valores se representan como el logaritmo en base dos de la expresión relativa de cada muestra con respecto de las muestras *WT*. Se representa un *box plot* 10-90 percentil. *WT* (n=6), *L-ENG⁺* (n=6) y *S-ENG⁺* (n=7). Test estadístico ANOVA de una vía para *Prom1* y Kruskal-Wallis para *Cd34*.

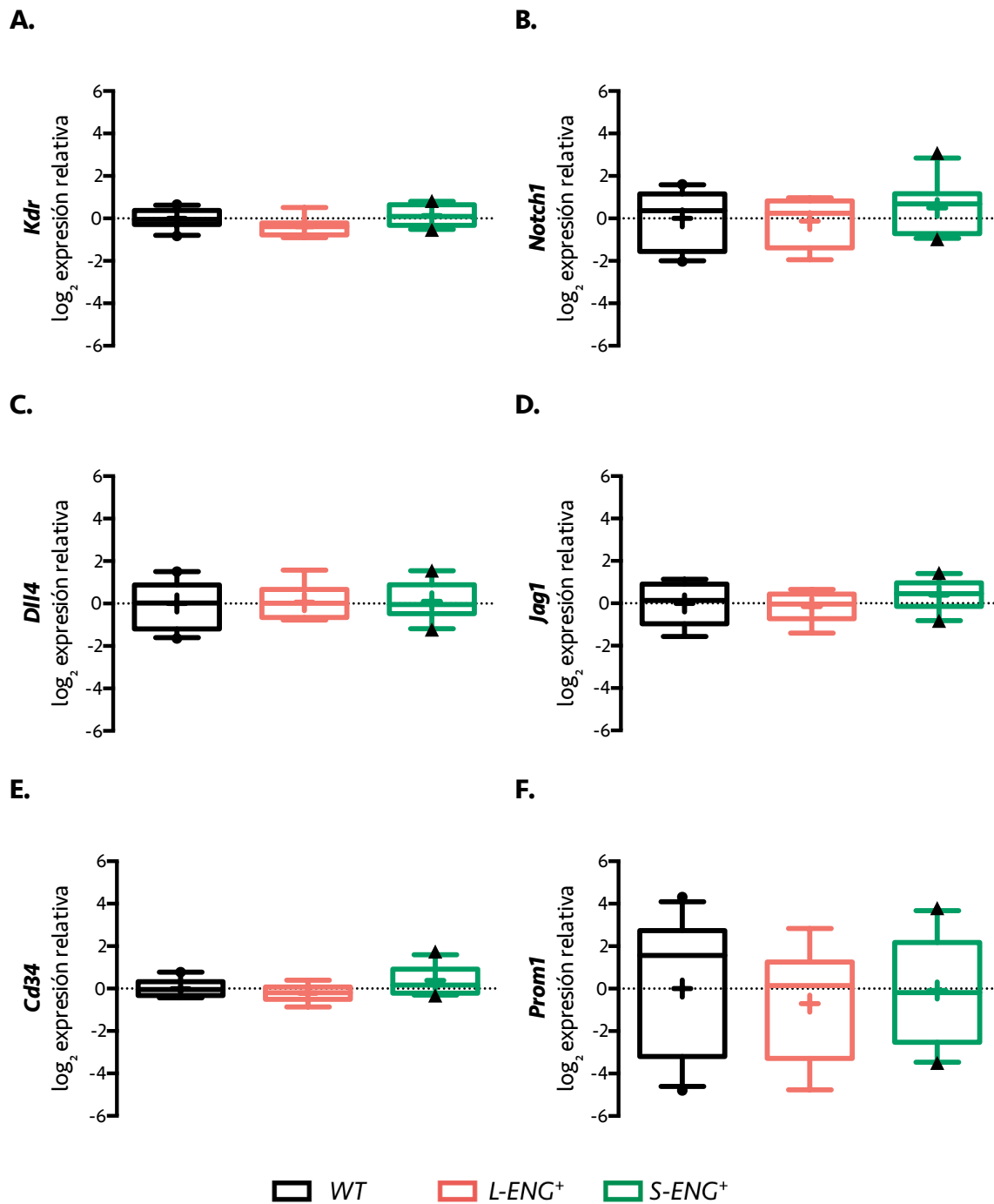


Figura 41. Expresión de marcadores de *sprouting* en *plugs* de Matrigel®

Análisis mediante qPCR de los niveles de expresión de *Kdr* (A), *Notch1* (B), *Dll4* (C), *Jag1* (D), *Cd34* (E) y *Prom1* (F). Los valores se representan como el logaritmo en base dos de la expresión relativa de cada muestra con respecto de las muestras WT. Se representa un *box plot* 10-90 percentil. WT (n=9), L-ENG⁺ (n=8) y S-ENG⁺ (n=10). Test estadístico ANOVA de una vía.

5.2. Análisis de la expresión de marcadores de *sprouting* en *plugs*

Para saber si las diferencias observadas en el EDAIV, y en general en angiogénesis, en respuesta a la sobreexpresión de las isoformas de endoglina, se debían a alteraciones en el proceso de *sprouting*, analizamos la expresión génica de marcadores de *sprouting*, tanto de células *tip* como de células *stalk*, así como de precursores endoteliales. Se analizó la expresión de al menos 8 *plugs* de, al menos, 6 ratones diferentes. Los resultados se muestran en la [Figura 41](#).

No se observa alteración alguna en la expresión de los genes de *sprouting* que codifican para Notch1, VEGFR2, Dll4 y Jagged1 en los *plugs* de ratones *L-ENG⁺* y *S-ENG⁺* con respecto a los *WT*, lo que sugiere que la respuesta de *sprouting* está directamente afectada por el aumento de expresión de endoglina. Además, tampoco hay diferencias en los niveles de expresión de *Cd34* y *Prom1* en ratones *L-ENG⁺* y *S-ENG⁺*, con respecto a los controles.

5.3. Utilización de un modelo *ex vivo* de *sprouting*: anillos de aorta en Matrigel®

Para comprobar directamente cómo tiene lugar el *sprouting* en nuestro modelo, se llevó a cabo un ensayo de cultivo de anillos de aorta aislados de las tres líneas de ratones transgénicos, y cultivados en Matrigel®. En estas condiciones, en un ambiente rico en factores proangiogénicos, que provienen tanto del medio de cultivo como del propio Matrigel®, se va a producir el *sprouting* de las células del endotelio del anillo.

5.3.1. Evaluación del crecimiento de *sprouts* a partir de anillos de aorta

Se hizo un seguimiento del crecimiento de *sprouts* a partir de anillos de aortas de ratones *WT*, *L-ENG⁺* y *S-ENG⁺*.

El crecimiento de *sprouts* comienza a partir del segundo día después de haber sembrado los anillos. Se anotó el número de células *tips* y de *sprouts* ya formados tras dos días y medio desde la siembra. Se dio el valor 1 a cada *tip* y el valor 2 a cada *sprout* de cada anillo y, sumando estos valores, obtuvimos para cada uno un valor que denominamos “tasa de *sprouting*”, que se muestra en la [Figura 42](#).

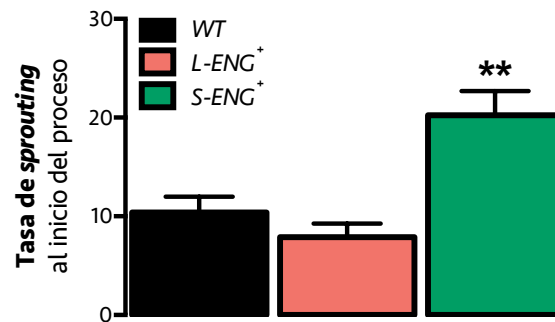


Figura 42. Sprouting de anillos de aorta en Matrigel® tras 2,5 días

Cuantificación del inicio del *sprouting* a partir del endotelio de anillos de aorta tras 2,5 días de su siembra: cantidad de células *tips* (+1) y *sprouts* (+2) formados. Cada barra representa la media \pm EEM. WT (n=42), L-ENG⁺ (n=42) y S-ENG⁺ (n=42). Test estadístico de Kruskal-Wallis: ** p<0,01 vs. WT.

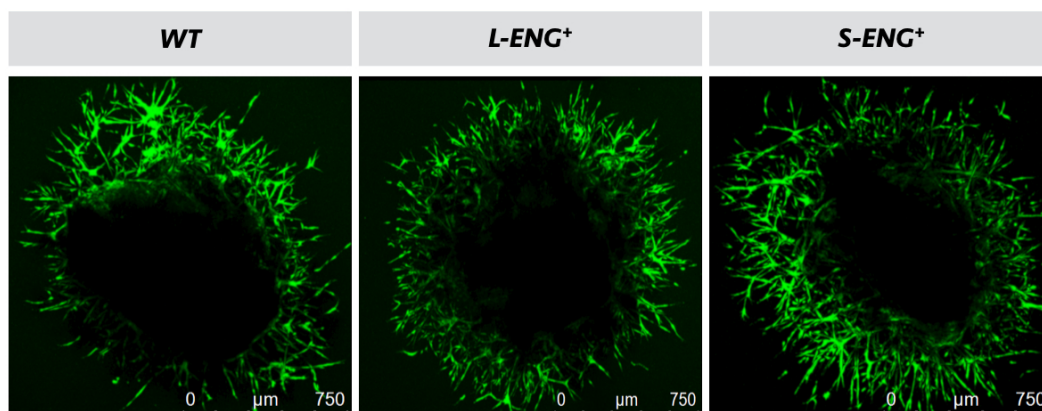
En un primer momento, los anillos de ratones S-ENG⁺ generan más *sprouts* que los ratones WT o L-ENG⁺.

En momentos posteriores no se puede hacer esta cuantificación, por lo que decidimos marcar los *sprouts* formados y analizarlos por microscopía. El día 5 tras la siembra, marcamos las células de los *sprouts* con calceína, colorante fluorescente intravital, y tomamos fotografías con un microscopio confocal de todos los planos focales del anillo. Cuantificamos el área ocupado por *sprouts* en cada plano y, sumando todos los valores de cada anillo, obtuvimos el valor del volumen que ocupaba la masa de *sprouts*.

Se analizaron al menos 20 anillos de 5 ratones diferentes, para cada línea de ratón. En la [Figura 43A](#) se muestran tres imágenes representativas de anillos de aortas de las tres líneas de ratones WT, L-ENG⁺ y S-ENG⁺. Se trata de la proyección máxima de las imágenes obtenidas para cada uno de los anillos. Además, se muestra la cuantificación del volumen de *sprouts* ([Figura 43B](#)).

Aunque se observa una tendencia hacia un *sprouting* reducido en los anillos de aortas de ratones L-ENG⁺ cuando se comparan con los de WT, tanto al inicio como a los 5 días de crecimiento, estas diferencias no llegan a ser significativas en ninguno de los dos casos. Al inicio del proceso, se observa una mayor diferenciación de las células endoteliales de los anillos de aorta de ratones S-ENG⁺ para dar lugar a *sprouts*, si se comparan con anillos WT. Sin embargo, estas diferencias iniciales se reducen hasta anularse durante los siguientes días de crecimiento.

A.



B.

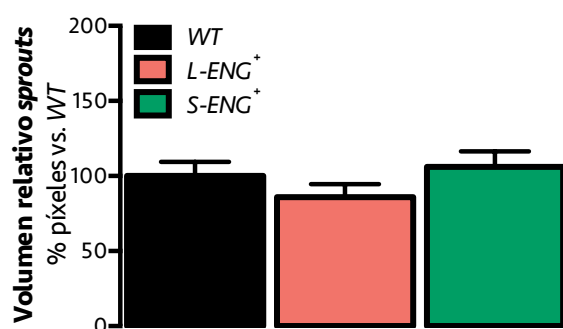


Figura 43. Volumen de *sprouts* formados a partir de anillos de aorta en Matrigel®

A. Microfotografías representativas de anillos de aortas. B. Representación de la cuantificación del volumen ocupado por *sprouts*, en píxeles. Cada barra representa la media \pm EEM. WT (n=25), L-ENG⁺ (n=20) y S-ENG⁺ (n=22). Test estadístico ANOVA de una vía.

5.3.2. Análisis de la expresión génica de marcadores de *sprouting* en anillos de aorta

Nuevamente analizamos los niveles de expresión de genes indicadores de estabilidad endotelial y de regulación del *sprouting*, recogidos en las [Tablas 14 y 15](#).

En la [Figura 44](#) se muestra la expresión de marcadores endoteliales, y en la [Figura 45](#) la expresión de genes implicados en la regulación del *sprouting* en este modelo, analizadas en 10 muestras de anillos aislados de 6 ratones.

No se observan diferencias significativas en cuanto a la expresión de estos marcadores entre las células de los *sprouts* de aortas procedentes de las tres líneas de ratones utilizadas.

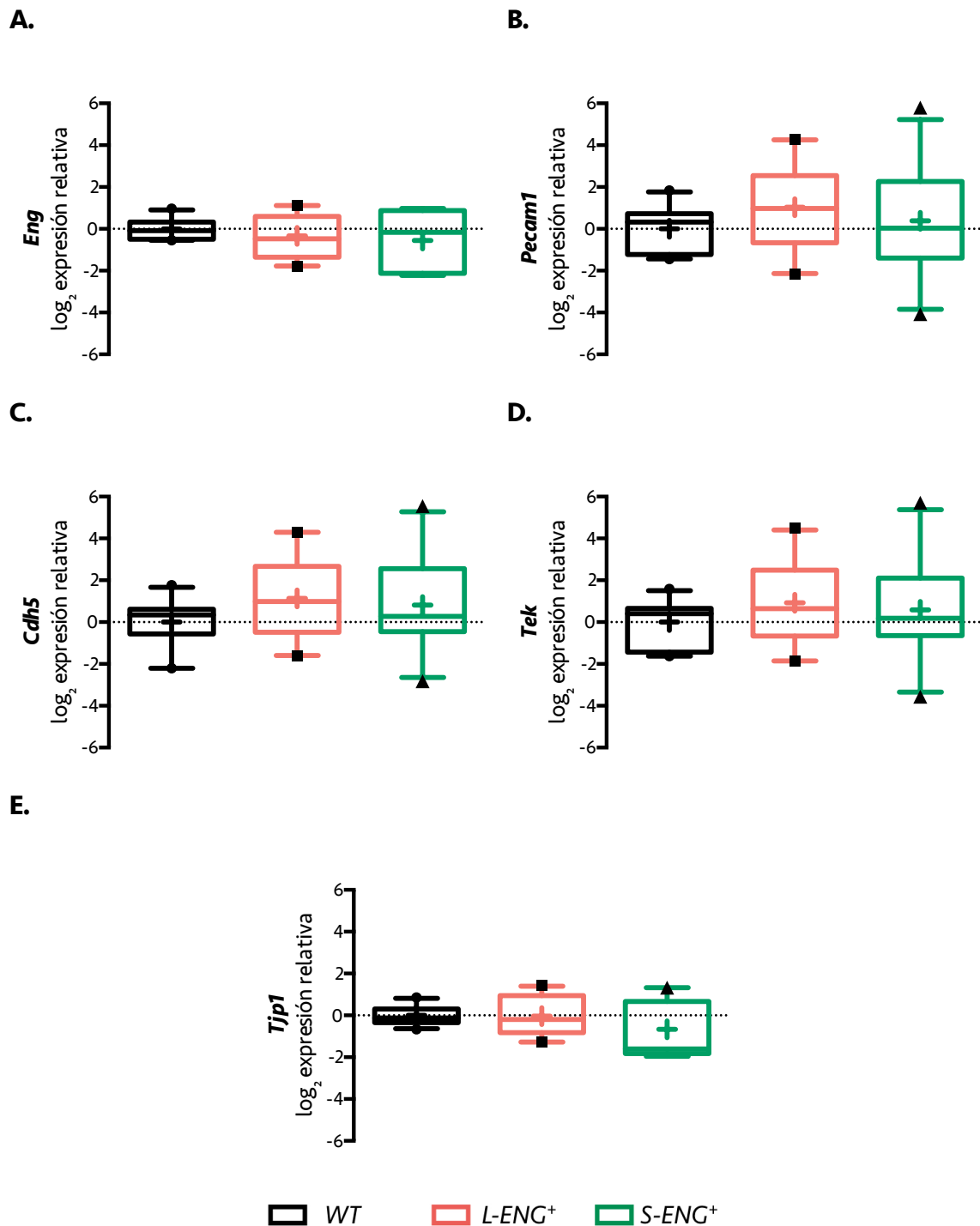


Figura 44. Expresión de marcadores endoteliales en anillos de aorta en Matrigel®

Análisis mediante qPCR de los niveles de expresión de *Eng* (A), *Pecam1* (B), *Cdh5* (C), *Tek* (D) y *Tjp1* (E). Los valores se representan como el logaritmo en base dos de la expresión relativa de cada muestra con respecto de las muestras WT. Se representa un *box plot* 10-90 percentil. WT (n=10), L-ENG⁺ (n=10) y S-ENG⁺ (n=9). Test estadístico ANOVA de una vía.

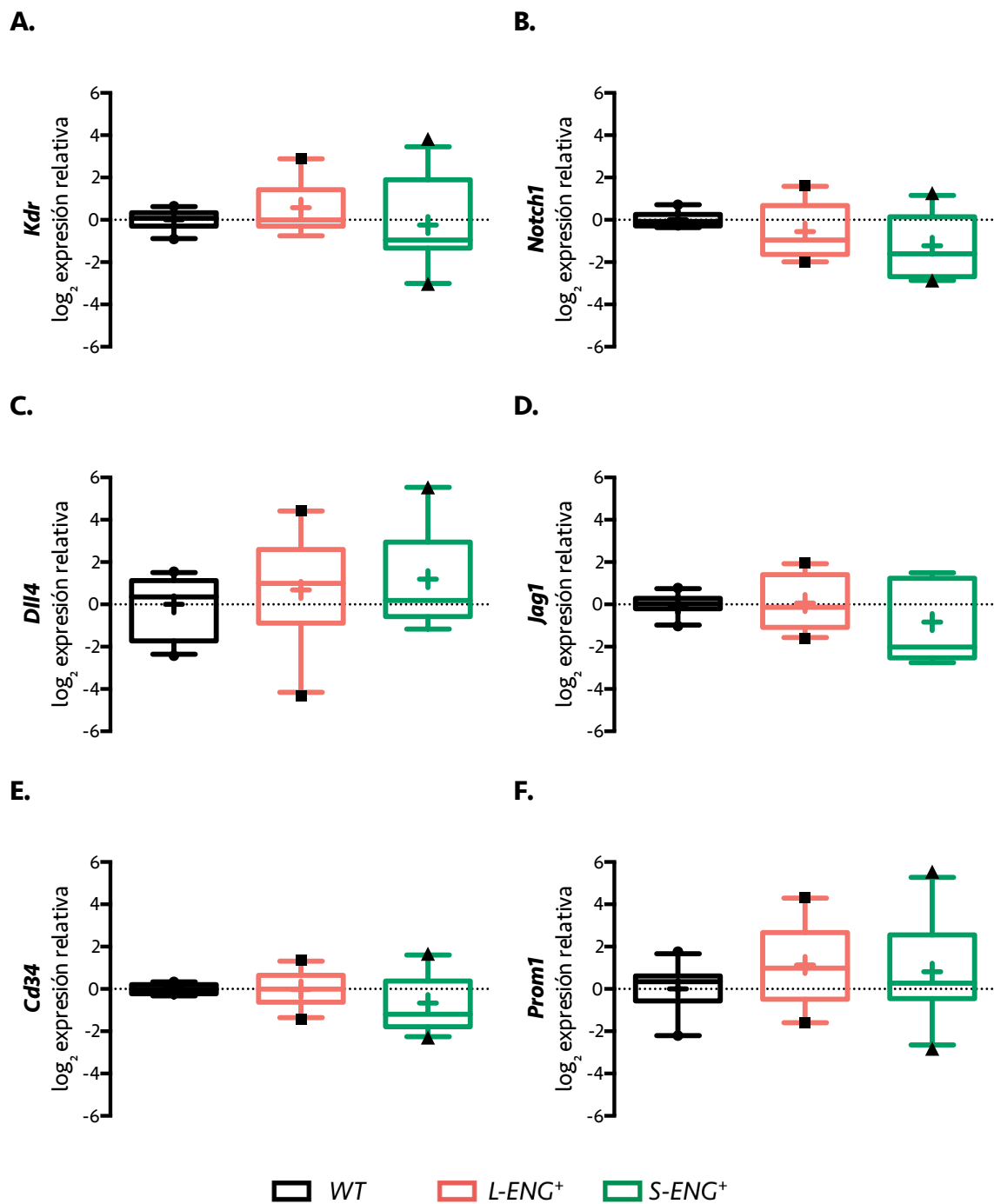


Figura 45. Expresión de marcadores de *sprouting* en anillos de aorta en Matrigel®

Análisis mediante qPCR de los niveles de expresión de *Kdr* (A), *Notch1* (B), *Dll4* (C), *Jag1* (D), *Cd34* (E) y *Prom1* (F). Los valores se representan como el logaritmo en base dos de la expresión relativa de cada muestra con respecto de las muestras WT. Se representa un *box plot* 10-90 percentil. WT (n=9), L-ENG⁺ (n=9) y S-ENG⁺ (n=9). Test estadístico ANOVA de una vía para *Kdr*, *Notch1*, *Dll4*, *Cd34* y *Prom1* y Kruskal-Wallis para *Jag1*.

Con este análisis confirmamos, al que igual que sucedía en retina y en los *plugs* de Matrigel®, no hay diferencias significativas en la expresión de genes implicados en la regulación del *sprouting* tras la sobreexpresión de L-endoglina o de S-endoglina.

6. Generación de modelos celulares para el estudio del efecto de la sobreexpresión de las isoformas de endoglina en la angiogénesis

6.1. Células endoteliales de pulmón (MLEC) de ratones *WT*, *L-ENG^t* y *S-ENG^t*

Para analizar diversos parámetros de la fisiología celular en respuesta a la sobreexpresión de L o S-endoglina, aislamos células endoteliales de pulmón (MLEC) de las líneas de ratones *WT*, *L-ENG^t* y *S-ENG^t*. Las tres líneas celulares presentan una morfología similar.

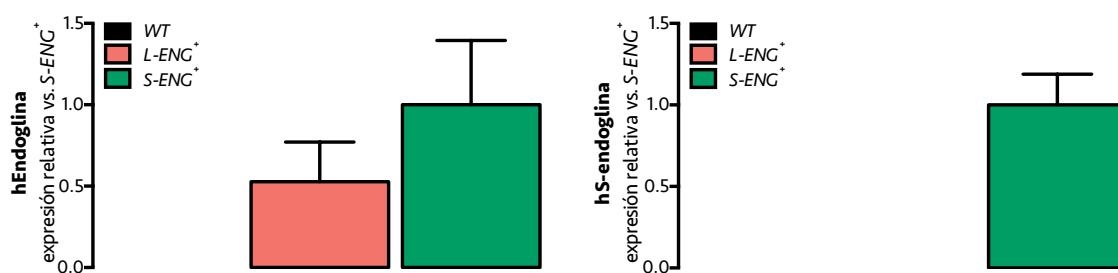
Comprobamos que, una vez purificadas las MLEC, las que procedían de ratones *L-ENG^t* y *S-ENG^t* mantenían la sobreexpresión de una u otra isoforma de endoglina, respectivamente, al crecer en cultivo. Para ello analizamos la expresión del ARNm de endoglina total y S-endoglina humanas por qPCR, así como los niveles de endoglina humana y el *tag* HA, por *Western blot* de lisados de MLEC. Además, analizamos la expresión de endoglina humana por citometría de flujo y por inmunofluorescencia en estas células. Los resultados se muestran en la [Figura 46](#).

Observamos cómo sólo las MLEC *L-ENG^t* y *S-ENG^t* expresan endoglina humana cuando se estudia por qPCR, por *Western blot*, por citometría de flujo o por inmunofluorescencia la expresión de endoglina total. Igualmente, sólo estas dos líneas, *L-ENG^t* y *S-ENG^t*, expresan HA *tag*, analizado por *Western blot*. Sólo las células *S-ENG^t* expresan S-endoglina humana, como revela el resultado de qPCR.

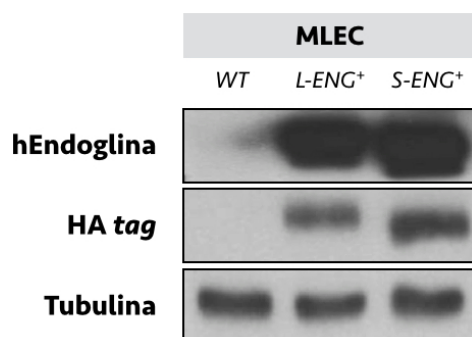
6.2. Línea de células endoteliales humanas que sobreexpresan L-endoglina o S-endoglina

Utilizamos una línea celular endotelial humana (de origen comercial), EA.hy926, que infectamos de forma estable bien con un vector portador del gen de L-endoglina humana, o bien de S-endoglina humana (*L-ENG^t* y *S-ENG^t* respectivamente), o con el mismo vector vacío (línea control, *Mock*). Este modelo nos permitiría comprobar la respuesta en células endoteliales humanas, y además generamos así líneas celulares, mucho más versátiles que los cultivos primarios. Las tres líneas celulares presentan una morfología similar.

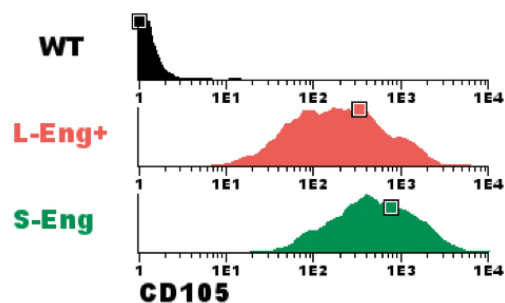
A.



B.



C.



D.

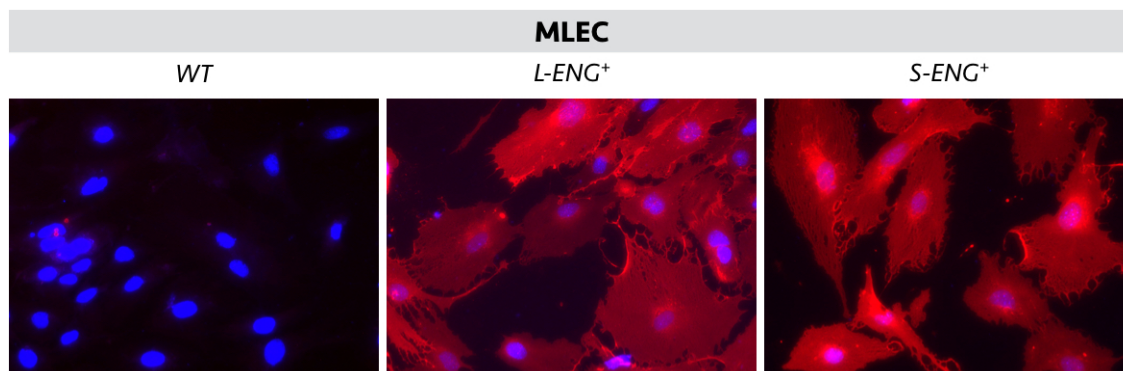
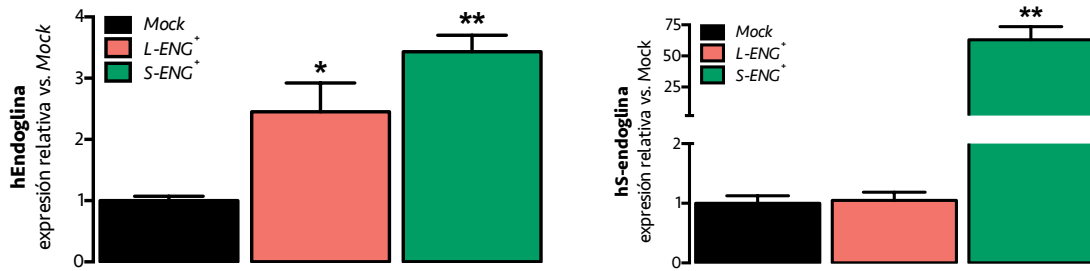


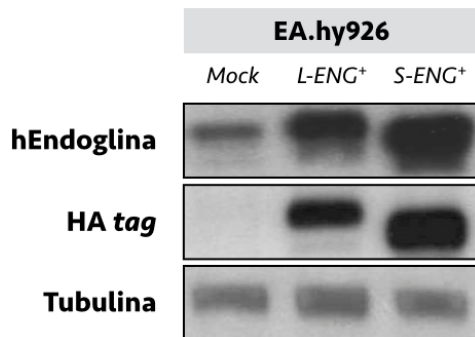
Figura 46. Expresión de L-endoglyna y S-endoglyna humanas en MLEC

A. Expresión del ARNm endoglyna total y de S-endoglyna, analizada mediante qPCR. Cada barra representa la media \pm EEM. B. Niveles de la proteína endoglyna humana y de HA tag analizados por *Western blot*. C. Niveles de la proteína endoglyna humana, medidos mediante citometría de flujo. D. Microfotografías: inmunofluorescencia de endoglyna humana.

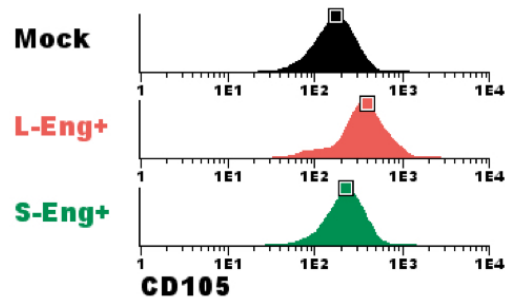
A.



B.



C.



D.

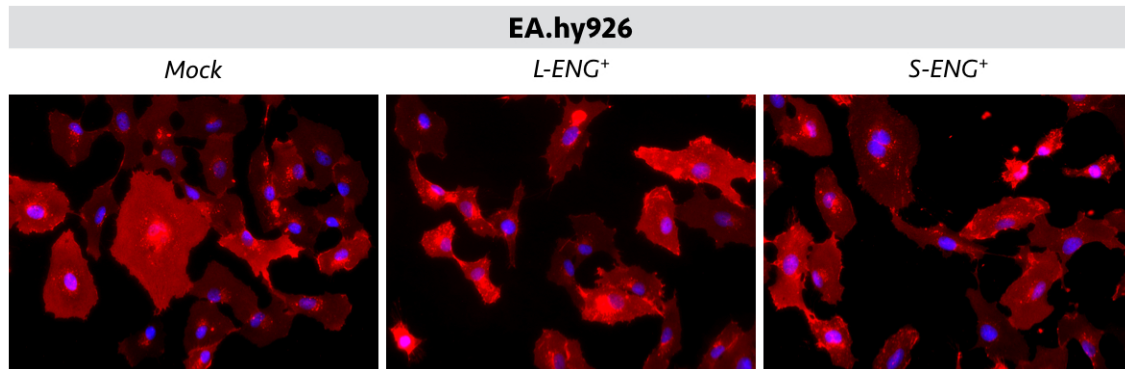


Figura 47. Expresión de L-endoglyna y S-endoglyna humanas en células EA.hy926

A. Expresión del ARNm endoglyna total y de S-endoglyna, analizada mediante qPCR. Cada barra representa la media \pm EEM. B. Niveles de la proteína endoglyna humana y de HA tag analizados por *Western blot*. C. Niveles de la proteína endoglyna humana, medidos mediante citometría de flujo. D. Microfotografías: inmunofluorescencia de endoglyna humana. Test estadístico ANOVA de una vía : * $p < 0,05$ vs. WT; ** $p < 0,01$ vs. WT.

Observamos que las tres líneas de células EA.hy926, *WT*, *L-ENG⁺* y *S-ENG⁺*, expresan endoglina humana cuando se estudia por qPCR, por *Western blot*, por citometría de flujo o por inmunofluorescencia la expresión de endoglina total. Mediante qPCR, *Western blot* y citometría de flujo se demuestra que las células *L-ENG⁺* sobreexpresan L-endoglina humana, y las células *S-ENG⁺* sobreexpresan S-endoglina humana. Sólo estas dos líneas, *L-ENG⁺* y *S-ENG⁺*, expresan HA tag (Figura 47).

7. Análisis de la proliferación celular de células endoteliales en cultivo en respuesta a la sobreexpresión de endoglina

Para este estudio, en primer lugar se llevó a cabo recuento directo del número de células tras 72 horas en cultivo. Se necesitan muchas células para un recuento fiable, por lo que no hicimos el experimento en el cultivo primario de MLEC, sino sólo con la línea celular EA.hy926. Para ello, sembramos el mismo número de células de las tres líneas, *Mock*, *L-ENG⁺* y *S-ENG⁺*, por duplicado. Una placa se recontó a las 8 horas, como control de siembra. La otra a las 72 horas. Se representaron los datos como tanto por ciento de crecimiento a las 72 horas con respecto al número de células que había a las 8 horas, tal y como se muestra en la Figura 48.

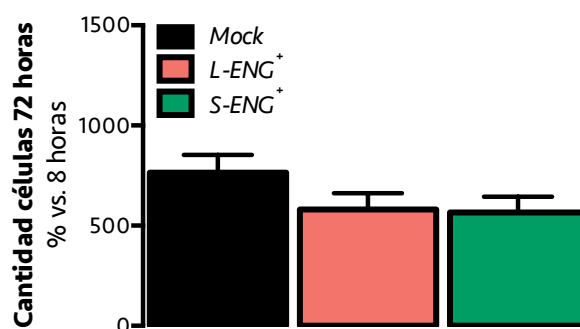


Figura 48. Número de células EA.hy926 tras 72 horas en cultivo

Tasa de crecimiento de las células. Cada barra representa la media \pm EEM. El resultado representa la media de 3 experimentos. Test estadístico ANOVA de una vía.

Las líneas celulares *L-ENG⁺* y *S-ENG⁺* muestran una tendencia hacia una proliferación reducida, en comparación con las células *Mock*, si bien estas diferencias no son significativas.

Analizamos la incorporación de BrdU en nuestros modelos celulares en cultivo, tanto en las células EA.hy926 como en el cultivo primario de MLEC (Figura 49).

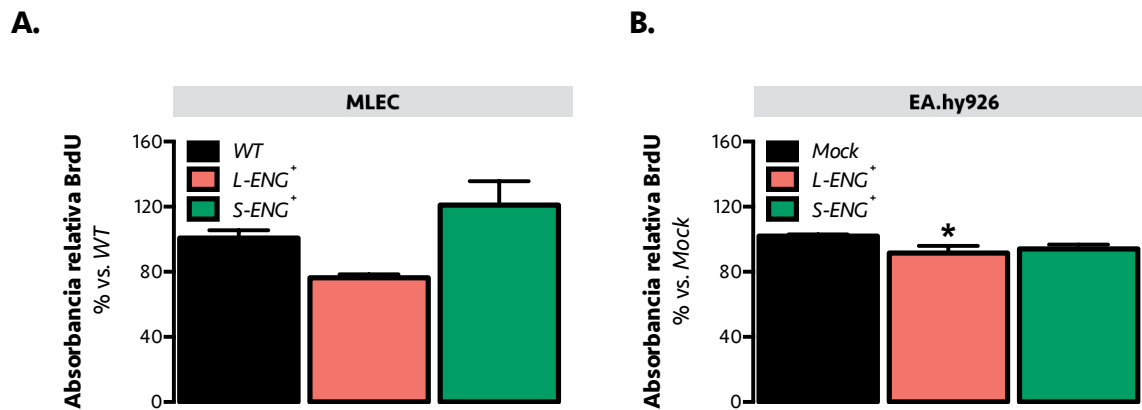


Figura 49. Incorporación de BrdU por las células endoteliales en cultivo

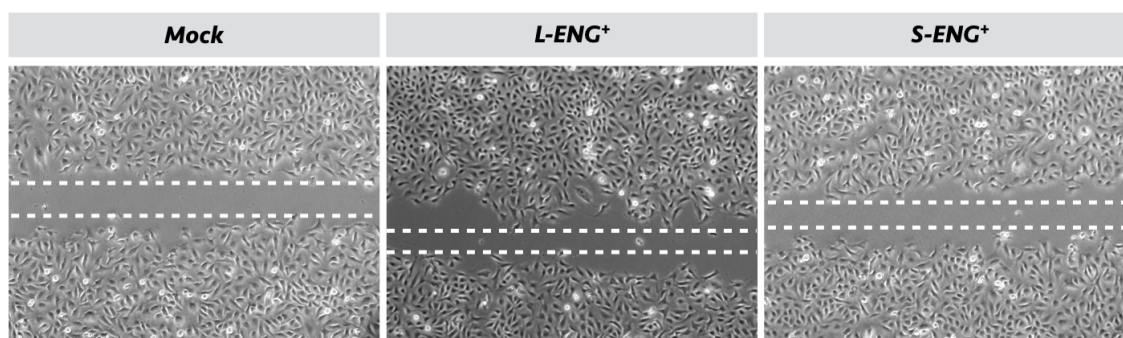
A. Incorporación de BrdU en MLEC en cultivo. B. Incorporación de BrdU en células EA.hy926 en cultivo. Cada barra representa la media ± EEM. Los resultados representan la media de 3 experimentos en cada caso. Test estadístico ANOVA de una vía: * p<0,05 vs. WT.

En la línea celular EA.hy926 se observa que la sobreexpresión de L-endoglina reduce la proliferación de las células endoteliales de forma significativa. En cuanto a la sobreexpresión de S-endoglina, su efecto es más dudoso, puesto que no muestran diferencias significativas. Las MLEC L-ENG⁺ parecen proliferar menos, pero estas diferencias no son estadísticamente significativas mediante el ANOVA de una vía; sin embargo, la comparación mediante “t de Student” de las células L-ENG⁺ con sus controles WT ofrece un p valor de 0,0026. Las células S-ENG⁺ no presentan diferencias con las células control.

8. Análisis de la motilidad y la invasividad de células endoteliales en cultivo en respuesta a la sobreexpresión de endoglina

En primer lugar se cuantificó la distancia migrada por las células EA.hy926 Mock, L-ENG⁺ y S-ENG⁺, en el ensayo denominado de *scratch*. Se trata de una primera aproximación que nos habla de la motilidad de las células, es decir, de su capacidad para avanzar en una superficie de cultivo. Los resultados se muestran en la Figura 50.

A.



B.

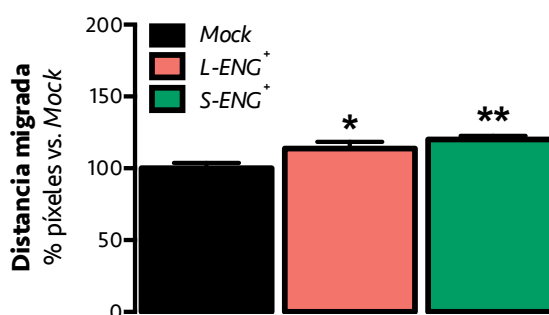


Figura 50. Distancia migrada por las células EA.hy926 en el ensayo de *scratch*

Tanto por ciento de la distancia migrada por las células EA.hy926 tras 14,5 horas desde que se hizo el *scratch* en la monocapa, con respecto a la distancia migrada por las células *Mock*. Cada barra representa la media \pm EEM. El resultado representa la media de 3 experimentos. Test estadístico ANOVA de una vía: * $p < 0,05$ vs. WT; ** $p < 0,01$ vs. WT.

El resultado indica una mayor motilidad en este tipo de ensayo tras la sobreexpresión tanto de L-endogлина como de S-endogлина en este tipo celular, comparados con las células *Mock*.

Quisimos también utilizar una aproximación experimental que, por un lado, simulase un ambiente proangiogénico gracias a la creación de un gradiente de citoquinas, particularmente de VEGF, y por otro, que además se imitasen las condiciones de la MEC que deben atravesar las células endoteliales en su proceso de migración.

Así, analizamos la transmigración a través de *transwell* sin y con Matrigel® de MLEC WT, L-ENG⁺ y S-ENG⁺, y EA.hy926 *Mock*, L-ENG⁺ y S-ENG⁺. Además, obtuvimos la curva de

regresión que mejor se ajustaba a nuestros resultados; concretamente se empleó una curva de regresión cuadrática para las MLEC y un modelo de asociación en dos fases para las células EA.hy926. A partir de la curva de regresión, pudimos conocer el tiempo promedio en horas (valor de x) que tarda cada línea celular en alcanzar una tasa de migración (valor de y) del 50% con respecto al 100%, correspondiente en este caso a la tasa de migración de las células control en cada caso, a las 48 horas. Los resultados de migración e invasión de la MEC a través de *transwell* se reflejan en la **Figuras 51 y 52**, respectivamente.

En las MLEC, en el conjunto de los resultados de las células *L-ENG^t*, la migración es significativamente más rápida que la de las células control, *WT*, aunque no hayan diferencias significativas si se comparan tiempos concretos. Hay que considerar la menor proliferación de las células *L-ENG^t*, ya que, al tratarse de un ensayo a 48 horas, periodo en el que las células pueden haber sufrido varios ciclos de división, las diferencias observadas en el número de células que atraviesan el *transwell* puede verse reducida. No se observan diferencias entre las MLEC *S-ENG^t* y la línea control, *WT*. En la línea celular EA.hy926, se observan diferencias tanto en las células *L-ENG^t* como en las *S-ENG^t*, con respecto a las células control. En un primer momento, la curva formada por las células *L-ENG^t* no muestra diferencias con la que forman las células *Mock*; pero éstas son visibles a tiempos tardíos, de 24 y 48 horas. Sucede lo contrario con las células *S-ENG^t*, que muestran diferencias durante el primer día pero no después. En cualquier caso, ambas líneas celulares muestran una mayor capacidad de migración hacia el estímulo angiogénico VEGF.

En cuanto a la invasividad del Matrigel® que presentan las células endoteliales en respuesta a la sobreexpresión de las isoformas de endoglina, las células del cultivo primario MLEC *L-ENG^t* invaden más el Matrigel® que las *WT*, mientras que no se observa ninguna diferencia en las células MLEC *S-ENG^t* con respecto a sus controles, *WT*. Las diferencias para la línea *L-ENG^t* no son muy grandes, pero sí significativas, y nuevamente hay que considerar la menor proliferación de las células *L-ENG^t* en comparación con la línea control *WT*. La sobreexpresión de endoglina corta en las células EA.hy926 *S-ENG^t* reduce la invasión de la MEC en dirección al foco de VEGF cuando se comparan con las *Mock*. Las células EA.hy926 *L-ENG^t* muestran una tendencia a una mayor invasividad del Matrigel® hacia el estímulo angiogénico, al compararlas con las células control, sin llegar a ser estas diferencias significativas.

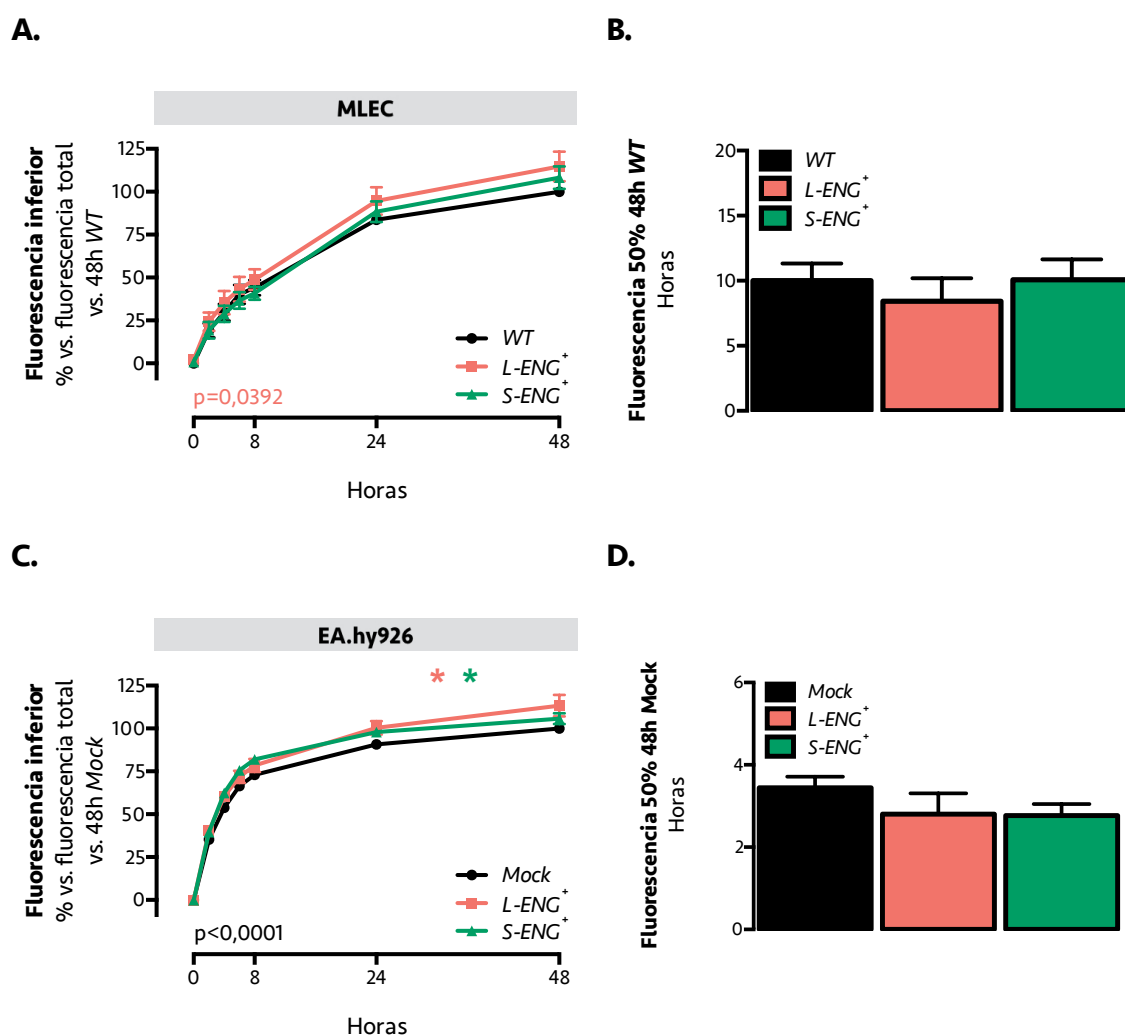


Figura 51. Transmisión de células endoteliales en un gradiente de VEGF

A. Tanto por ciento de células MLEC que migran a lo largo del tiempo, atraídas por un gradiente de VEGF, y pasan al compartimento inferior del *transwell*, con respecto a las células WT que pasan a las 48 horas. B. Valor promedio del número de horas que tarda cada línea celular de MLEC en alcanzar una tasa de migración del 50% respecto a la de las células WT a las 48h. C. Tanto por ciento de células EA.hy926 que migran a lo largo del tiempo, atraídas por un gradiente de VEGF, y pasan al compartimento inferior del *transwell*, con respecto a las células Mock que pasan a las 48 horas. D. Valor promedio del número de horas que tarda cada línea de células EA.hy926 en alcanzar una tasa de migración del 50% respecto a la de las células Mock a las 48h. En A. y C., cada punto representa la media \pm EEM. En B. y D., se representa el valor de x interpolado para $y=50 \pm$ límites mínimo y máximo, con un intervalo de confianza del 95%. Los resultados representan la media de 3 experimentos en cada caso. Test estadístico ANOVA de doble vía de medidas repetidas: * $p<0,05$ vs. Mock.

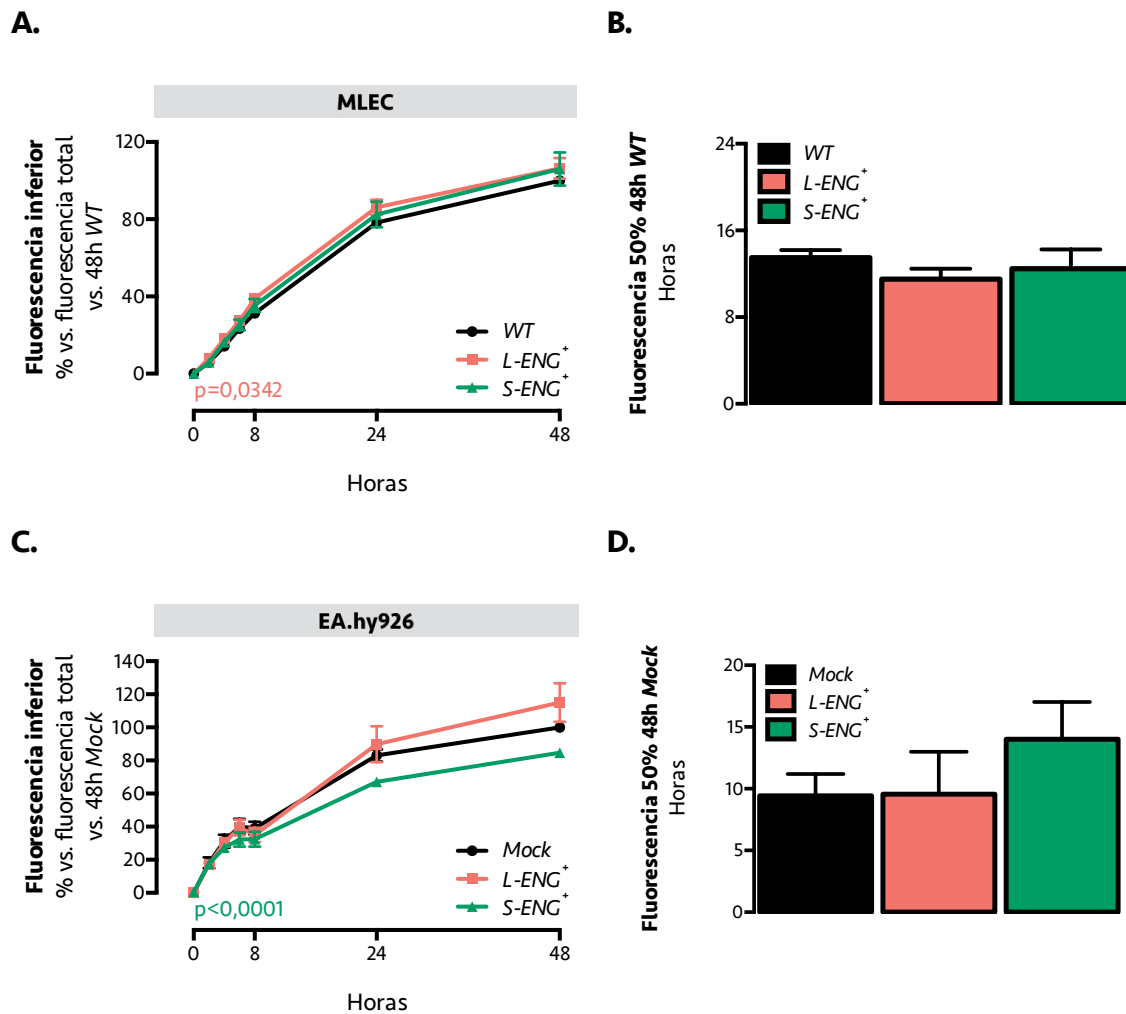


Figura 52. Transmisión de células endoteliales a través de Matrigel®

A. Tanto por ciento de células MLEC que invaden el Matrigel® a lo largo del tiempo, atraídas por un gradiente de VEGF, y pasan al compartimento inferior del *transwell*, con respecto a las células WT que pasan a las 48 horas. B. Valor promedio del número de horas que tarda cada línea celular de MLEC en alcanzar una tasa de invasión del Matrigel® del 50% respecto a la de las células WT a las 48h. C. Tanto por ciento de células EA.hy926 que invaden el Matrigel® a lo largo del tiempo, atraídas por un gradiente de VEGF, y pasan al compartimento inferior del *transwell*, con respecto a las células Mock que pasan a las 48 horas. D. Valor promedio del número de horas que tarda cada línea de células EA.hy926 en alcanzar una tasa de invasión del Matrigel® del 50% respecto a la de las células Mock a las 48h. En A. y C., cada punto representa la media \pm EEM. En B. y D., se representa el valor de x interpolado para $y=50 \pm$ límites mínimo y máximo, con un intervalo de confianza del 95%. Los resultados representan la media de 3 experimentos en cada caso. Test estadístico ANOVA de doble vía de medidas repetidas.

9. Análisis del efecto de la sobreexpresión de endogлина en la formación de estructuras similares a capilares *in vitro*

Para este estudio, sembramos las líneas EA.hy926 *Mock*, *L-ENG⁺* y *S-ENG⁺* sobre Matrigel® y, tras 12 horas en cultivo, observamos la formación de pseudocapilares.

Tomamos microfotografías de todo el pocillo, que digitalizamos y analizamos con el *software Fiji*. Obtuvimos datos relativos al número de ramas y su longitud, y al número de puntos de unión. Una imagen representativa de los pseudocapilares formados por cada una de las tres líneas celulares, así como los resultados de la cuantificación estructural, se muestran en la [Figura 53](#).

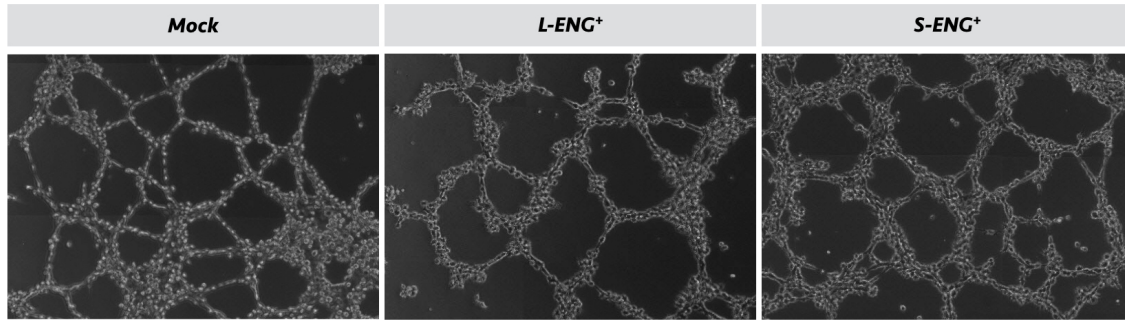
La sobreexpresión de L-endogлина en estas células hace que se organicen de forma bidimensional formando redes con menos ramificaciones y puntos de unión o nexos que las células *WT*, esto es, se trata de una agrupación más lineal y menos ramificada. Asimismo, las ramas *L-ENG⁺* muestran una tendencia a presentar una mayor longitud, siendo la longitud máxima de las ramas *L-ENG⁺* mayor que la de las células *WT*. Este efecto no se observa en las células *S-ENG⁺*, que no muestran diferencias con las controles *WT* en ninguno de estos parámetros.

10. Estudio del efecto de la sobreexpresión de endogлина sobre la maduración vascular en la angiogénesis

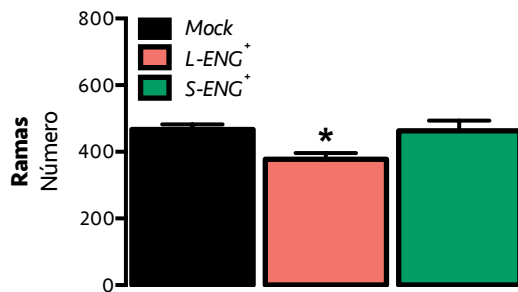
Para estudiar este proceso, utilizamos las muestras de modelos de angiogénesis *in vivo* de que disponíamos y analizamos la expresión de marcadores de células murales. Concretamente, en muestras de retinas y *plugs* lo que vamos a encontrar son fundamentalmente vasos pequeños, mayoritariamente capilares, donde la cobertura mural la constituyen los pericitos.

Los marcadores de células murales analizados, pericitos, pero también CMLV, se recogen en la [Tabla 16](#).

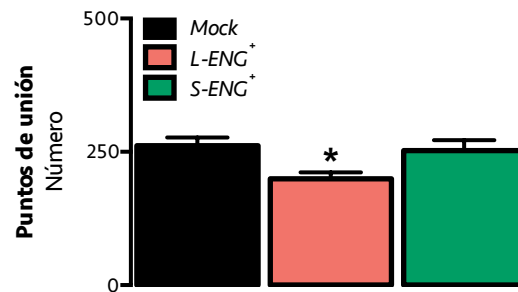
A.



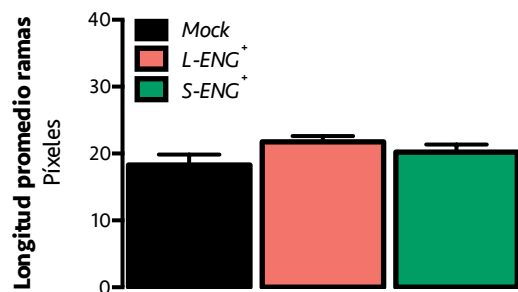
B.



C.



D.



E.

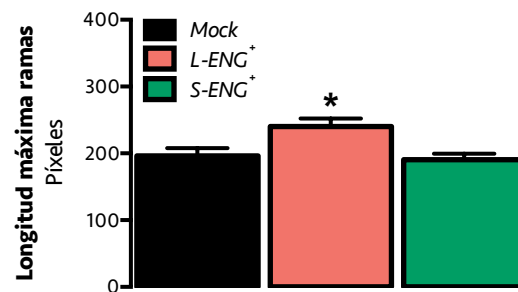


Figura 53. Análisis de las estructuras similares a capilares formadas por células endoteliales en Matrigel®

A. Microfotografías representativas de los “pseudocapilares” formados por las células EA.hy926 en cultivo. Cuantificación de los componentes estructurales de la red de pseudocapilares: número de ramas por imagen (B), cuantificación del número de puntos de unión por imagen (C), longitud promedio de las ramas de cada imagen (D) y promedio de la longitud de la rama más larga de cada imagen (E). Cada barra representa la media \pm EEM. El resultado representa la media de 3 experimentos. Test estadístico ANOVA de una vía: * $p < 0,05$ vs. WT.

Tabla 16. Relación de marcadores de células murales analizados mediante qPCR

| Gen | Proteína | Marcador de |
|---------------|--|---|
| <i>Cspg4</i> | Cspg4 o NG2 | Pericitos , precursores de oligodendrocitos. (Dawson <i>et al</i> , 2000; Crisan <i>et al</i> , 2012; Kelly-Goss <i>et al</i> , 2014) |
| <i>Pdgfrb</i> | PDGFR-β | Pericitos, CMLV , fibroblastos, células pigmentadas de la retina, células mieloides, macrófagos. (Heldin & Westermarck, 1999; Kelly-Goss <i>et al</i> , 2014). |
| <i>Acta2</i> | Actina de músculo liso vascular (α-SMA) | Pericitos, CMLV , fibroblastos, monocitos, macrófagos. (Gabbiani <i>et al</i> , 1984; Ludin <i>et al</i> , 2012; Kelly-Goss <i>et al</i> , 2014) |

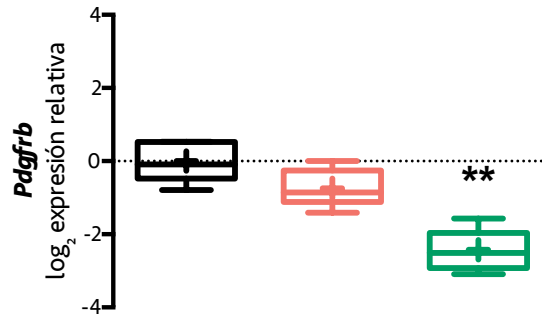
En primer lugar, analizamos la expresión del receptor β de PDGF en retinas de crías de 17 días de ratones *WT*, *L-ENG⁺* y *S-ENG⁺*. La región que aislamos de la retina, la neurorretina o NFL (del inglés, *Nerve Fiber Layer*), que es la capa vascularizada, y que además de vasos sanguíneos consta de nervios y tejido conjuntivo (Chow & Lang, 2001). Por tanto, hay que analizar cuidadosamente los datos obtenidos, puesto que los fibroblastos y posibles macrófagos residentes en el tejido pueden expresar *Pdgfrb*, si bien las células murales son quienes lo expresan en más altos niveles. Se analizaron 8 retinas por cada línea de ratón transgénico. Los resultados se muestran a continuación, en la [Figura 54](#).

En el análisis de la expresión global del marcador *Pdgfrb*, observamos que no hay diferencias en cuanto al número de células positivas para este marcador entre las retinas de ratones *L-ENG⁺* y ratones *WT*. Por el contrario, los ratones *S-ENG⁺* presentan menor cantidad de células que expresen este gen. Si expresamos los niveles de mensajero de *Pdgfrb* en función de la expresión de marcadores de células endoteliales, podemos aproximarnos al ratio célula mural / célula endotelial de la muestra. En este caso, no hay diferencias en ninguna de las dos líneas de ratones transgénicos con respecto al control. Por tanto, esto nos lleva a pensar que, corroborando los resultados previos, los ratones *S-ENG⁺* presentan una menor vascularización de la retina, pero que la cobertura mural, expresada como proporción de células murales por cada célula endotelial, no se encuentra alterada.

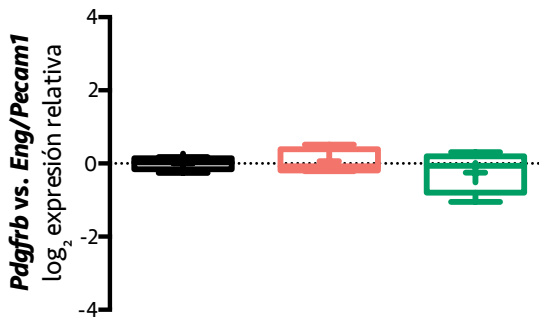
También se llevó a cabo el estudio de la expresión de *Cspg4*, pero en estas muestras la expresión es tan baja que no pudo ser detectada mediante qPCR. No se analizó la expresión de

Acta2 puesto que este gen se expresa en altos niveles en fibroblastos y, al tratarse de un tejido, con su correspondiente tejido conjuntivo, este análisis no respondería a nuestra pregunta.

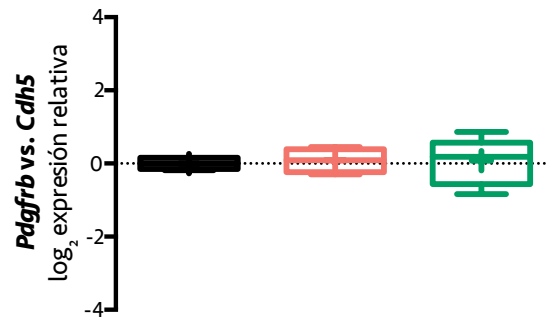
A.



B.



C.



WT
 L-ENG⁺
 S-ENG⁺

Figura 54. Expresión de un marcador de células murales en retina

Análisis mediante qPCR de los niveles de expresión de *Pdgfrb* (A), *Pdgfrb* vs. *Eng/Pecam1* (B) y *Pdgfrb* vs. *Cdh5* (C). Los valores se representan como el logaritmo en base dos de la expresión relativa de cada muestra con respecto de las muestras WT. Se representa un *box plot* 10-90 percentil. WT (n=5), L-ENG⁺ (n=5) y S-ENG⁺ (n=7). Test estadístico ANOVA de una vía: ** p<0,01 vs. WT.

El análisis en retina sólo contempla un marcador de células murales y su análisis puede resultar controvertido al tratarse de un tejido. Por ello, quisimos analizar más ampliamente la cobertura mural de los vasos formados en nuestros ratones mediante el análisis de marcadores de células murales en los vasos de los *plugs*. Se analizaron como mínimo 8 *plugs* de, al menos, 6 ratones diferentes. Los resultados obtenidos se muestran en la [Figura 55](#).

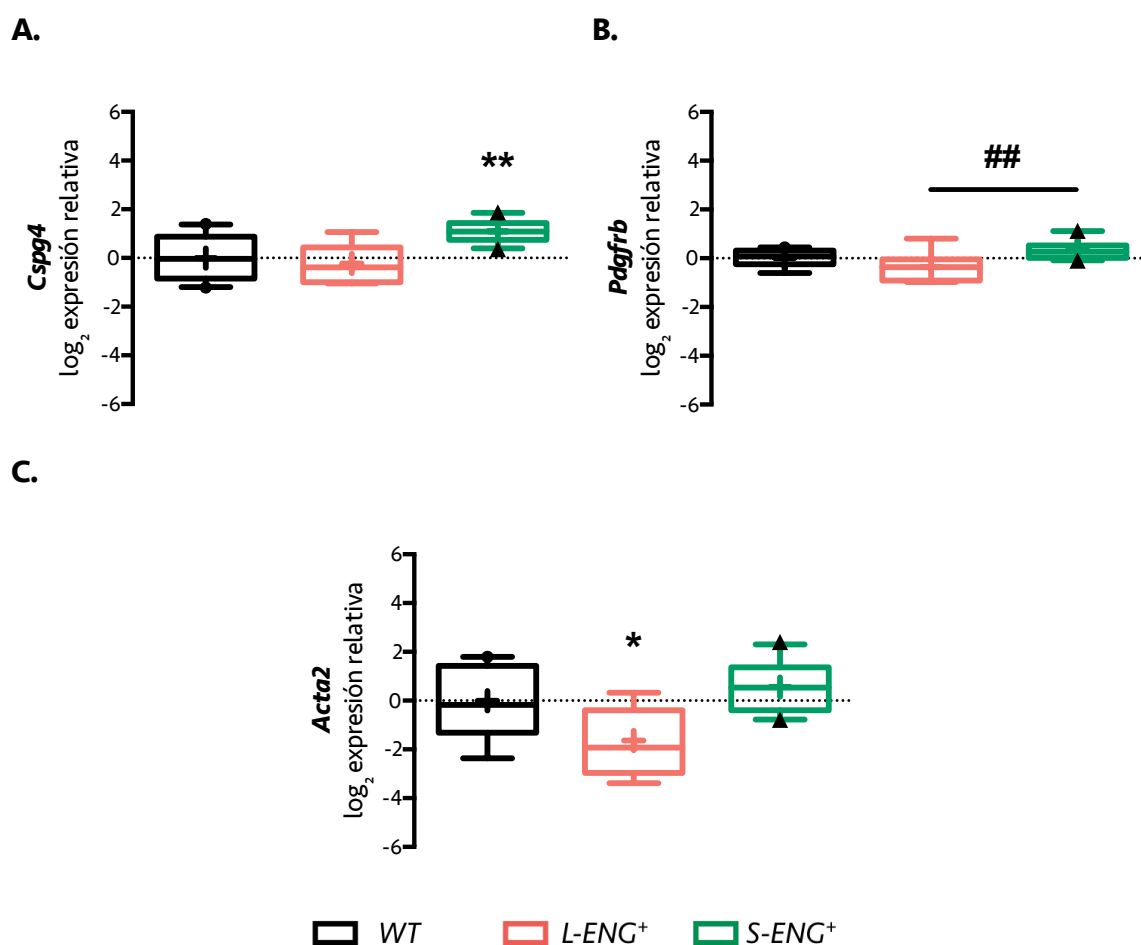


Figura 55. Expresión de marcadores de células murales en *plugs* de Matrigel®

Análisis mediante qPCR de los niveles de expresión de *Cspg4* (A), *Pdgfrb* (B) y *Acta2* (C). Los valores se representan como el logaritmo en base dos de la expresión relativa de cada muestra con respecto de las muestras WT. Se representa un *box plot* 10-90 percentil. WT (n=9), L-ENG⁺ (n=8) y S-ENG⁺ (n=10). Test estadístico ANOVA de una vía: * p<0,05 vs. WT; ** p<0,01 vs. WT; ### p<0,01, S-ENG⁺ vs. L-ENG⁺.

Se observa una tendencia a una reducida expresión de marcadores murales en *plugs* de ratones L-ENG⁺ con respecto a ratones control, mientras que la sobreexpresión de S-endoglina se traduce en un aumento de los niveles de marcadores de células murales, destacando *Cspg4*.

Nuevamente, para conocer la expresión de estos marcadores en función de la expresión de marcadores endoteliales, y aproximarnos así al ratio célula mural / célula endotelial de la muestra del *plug*, representamos estos datos relativizados por la expresión, tanto de *Eng* y *Pecam1* por un lado, como de *Tek*, exclusivamente endotelial, por otro. Los resultados se representan en la [Figura 56](#).

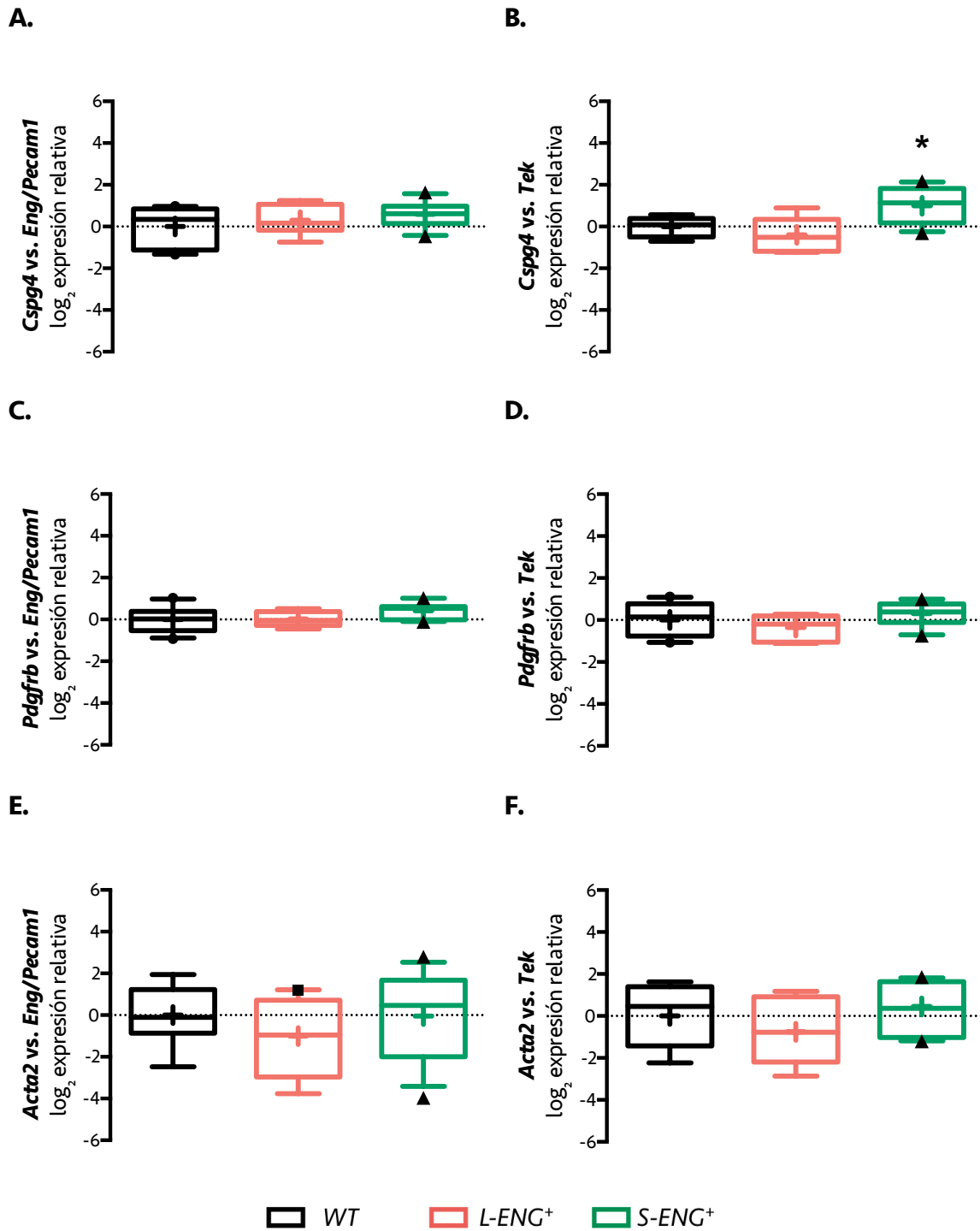


Figura 56. Expresión de marcadores de células murales relativizados por la expresión de marcadores endoteliales, en *plugs* de Matrigel®

Análisis mediante qPCR de los niveles de expresión de *Cspg4* vs. *Eng/Pecam1* (A), *Cspg4* vs. *Tek* (B), *Pdgfrb* vs. *Eng/Pecam1* (C), *Pdgfrb* vs. *Tek* (D), *Acta2* vs. *Eng/Pecam1* (E) y *Acta2* vs. *Tek* (F). Los valores se representan como el logaritmo en base dos de la expresión relativa de cada muestra con respecto de las muestras WT. Se representa un *box plot* 10-90 percentil. WT (n=8), L-ENG⁺ (n=7) y S-ENG⁺ (n=10). Test estadístico ANOVA de una vía: * p<0,05 vs. WT.

Observamos que se mantienen las diferencias en *Cspg4*, que ese expresa más en *plugs* de ratones *S-ENG^t* que de ratones control. Por el contrario, no hay diferencias en ratones *L-ENG^t* ni *S-ENG^t*, en cuanto a la expresión *Pdgfby Acta2*, con respecto a las muestras de ratones *WT*.

Las citoquinas CXCL12 y PDGF-B son potentes quimiotáticos de células murales, liberadas al tejido principalmente por las células endoteliales.

Analizamos la expresión de los genes *Cxcl12* y *Pdgfb*, en muestras de *plugs*. Se analizaron un mínimo de 7 *plugs* de 6 ratones diferentes. Los resultados se muestran en la [Figura 57](#).

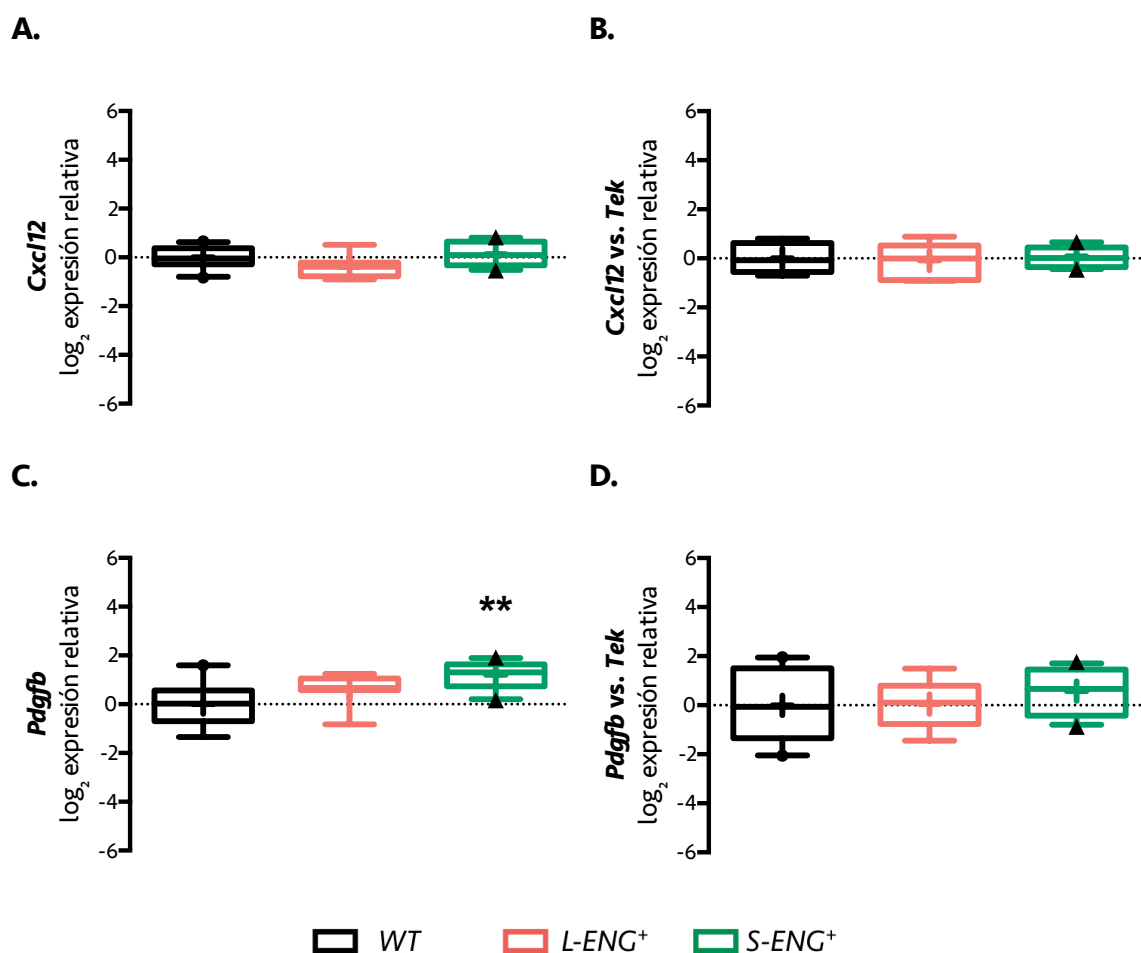


Figura 57. Expresión de citoquinas atrayentes de células murales en *plugs* de Matrigel®

Análisis mediante qPCR de los niveles de expresión de *Cxcl12* (A), *Cxcl12 vs. Tek* (B), *Pdgfb* (C) y *Pdgfb vs. Tek* (D). Los valores se representan como el logaritmo en base dos de la expresión relativa de cada muestra con respecto de las muestras *WT*. Se representa un *box plot* 10-90 percentil. *WT* (n=9), *L-ENG⁺* (n=7) y *S-ENG⁺* (n=10). Test estadístico ANOVA de una vía: ** p<0,01 vs. *WT*.

Este análisis se llevó a cabo también en muestras de *sprouts* de anillos de aorta en Matrigel®. Se analizaron como mínimo 6 muestras de, al menos, 6 ratones diferentes. Los resultados se muestran en la [Figura 58](#).

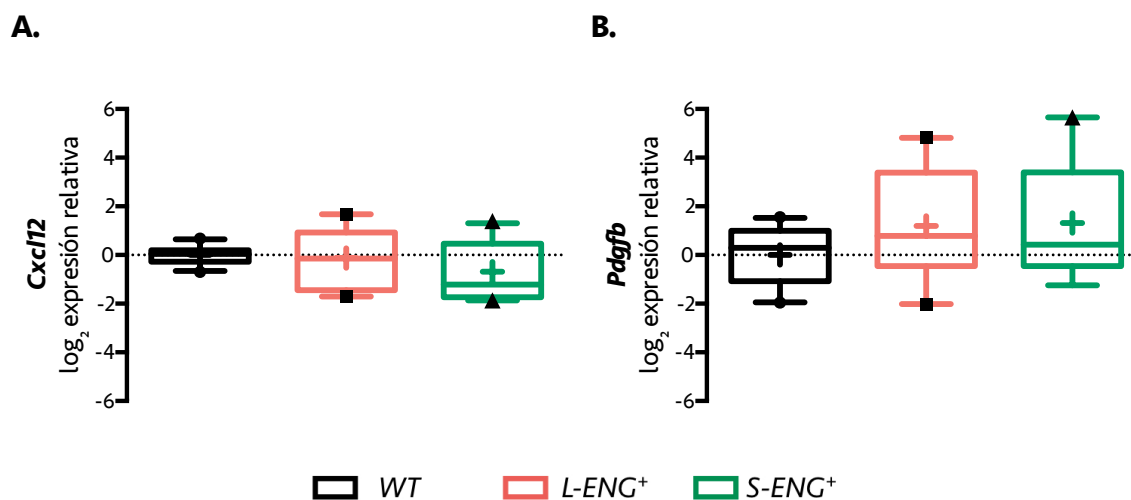


Figura 58. Expresión de citoquinas atrayentes de células murales en anillos de aorta en Matrigel®

Análisis mediante qPCR de los niveles de expresión de *Cxcl12* (A) y *Pdgfb* (B). Los valores se representan como el logaritmo en base dos de la expresión relativa de cada muestra con respecto de las muestras *WT*. Se representa un *box plot* 10-90 percentil. *WT* (n=10), *L-ENG⁺* (n=10) y *S-ENG⁺* (n=9). Test estadístico ANOVA de una vía.

No se observan diferencias en la expresión de *Cxcl12* en los ratones transgénicos *L-ENG⁺* y *S-ENG⁺* con respecto a los *WT*, ni en el ensayo de *plugs* ni en anillos de aorta. En cambio, aunque en anillos de aorta la expresión de *Pdgfb* no muestra diferencias entre las tres líneas de ratones estudiadas, en los *plugs* extraídos de ratones *S-ENG⁺* la expresión de este gen sí se observa incrementada. Estas diferencias desaparecen al representar la expresión de este gen en relación con la expresión del marcador endotelial *Tek*, por lo que podemos pensar que las células endoteliales de los ratones *L-ENG⁺* y *S-ENG⁺* no presentan variaciones en la expresión de estas citoquinas, al compararlas con las de ratones control *WT*.

Discusión

“Pelearé hasta el último segundo y mi epitafio será:
“No estoy de acuerdo”.”

Joaquín Sabina

Como ya ha quedado patente, endogлина es una molécula esencial en la formación y función de la vasculatura. Numerosos estudios han analizado el efecto negativo que tienen la deficiencia y la ausencia de endogлина en la formación de vasos sanguíneos funcionales, demostrando su papel esencial en la misma. También se ha descrito un aumento de los niveles de endogлина en las células endoteliales durante la angiogénesis activa. Sin embargo, si bien se conocen algunas respuestas reguladas por endogлина en la célula endotelial, hasta la fecha no se conoce con certeza la regulación de la expresión de endogлина durante la angiogénesis ni cómo endogлина regula determinados procesos celulares que pueden estar involucrados en la angiogénesis.

Para la realización de este trabajo, se generaron líneas de ratones transgénicos en los que se sobreexpresaron las isoformas de endogлина de membrana, bien L-endogлина (*L-ENG⁺*) o bien S-endogлина (*S-ENG⁺*). Sus respuestas se compararon con las de ratones control (*WT*). Se sobreexpresaron proteínas humanas y no de ratón porque esto permite diferenciar las proteínas exógenas de las endógenas. La sobreexpresión de la isoforma mayoritaria tiene como objetivo el estudio del efecto que el aumento en los niveles de endogлина tiene en la angiogénesis. La sobreexpresión de la isoforma corta nos permite conocer si, en el proceso estudiado, el dominio intracelular de endogлина está jugando un papel esencial: en este modelo, será S-endogлина quien preferentemente forme parte de los complejos de receptores de TGF- β , debido a sus elevados niveles, por lo que actuaría como dominante negativo del efecto de L-endogлина; así, si el dominio citoplasmático de endogлина está directamente implicado en el proceso en estudio, la respuesta en el ratón *S-ENG⁺* se verá alterada en comparación con la respuesta observada en el ratón *L-ENG⁺*. En cambio, en procesos modulados exclusivamente por el dominio extracelular, la respuesta tras la sobreexpresión de cualquiera de las dos isoformas será la misma.

1. Efecto de la sobreexpresión de endogлина en la reperusión post-isquémica

Nuestra primera aproximación fue estudiar el efecto de la sobreexpresión de las isoformas de endogлина sobre la reperusión post-isquémica. La vascularización que tiene lugar tras los eventos isquémicos ha sido ampliamente estudiada y anteriormente revisada por Silvestre y colaboradores (Silvestre *et al*, 2008), y su importancia en la recuperación del órgano afectado por la isquemia se ha hecho patente en numerosos estudios (Attanasio & Snell, 2009; Cho *et al*, 2007; Ma *et al*, 2015; Persson & Buschmann, 2011). En este sentido, existen artículos

previos que afirman que endogлина es fundamental en la revascularización y recuperación del tejido isquémico (Jerkic *et al*, 2006b; van Laake *et al*, 2006). Hay que tener en cuenta que en respuesta a la isquemia no sólo se desencadena la angiogénesis, sino que hay procesos de arteriogénesis o formación de arterias y arteriolas mediante el engrosamiento y maduración de vasos preexistentes, que también contribuyen al aumento de la perfusión. Además, es muy importante el componente inflamatorio de la angiogénesis: a la zona acuden numerosas células sanguíneas y se liberan factores proinflamatorios, que también tendrán un efecto en la respuesta endotelial y la angiogénesis (Silvestre *et al*, 2008).

En nuestros resultados, la sobreexpresión de L-endogлина no conllevó ninguna diferencia en cuanto a la tasa de reperfusión post-isquémica tras la ligadura de la arteria femoral, al compararla con la de ratones control, *WT*. Por el contrario, la sobreexpresión de S-endogлина produjo un retraso de la reperfusión de la extremidad, con respecto a la observada en ratones *WT*, diferencias ya apreciables en el primer día tras haber practicado la isquemia. Estas diferencias se mantenían e incluso se acentuaban a lo largo del periodo de recuperación (Figura 31). El efecto observado en los ratones *S-ENG^f* es similar al que se ha descrito en los ratones *Eng^{f/f}* (Jerkic *et al*, 2006b). En los ratones *S-ENG^f*, la alta expresión de S-endogлина haría que fuese esta isoforma la que mayoritariamente formara parte de los complejos de receptores, compitiendo con la isoforma normal endógena; como S-endogлина carece de gran parte del dominio intracelular, en esta situación los efectos mediados por éste no podrán llevarse a cabo. S-endogлина estaría actuando como un dominante negativo de la isoforma mayoritaria e impidiendo su efecto, y por ello la respuesta es similar a la observada en los ratones deficientes en endogлина. Nuestros resultados y los antecedentes bibliográficos nos permiten concluir que, efectivamente, endogлина es esencial para la reperfusión post-isquémica, y que en esta función es esencial su dominio intracelular.

2. Efecto de la sobreexpresión de endogлина en la angiogénesis *in vivo*

Como ya hemos apuntado anteriormente, el modelo de reperfusión post-isquémica nos aproxima a la respuesta revascularizadora que tiene lugar tras la isquemia, pero no podemos atribuir estas diferencias directamente a diferencias en la respuesta angiogénica en estos ratones. Por ello, pusimos a punto dos modelos en los que poder estudiar el proceso de angiogénesis en los ratones utilizados en este trabajo. Por un lado, estudiamos la vascularización de las retinas de estos ratones, que sucede mediante un proceso de angiogénesis que tiene lugar durante los primeros 8 días de vida. El modelo de retina en el estudio de la angiogénesis y la formación de la

vasculatura ha sido ampliamente descrito y desarrollado (Fruttiger, 2007; Stahl *et al*, 2010). Tras los primeros 8 días, en la retina siguen teniendo lugar procesos de angiogénesis a medida que crece el órgano y requiere ser vascularizado. Por otra parte, utilizamos el “Ensayo Directo de Angiogénesis *In Vivo*” (EDAIV) para cuantificar la invasión por vasos de nueva formación, y los *plugs* subcutáneos de Matrigel® como abordaje complementario al EDAIV en el que analizar la expresión génica de las células de los vasos formados. Estos dos modelos han sido también descritos anteriormente y utilizados en numerosas ocasiones (Passaniti *et al*, 1992; Guedez *et al*, 2003).

La retina del ratón nos permite estudiar el proceso de angiogénesis de una forma más visual puesto que, a diferencia del anterior modelo de isquemia-reperusión, podemos analizar con mucha facilidad la estructura de los vasos que se forman en este órgano. Así, el marcaje específico de los vasos del *whole mount* de retina nos permite observar el árbol vascular y analizar en él posibles alteraciones. La primera medida que se puede hacer gracias a esta técnica es la cuantificación de la longitud avanzada por el frente de angiogénesis, es decir, la progresión del plexo vascular en formación. Observamos que la sobreexpresión de L-endoglina llevó a una reducción significativa de este parámetro, siendo el árbol vascular formado más pequeño que el de los ratones *WT* y *S-ENG^f*, entre los que no se observaron diferencias (Figura 33). Además, la cuantificación de los elementos estructurales de los vasos (ramas y puntos de unión y longitud de las ramas) indicó que los vasos de retinas de ratones *L-ENG^f* se ramificaban más. Estas ramas tendían a ser más cortas, si bien la densidad de vasos era mayor que en las retinas control y *S-ENG^f*. La vasculatura de retinas de ratones *S-ENG^f* presentaba ramas más largas, pero la densidad de vasos era la misma que en retinas de ratones *WT* (Figura 34). Anteriormente se ha descrito cómo en retinas de crías de ratones *knock-out* para endoglina se produce un reducido desarrollo del plexo vascular, junto con alteraciones estructurales en los vasos formados (Mahmoud *et al*, 2010). Tomados en conjunto con los datos anteriores, este resultado nos lleva a pensar que, si bien la correcta expresión de endoglina es esencial para la respuesta angiogénica, su sobreexpresión constante impide una vascularización normal. La tinción específica con un anticuerpo anti-endoglina de ratón (endógena), mostró cómo esta proteína se sobreexpresa en el frente angiogénico, mientras que sus niveles eran menores en los vasos ya formados (Figura 32). Esto nos lleva a pensar que puede ser necesario que los niveles de endoglina en el endotelio regresen a niveles basales para la estabilización de los vasos, o incluso para su maduración, y que cuando esto no sucede, no se forma un árbol vascular normal sino que los vasos tienden a ramificarse más en lugar de estabilizarse, y esto puede ser lo que esté ocurriendo en nuestro modelo, donde se sobreexpresa endoglina de forma constante y ubicua. Este proceso sería dependiente del dominio intracelular de endoglina, ya que no se observa en los ratones *S-ENG^f*. En estos ratones, sin embargo, la sobreexpresión de S-endoglina no llevó a un retraso de la

angiogénesis como se observaba en la reperfusión, sino que llevó a una alteración estructural de los vasos formados. Estos datos son consistentes con los resultados obtenidos en el estudio de la vasculatura de la retina de ratones *Eng*^{+/+} (Park *et al*, 2013), en los que el área vascularizada es similar al que se observa en ratones control, pero los vasos formados presentan ciertas alteraciones. Todo esto nos hace pensar que es fundamental el correcto funcionamiento del dominio intracelular de endogлина durante la angiogénesis en la retina.

El análisis de expresión de marcadores de células endoteliales en la retina mediante qPCR permite conocer la expresión relativa de estas moléculas, en función de la expresión de un gen de expresión ubicua o *housekeeping*. De este modo, podríamos estimar la abundancia relativa de un tipo celular en un tejido en cuestión, en este caso las células endoteliales. Pero no podemos asumir que esto sea así sin confirmarlo por otra técnica, puesto que casi todas las moléculas específicas de células endoteliales son susceptibles de ver regulada su expresión.

Elegimos los marcadores de endotelio PECAM1, endogлина, VE-cadherina y Tie2. PECAM1 y endogлина también se expresan en otros tipos celulares, aunque se expresan preferentemente en endotelio, tanto es así que se han utilizado tradicionalmente como marcadores de endotelio, tanto en investigación como en diagnóstico clínico (Nassiri *et al*, 2011; Pappa *et al*, 2013). VE-cadherina y Tie2 son más específicos, de forma que se han generado líneas de ratones transgénicos con genes inducibles o *knock-out* inducible restringidos al endotelio, bajo el control del promotor de estos dos genes (Kisanuki *et al*, 2001; Mahmoud *et al*, 2010; Tual-Chalot *et al*, 2014). Además, analizamos la expresión de ZO-1, proteína de carácter epitelial y endotelial que, en nuestro caso, es expresada fundamentalmente por células endoteliales y nos da información sobre la estabilidad del endotelio.

PECAM1 es un proteína de la familia de las inmunoglobulinas que se expresa en niveles elevados en la superficie de las células endoteliales, donde está implicada en interacciones entre células adyacentes (Muller *et al*, 1989; Wu & Sheibani, 2003), así como entre células endoteliales y células circulantes, y con la MEC (Sheibani *et al*, 1999). PECAM1 se ha mostrado esencial para la angiogénesis, puesto que ratones *Pecam1*^{-/-} presentan una vasculatura reducida y alterada, y además no mostraron respuesta angiogénica en el modelo de OIR (Park *et al*, 2015). Anticuerpos frente a PECAM1 impiden la formación de uniones entre células endoteliales en cultivo, así como la organización en estructuras bidimensionales similares a capilares en Matrigel® y la angiogénesis en un ensayo de córnea en ratón (Sheibani *et al*, 2000). Los mecanismos por los que actúa son aún muy desconocidos, aunque se sabe que forma parte del complejo de detección de cambios en el *shear stress*.

En cuanto a VE-cadherina o cadherina-5, se trata de la proteína que constituye las uniones adherentes entre células endoteliales en el endotelio quiescente. La regulación de la

formación / destrucción de las uniones homotípicas de VE-cadherina es esencial para el desarrollo de la angiogénesis. La expresión de VE-cadherina se inhibe ante estímulos angiogénicos como FGF. Además, el *knock-out*, la reducción de la expresión o el bloqueo de la señalización de VE-cadherina, llevan a un excesivo *sprouting* por el incremento de células *tipy* de filopodios (Abraham *et al*, 2009; Gaengel *et al*, 2012). VE-cadherina interacciona con el citoesqueleto de actina a través de proteínas de andamiaje como β -catenina (Gavard, 2014). VEGFR2 inhibe la unión entre VE-cadherina y β -catenina, mientras que TGF- β la promueve (Cook *et al*, 2008), mecanismo en el que podría estar implicado endoglin. Zyxina, proteína del citoesqueleto con la que endoglin interacciona, se encuentra estructuralmente unida al complejo cadherina / catenina / actinina (Lee *et al*, 2004b).

ZO-1 o Tjp1 (del inglés, *Tight Junction Protein 1*) forma parte principalmente de las uniones ocluyentes o *zonula occludens* de endotelio y epitelio, y es fundamental en el mantenimiento de la integridad de estos tejidos barrera (Harhaj & Antonetti, 2004). Además, proporciona un anclaje entre los núcleos de VE-cadherina y las proteínas del citoesqueleto vinculina y miosina II. ZO-1 es necesaria para la correcta migración de las células endoteliales durante el *sprouting*, lo que se ha visto tanto *in vitro* como *in vivo* (Tomavaca *et al*, 2015).

Tie2, Tek en ratón, es un receptor de angiopoyetinas y marcador específico de células endoteliales, en las que se encuentra constitutivamente activo (Jones & Dumont, 2000). La activación de Tie2 por angiopoyetina 1 (Ang1) promueve la estabilización de las uniones célula-célula y célula-matriz, así como el reclutamiento de células murales, manteniendo la estabilidad del endotelio y promoviendo la maduración del vaso. Ang2 no es capaz de activar Tie2, por lo que se cree que actúa como inhibidor competitivo de la función de Ang1 (Eklund & Olsen, 2006). La expresión del gen y la fosforilación de la proteína Tie2 aumentan durante la angiogénesis (Wong *et al*, 1997). Recientemente se ha demostrado que el silenciamiento de *Tie2* supone la desestabilización de las uniones entre células endoteliales, de forma mediada por Ang2 e integrinas β_1 (Hakanpaa *et al*, 2015), y se sabe que Tie2 contrarresta la desestabilización de las uniones endoteliales de VE-cadherina por acción de VEGF (Milam & Parikh, 2015).

En nuestros resultados, el análisis de la expresión de estos genes endoteliales en retina muestra cómo las retinas de ratones *S-ENG⁺* expresaban menos *Eng*, *Pecam1* y *Cdh5*, y esta tendencia se observó también para *Tek*, sin llegar en este caso a mostrar diferencias significativas. Sí se vio significativamente reducida la expresión de *Tek* en retinas de ratones *L-ENG⁺*, que apoya la hipótesis de una menor estabilidad del endotelio de los vasos formados en estas retinas, donde no hay diferencias en cuanto a la expresión de los otros genes (Figura 35). Estos resultados indicarían una menor abundancia de células endoteliales en las retinas de ratones *S-ENG⁺*. El hecho de que la ramificación de los vasos en las retinas *S-ENG⁺* fuese similar

a las de retinas *WT*, mientras que la longitud promedio de las ramas era mayor, junto con este dato que indica un menor contenido de células endoteliales, nos lleva a pensar de nuevo que el dominio intracelular de endogлина puede estar jugando un papel en la dinámica endotelial y en su organización en los vasos. Debemos considerar que el estudio de la expresión génica se llevó a cabo en retinas de ratones más mayores, de 17 días, lo que nos permitió obtener una mayor cantidad de muestra, pero cuyo árbol vascular puede no encontrarse en el mismo estado que en tiempos más tempranos del desarrollo, puesto que en este punto tienen lugar más fenómenos de maduración vascular y no exclusivamente de *sprouting* (Hofmann & Iruela-Arispe, 2007a).

Además de estudiar la formación de la vasculatura de la retina, utilizamos otro modelo en el que estudiar la angiogénesis *in vivo*, como es el EDAIV. El primer análisis que llevamos a cabo en el EDAIV fue la estimación de la distancia invadida por vasos. En este caso no se puede medir exactamente el alcance del frente de vascularización, sino que simplemente podemos estimar que llega hasta donde se observa un cambio de tonalidad en la matriz del vaso debido a la sangre, que se supone contenida en los vasos formados. En nuestros resultados, el frente de vasos alcanzaba una mayor distancia en los ratones *L-ENG^t* que en los ratones *WT*. Nuevamente, no observamos diferencias en este parámetro en los ratones *S-ENG^t* con respecto a los *WT* (Figura 36). Por otro lado, el marcaje con lectina fluorescente de las células endoteliales contenidas en los tubos, indicó un menor número células endoteliales, tanto en tubos implantados en ratones *L-ENG^t* como *S-ENG^t* (Figura 37). Esta aparente incongruencia entre los datos obtenidos para los ratones *L-ENG^t* nos hace pensar que la estimación de la distancia invadida puede ser errónea. En realidad, no podemos saber si verdaderamente la sangre que observamos se encuentra en los vasos o, en el caso de un posible endotelio no estable, se ha extravasado pudiendo difundir por la matriz y alterar nuestra medición.

El análisis de la expresión de los marcadores endoteliales *Eng*, *Pecam1*, *Cdh5* y *Tek* en *plugs* de Matrigel® no mostró diferencias (Figura 38), lo que se puede explicar si pensamos que el tipo celular mayoritario en este tejido es la célula endotelial. En este caso no observamos una menor expresión de *Tek* en el endotelio de los vasos formados en tubos implantados en ratones *L-ENG^t*. En la bibliografía se recoge cómo, si bien la hipoxia sí es capaz de inducir la expresión de *Tie2*, así como también lo hacen ciertas citoquinas proinflamatorias (Willam *et al*, 2000), VEGF por sí mismo no induce la expresión de este gen (Oh *et al*, 1999). Por lo tanto en retina puede haber una respuesta a la hipoxia mediada por otro agente que no sea VEGF, que induzca la expresión de *Tie2*, que a su vez mediará la respuesta angiogénica y la estabilización de los vasos. Este efecto de la hipoxia sobre la expresión de *Tie2* se ve reducido ante la sobreexpresión de *L*-endogлина. Pero en el EDAIV no se dan estas condiciones, sino que simplemente hay VEGF y

FGF en el interior del tubo, por lo que no se produce esta regulación de la expresión de *Tie2*. ZO-1 (*Tjpi*) en este contexto sólo es expresado por las células endoteliales estables (Kim *et al*, 2009). No encontramos diferencias significativas entre los tres tipos de ratones en cuanto a la expresión de *Cdh5* ni de *Tjpi* (Figura 38), indicando que no hay alteración en los niveles de expresión de estos genes, si bien no sabemos si la distribución de las proteínas que codifican y su función son normales ante la sobreexpresión de una u otra isoforma de endoglina.

A la vista de los resultados *in vivo*, podemos concluir que la sobreexpresión de L-endoglina no afecta a la recuperación de la perfusión post-isquémica en un modelo de isquemia femoral. Los resultados obtenidos en este modelo indican una implicación de endoglina mediada por su dominio intracelular en este proceso, puesto que la sobreexpresión de S-endoglina lo altera, retrasando significativamente la reperfusión. La falta de respuesta a la sobreexpresión de L-endoglina puede deberse a que la expresión de endoglina aumenta en respuesta a la isquemia, como se describe en la bibliografía (van Laake *et al*, 2006) y, más concretamente, a la hipoxia (Park *et al*, 2013; Barnett *et al*, 2014), aumentando sus niveles en las zonas que están experimentando angiogénesis activa, como hemos visto en retina. Así, cabe pensar que en los vasos de la zona isquémica de ratones *WT*, los niveles de endoglina se encuentren aumentados durante el proceso debido a la situación de hipoxia en la que se encuentra el tejido. Una sobreexpresión exógena adicional de endoglina puede no tener ningún efecto añadido en la reperfusión. Otra hipótesis sería que un exceso de L-endoglina lleve a una vascularización anómala, pero que sí genere vasos funcionales que permitan la reperfusión del tejido: esta teoría se apoya en la evidencia de los elevados niveles de endoglina en el endotelio de los vasos tumorales, donde la angiogénesis se excesivamente activa dando lugar a vasos anómalos y altamente desorganizados (Nassiri *et al*, 2011). Por el contrario, la sobreexpresión de S-endoglina estaría enmascarando el aumento de los niveles de endoglina larga endógena, es decir, estaría actuando como un dominante negativo, incapaz de ejercer el efecto de L-endoglina debido a la carencia de la mayor parte del dominio intracelular. Esto indica un papel esencial de endoglina, mediado por su dominio intracelular, en este proceso de reperfusión. El estudio de los vasos formados en la retina y el EDAIV ante la sobreexpresión de endoglina indica que, aunque no se observen diferencias en la tasa de reperfusión, el proceso de angiogénesis sí se altera ante niveles de endoglina elevados permanentemente. Por tanto, la recuperación de la perfusión de la extremidad en los animales *L-ENG^f* se puede deber a vasos defectuosos pero que sí transporten sangre, y/o a procesos simultáneos de vasculogénesis, que no sabemos cómo tienen lugar durante la reperfusión, ni el papel que endoglina juega en ellos.

Concretamente, en el estudio de la angiogénesis *in vivo* observamos un menor avance de la vascularización hacia el foco hipóxico, pero con una mayor formación de vasos por área, más cortos y ramificados, en retinas de ratones *L-ENG^t*, en comparación con retinas control. Cabría pensar en una reducción de la estabilización y/o maduración en los vasos formados en las retinas en respuesta a L-endoglina, apoyada por la expresión reducida de *Tek*. En el EDAIV observamos una mayor invasión del frente formado por la vasculatura, que podría deberse a una extravasación de sangre si los vasos formados presentan un endotelio inestable, lo que estaría de acuerdo con la hipótesis planteada para los vasos de la retina. En ninguno de los dos estudios de la respuesta angiogénica *in vivo*, ni en retinas ni en el EDAIV, se observan diferencias entre los ratones *S-ENG^t* y *WT* en cuanto a la invasión por parte de los vasos formados, y sí se observa una reducción en el número de células endoteliales que los forman. Esta teoría viene apoyada por recientes evidencias que demuestran que elevados niveles de VEGF inducen la desestabilización del endotelio de una forma mediada por una reducción en la señalización de Smad2/3 (Groppa *et al*, 2015), vía que se sabe que es inhibida por endoglina (Goumans *et al*, 2003a), por lo que es quizá este aumento de endoglina quien regula, al menos en parte, la respuesta a VEGF que inicia el *sprouting*. La carencia de gran parte del dominio intracelular en S-endoglina impediría este efecto y, por tanto, la desestabilización endotelial que induce la sobreexpresión de L-endoglina. Además, se cree que S-endoglina promueve la señalización a través de Smad2/3 (Velasco *et al*, 2008). Una diferencia fundamental entre ambos modelos es que, mientras que en retina se produce una respuesta angiogénica fisiológica y coordinada, en el EDAIV se crean unas condiciones artificiales en las que hay un gran foco de VEGF y FGF en el interior del tubo, pero no se trata de un gradiente regulado de forma fina, por lo que no sabemos si los procesos de estabilización y maduración de los vasos, que tienen lugar en microambientes con menores niveles de factores proangiogénicos, están teniendo lugar de la misma manera que en condiciones fisiológicas. Quizá en los tubos del EDAIV haya una desestabilización endotelial y una respuesta angiogénica permanentes debido a la presencia generalizada de estas moléculas proangiogénicas, incrementada por la sobreexpresión de endoglina.

Por tanto, nuestra hipótesis a la vista de estos resultados sería la participación de endoglina durante los eventos de angiogénesis activa que suponen la desestabilización del endotelio y la formación de *sprouts* que darán lugar a nuevos vasos. En estas etapas, los niveles de endoglina aumentan en respuesta al estímulo angiogénico, y este aumento impide que haya una estabilización endotelial y/o una maduración subsiguiente de los vasos que se van formando, para lo que sería necesario que los niveles de endoglina vuelvan a una situación basal. Además, el dominio intracelular de endoglina parece jugar un papel fundamental en los procesos angiogénicos que regula endoglina, puesto que la sobreexpresión de la forma que

carece de casi todo este dominio citosólico lleva a una reperfusión deficiente debido, al menos en parte, a la formación de vasos con alteraciones estructurales: más alargados pero formados por menos células.

3. Efecto de la sobreexpresión de endoglina en la regulación génica del *sprouting*

Para estudiar si estas diferencias se debían a una alteración del mecanismo de regulación de la diferenciación *tip/stalk* durante el *sprouting* debida a los elevados niveles de expresión de endoglina, y si la sobreexpresión de S-endoglina conllevaba alguna alteración en esta posible regulación, analizamos la expresión de genes que se sabe que es regulada en el endotelio durante la angiogénesis.

Como ya se ha discutido previamente, corregir la expresión de los genes en estudio por un *housekeeping* de expresión ubicua, nos daría una estimación de la cantidad de células que expresan ese gen en relación al total de células en el tejido. En lugar de eso, en este caso lo que nos interesa es saber cuántas células del total de células endoteliales han transformado su fenotipo en célula *tip* o *stalk*. Por esa razón, corregimos los marcadores por la expresión de los genes que hemos empleado como marcadores de células endoteliales.

Mediante esta aproximación, analizamos la expresión de *Notch1* y *Kdr* en retinas, pero no encontramos diferencias entre las distintas líneas de ratones. Solamente cuando corregimos la expresión de *Kdr* en función de la expresión de *Cdh5*, exclusivamente endotelial, se observa una menor expresión en los ratones *S-ENG⁺* (Figura 39). Estas diferencias pueden deberse a una reducida diferenciación en el endotelio de estos ratones a célula *tip*, pero también a una regulación de la expresión de *Cdh5*. En la bibliografía se ha descrito que la deficiencia o ausencia de endoglina reduce muy significativamente los niveles VE-cadherina, si bien sólo se ha estudiado a nivel proteico y en células en cultivo (Park et al, 2013; Jerkic & Letarte, 2015). Por tanto, con estos resultados no podemos saber si la regulación molecular del *sprouting* en retina se encuentra alterada por la sobreexpresión de las isoformas de endoglina, y sería necesario llevar a cabo más estudios en este sentido.

A pesar de que sí se sabe que existe una relación entre la expresión de *Dll4* y de *Eng*, puesto que embriones *knock-out* para *Dll4* presentan una reducida expresión de *Eng* (Benedito et al, 2008), no se sabe qué relaciona la expresión de ambos genes, ni si este efecto se observa también en la angiogénesis fisiológica. También se conoce una colaboración entre la

señalización de TGF- β y la de Notch en la selección de las células *tipy stalk*, ya que se ha descrito que una reducción de la señalización de la vía de Notch en ratones haploinsuficientes para *Smad1/5*, aunque no se ha estudiado si endogлина juega algún papel en este proceso (Moya *et al*, 2012).

Sin embargo, el análisis de expresión de genes involucrados en el *sprouting* en *plugs* de Matrigel® (Figura 41) o en el modelo *ex vivo* de anillos de aorta en Matrigel® (Baker *et al*, 2012) (Figura 45), no mostró diferencias significativas en la expresión de los genes que codifican para Notch1, VEGFR2, Dll4 y Jagged1 entre los ratones *L-ENG^t* o *S-ENG^t*, y los *WT*, por lo que podríamos deducir que la respuesta de *sprouting* no está directamente afectada por el aumento de expresión endogлина. De acuerdo con este resultado, tampoco se observaron diferencias en el volumen ocupado por *sprouts* crecidos a partir de anillos de aortas de ratones *L-ENG^t* o *S-ENG^t*, con respecto a los *WT* (Figura 43). El estudio previo llevado a cabo con anillos de aortas aisladas de ratones *Eng^{+/+}* mostró cómo la deficiencia en endogлина sí reduce el *sprouting* a partir de anillos de aorta (Park *et al*, 2013), lo que nos hace pensar que endogлина es necesaria para el *sprouting*, si bien no parece que el aumento en sus niveles participe en la regulación de la selección *tip/stalk*.

Como ya se ha apuntado, el reclutamiento y la diferenciación de precursores endoteliales también participa en el proceso de *sprouting* (Adams & Alitalo, 2007; Zhang & Xu, 2014). Tampoco encontramos diferencias en los niveles de expresión de los marcadores de precursores endoteliales *Cd34* y *Prom1* en ratones *L-ENG^t* y *S-ENG^t*, con respecto a los controles, ni en retina (Figura 40), ni en *plugs* de Matrigel® (Figura 41), ni en anillos de aorta (Figura 45). Debemos recordar que se ha descrito que *Cd34* aumenta su expresión en la célula *tip*, por lo que nuevamente no observamos que se altere la regulación de la expresión de otro gen de *sprouting* tras la sobreexpresión de L o S-endogлина.

4. Efecto de la sobreexpresión de endogлина en la fisiología de la célula endotelial

A la vista de los anteriores resultados, planteamos el subsiguiente el estudio *in vitro* de otros procesos celulares que tienen lugar durante la angiogénesis y que se pueden ver afectados por la expresión de endogлина.

Se utilizaron dos modelos celulares: un cultivo primario de MLEC obtenidas de ratones *L-ENG^t* y *S-ENG^t*, y ratones control *WT*, así como una línea de células endoteliales humanas,

EA.hy926, en las que sobreexpresamos L o S-endogлина mediante infección con virus portadores del gen de una u otra isoforma (líneas *L-ENG^t* y *S-ENG^t*), o de vector vacío (línea *Mock*).

Una respuesta de las células endoteliales que determina que el *sprouting* tenga lugar de forma coordinada es la regulación de la proliferación celular. Las células *stalk* tienen un fenotipo eminentemente proliferativo, y la regulación de su proliferación permite el crecimiento del *sprout* en dirección al estímulo angiogénico. Se ha documentado numerosas veces la implicación de endogлина en la proliferación de las células endoteliales. Como se recoge en la “Introducción” de este trabajo, se ha descrito que la activación de la señalización a través de Smad1/5/8 por parte de los miembros de la superfamilia de TGF- β , resulta en un aumento de la proliferación y migración celular en el endotelio (Oh *et al*, 2000; Goumans *et al*, 2002, 2003a; Lebrin *et al*, 2005; Goumans *et al*, 2009; Pardali *et al*, 2010; Mahmoud *et al*, 2011). Con respecto al papel de endogлина, la hipótesis más aceptada hasta la fecha en la bibliografía indica que la presencia de endogлина favorece la proliferación endotelial, al promover la señalización a través de ALK1 / Smad1/5/8. (Goumans *et al*, 2002, 2003a; van Meeteren *et al*, 2012; Nolan-Stevaux *et al*, 2012; González-Núñez *et al*, 2013; Jonker, 2014). La mayoría de los estudios se han llevado a cabo en células deficientes en endogлина, y neutralizando e incluso restableciendo la expresión de endogлина en las mismas (Lebrin *et al*, 2004; Wang *et al*, 2013; Barnett *et al*, 2014). Pero también existen datos en sentido contrario, que afirman que la deficiencia o ausencia de endogлина promueve la proliferación de las células endoteliales (Pece-Barbara *et al*, 2005; Park *et al*, 2013; Pan *et al*, 2014). *In vivo*, se ha observado tanto un mayor número de células proliferativas en ausencia de endogлина en los vasos de la retina (Mahmoud *et al*, 2010), como una correlación entre el aumento de marcadores de proliferación en tumores y un aumento de la expresión de endogлина, si bien este estudio no diferencia tipos celulares y, como se ha expuesto anteriormente, el endotelio no es el único tejido dentro del tumor que expresa endogлина (Miller *et al*, 1999). En cuanto a las isoformas de endogлина, sólo se ha descrito que L-endogлина promueve la proliferación y S-endogлина la reduce en un modelo de mioblastos de rata en los que se sobreexpresó una u otra isoforma. Se demostró además el aumento de la activación de Smad1/5/8 en las células que expresaban L-endogлина y, por el contrario, la señalización a través de Smad2/3 en las células que expresaban S-endogлина (Velasco *et al*, 2008). La sobreexpresión de S-endogлина en células endoteliales se asoció a una proliferación reducida (Blanco *et al*, 2008).

Se llevó a cabo el estudio del proceso de proliferación en células endoteliales en cultivo mediante las técnicas de medida de la incorporación de BrdU y de recuento celular. El recuento de células EA.hy926 tras 72 horas en cultivo mostró una tendencia a una menor proliferación tras la sobreexpresión de cualquiera de las dos isoformas de endogлина, pero esta tendencia no fue

significativa en ninguno de los dos casos debido a la baja *n* del experimento (Figura 48). La sobreexpresión de L-endoglina conllevó una menor incorporación de BrdU en las células EA.hy926, y esta tendencia se observó también en las MLEC, si bien en éstas últimas las diferencias no resultaron significativas. Las células *S-ENG^f* no mostraron diferencias con respecto a sus controles, *Mock* o *WT* en cada caso (Figura 49). Por tanto, parece claro que el aumento de los niveles de L-endoglina reduce la proliferación endotelial, y que este efecto o no se produce o no es tan claro cuando la isoforma que se sobreexpresa es S-endoglina.

Basándonos en nuestros resultados, nuestra hipótesis es que el exceso de endoglina lleva a una menor proliferación endotelial. Además, podemos concluir que al no observarse este efecto cuando se sobreexpresa la isoforma minoritaria S-endoglina, el dominio intracelular de endoglina media la respuesta antiproliferativa que ejerce el exceso de L-endoglina cuando sus niveles aumentan en el endotelio. Esta hipótesis viene apoyada por la idea de que son la señalización a través de las proteínas Smad y la activación de la expresión de *Id1*, mecanismos intracelulares, los mediadores de esta respuesta. En cualquier caso, no podemos ignorar los resultados que indican un papel de endoglina como promotora de la proliferación: hay que considerar las condiciones de los ensayos así como el origen de las células empleadas (micro o macrovasculatura) y, sobre todo, demostrar qué se observa *in vivo*.

Además de la proliferación celular, hay otras respuestas celulares reguladas por endoglina durante la angiogénesis, que pueden contribuir a explicar el efecto que vemos *in vivo*. La capacidad de las células endoteliales para moverse y migrar hacia el estímulo angiogénico, invadiendo la MEC, es clave para que el *sprouting* dé lugar a vasos funcionales de forma eficiente. Como sucedía con la proliferación, la teoría más aceptada es la promoción de la migración endotelial por la señalización a través de ALK1 / Smad1/5/8 (Goumans *et al*, 2003a). Ésta es la teoría más aceptada, aunque también hay estudios que defienden una inhibición de la migración tras la activación de Smad1/5/8 (Scharpfenecker *et al*, 2007; Tian *et al*, 2012; Larivee *et al*, 2012). La implicación de endoglina en estos procesos celulares ha sido muy estudiada pero, como ya se ha apuntado anteriormente, los resultados son contradictorios. Por un lado, una serie de estudios indican que endoglina es necesaria para la migración, ya que se ha visto que células endoteliales aisladas de ratones *Eng^f* migran menos tanto en ensayos de *scratch* como a través de *transwell* (Jerkic *et al*, 2006b; Park *et al*, 2013). Además, el bloqueo de la expresión de endoglina con nucleótidos antisentido conlleva la inhibición de la migración por acción de TGF- β (Li *et al*, 2000). Pero, por el contrario, otros estudios muestran que la inducción de la expresión de endoglina reduce la migración a través de *transwell* (Conley *et al*, 2004). MEEC procedentes

de animales *Eng*^{+/+} migran más rápido (Lee & Blobe, 2007), y la recuperación de la expresión de endoglina reduce la migración a los niveles de las células *WT* (Pan *et al*, 2014). Además se ha demostrado que es la Ser⁶⁴⁶ quien está implicada en esta reducción de la migración (Ray *et al*, 2010b). El tratamiento de HUVEC y HMEC con el anticuerpo TRC105, que neutraliza endoglina, promueve la migración de estas células en cultivo sin afectar a su viabilidad (Kumar *et al*, 2013). Un estudio más reciente muestra una reducción en la velocidad de migración celular en el ensayo de *scratch* por acción de TRC105, pero las elevadas dosis de anticuerpo utilizadas también inducían la apoptosis, lo que podría explicar este efecto (Liu *et al*, 2014a). Además, la sobreexpresión de cualquiera de las dos isoformas de endoglina de membrana reduce la migración de fibroblastos en cultivo (Guerrero-Esteo *et al*, 1999). Por otro lado, se ha demostrado que fibroblastos de piel obtenidos de ratones *Eng*^{+/+} migraban significativamente más que las células obtenidas de ratones *WT*, tanto en ensayos de *scratch* como de migración en *transwell*. La sobreexpresión de L-endoglina en fibroblastos NIH3T3 reduce su migración (Pericacho *et al*, 2013).

Ante estas diferencias, nos planteamos analizar qué sucede con la respuesta migratoria en las células endoteliales obtenidas de los ratones que sobreexpresan una u otra isoforma de endoglina y en las líneas celulares endoteliales humanas infectadas con L o S-endoglina. Empleamos dos modelos *in vitro*: por un lado, la motilidad de las células se puede estudiar gracias al ensayo de *scratch* en monocapa; por otra parte, el ensayo con *transwell* permite conocer la capacidad migratoria de las células endoteliales hacia un estímulo, en este caso VEGF, y además su capacidad para invadir la MEC hacia este estímulo si se siembran sobre Matrigel®.

Al analizar la motilidad de las líneas de células EA.hy926 en la placa de cultivo en el ensayo de *scratch*, vimos cómo el dominio extracelular fue capaz de promover por sí mismo la motilidad de las células endoteliales sin necesidad de ningún estímulo quimiotáctico, puesto que tanto las células *L-ENG*⁺ como las *S-ENG*⁺ migraron más rápido que las *Mock* (Figura 50). Hay que tener en cuenta que, pese a ser un ensayo muy extendido para estudiar la motilidad celular, las condiciones de este ensayo no se parecen en nada a las que se dan en un ambiente angiogénico: las células no se encuentran bajo ningún estímulo quimiotáctico ni existe ninguna MEC que tengan que degradar.

Por ello, realizamos los ensayos de migración en *transwell*, que nos permiten simular situaciones más parecidas a las que se producen durante la angiogénesis. En nuestros resultados, las MLEC provenientes de ratones *L-ENG*⁺ mostraron una mayor migración en un gradiente de VEGF, efecto que no se observó en las células *S-ENG*⁺. En el caso de las células EA.hy926, se observó el mismo efecto para las células *L-ENG*⁺, que migraron más rápido que las *Mock*, pero

también se dio esta tendencia en la línea *S-ENG^t*, en comparación con las células *Mock* (Figura 51). Hay que tener en cuenta que las células *L-ENG^t* proliferan menos, lo que puede estar reduciendo nuestras diferencias, al tratarse de un ensayo a 48 horas, tiempo en el que las células pueden haber sufrido varios ciclos de división. Por tanto, nuestros resultados sugieren que la sobreexpresión de L-endogлина favorece la migración de las células endoteliales en dirección a un estímulo angiogénico, mientras que la de S-endogлина no ejerce este efecto o lo hace en menor medida. Si sembramos las células sobre una capa Matrigel®, que tendrán que atravesar en dirección al foco de VEGF, podemos conocer su capacidad para degradar la MEC durante la migración, situación similar a la que sucede durante el *sprouting*. En este caso observamos cómo las MLEC *L-ENG^t* invadían más el Matrigel® y migraban más rápido que las obtenidas de ratones *WT*, efecto que no se observaba en las células *S-ENG^t*. Nuevamente, este efecto observado en las células *L-ENG^t* puede estar viéndose incluso disminuido por la menor proliferación ante la sobreexpresión de L-endogлина. En las células EA.hy926, la sobreexpresión de L-endogлина mostró una tendencia a una mayor invasión del Matrigel® en el gradiente de VEGF que las células *Mock*, aunque la diferencia no era estadísticamente significativa. La línea EA.hy926 *S-ENG^t* presentó una marcada reducción en su capacidad para invadir en Matrigel® en estas condiciones (Figura 52). Las gráficas de migración a través de *transwell* de las MLEC con y sin Matrigel® se parecen mucho, a diferencia de lo observado para la línea EA.hy926. Esto puede deberse a que las MLEC sólo crecen sobre una cobertura de matriz que también le aplicamos a los *transwell*, por lo que dicha matriz extracelular puede tener un efecto sobre las células similar al que hace el Matrigel®.

Realizamos un estudio complementario para estudiar la capacidad de las células endoteliales para organizarse: el análisis de la formación de pseudocapilares *in vitro*, en los que las células endoteliales sembradas en Matrigel® forman estructuras bidimensionales similares a capilares mediante procesos de migración y adhesión, principalmente. Nuestros resultados mostraron que las células que sobreexpresan L-endogлина se ramificaban menos y formaban ramas más largas, mientras que en las estructuras formadas por las células *S-ENG^t* no observamos diferencias con respecto a las de las células *Mock* (Figura 53). Se ha visto que tanto células endoteliales aisladas de aortas de ratones haploinsuficientes para endogлина, como células endoteliales aisladas de pacientes HHT, mostraron alteraciones para formar estas estructuras bidimensionales en Matrigel® (Jerkic *et al*, 2006b). Lo mismo se ha descrito con células endoteliales de microvasculatura aisladas de retinas de ratones *Eng^{+/+}* (Park *et al*, 2013). Con anterioridad se había demostrado que HUVEC con reducidos niveles de endogлина sufren una mayor inhibición de la formación de estas redes por TGF- β 1 que las células con niveles

normales de endoglina (Li *et al*, 2000). Además, el tratamiento de células endoteliales con el fragmento extracelular de endoglina, que se cree que actúa como un antagonista al competir con endoglina de membrana, también anula su organización en estructuras similares a capilares (Venkatesha *et al*, 2006). Por tanto, endoglina se muestra imprescindible para la organización de las células endoteliales, pero niveles muy elevados de endoglina alteran esta organización, probablemente debido a una elevada capacidad migratoria, que lleva a la formación de estructuras más alargadas. Hay que tener en cuenta que en este modelo no se forman verdaderos vasos, y que sólo se emplea un tipo celular, es decir, no hay células murales que participen en la estabilización y maduración del vaso. Además, las células no responden organizadamente a un gradiente de citoquinas proangiogénicas, puesto que los factores solubles del Matrigel® y del medio de cultivo se encuentran distribuidos de forma homogénea. Un co-cultivo de células endoteliales con células murales podría mostrar si, efectivamente, el aumento de los niveles de L-endoglina previene de la estabilización y adhesión de células murales, hipótesis que explicaría los resultados observados *in vivo*.

De estos resultados podemos concluir que la sobreexpresión de L-endoglina no sólo promueve la motilidad de las células endoteliales, sino también su migración a través de una membrana cuando son atraídas por VEGF, incluso cuando tienen que atravesar para ello una capa de matriz, que es lo que sucede en condiciones fisiológicas. La sobreexpresión de S-endoglina no muestra unos resultados tan concluyentes, aunque la tendencia observada es la opuesta: en la línea EA.hy926 *S-ENG^t* las diferencias en cuanto a migración no son claras, y cuando se siembran sobre una capa de Matrigel® su capacidad para invadirlo hacia el foco de VEGF se ve muy reducida; además, no se observa ninguna diferencia en el caso de las MLEC que sobreexpresan S-endoglina con respecto a las células *WT*. Por tanto, nuevamente el dominio intracelular se muestra como indispensable para la migración de las células endoteliales en un ambiente angiogénico. Aunque el dominio extracelular favorece la motilidad celular, probablemente mediante su participación en el establecimiento de uniones extracelulares, debe haber respuestas mediadas por el dominio intracelular, quizá implicadas en la producción de metaloproteasas y en la degradación de la MEC, que determinen en papel promotor de la migración a través de la MEC que muestra L-endoglina.

Este resultado ayuda a explicar los resultados observados en el ensayo de angiogénesis *in vivo*: en los ratones *L-ENG^t*, la sobreexpresión de L-endoglina inhibe la proliferación celular pero promueve la invasión de la MEC y la motilidad endotelial, como demostramos en nuestros resultados; por ello observamos menos células que invadan el tubo, pero un mayor avance del frente de vasos formados bajo una estimulación constante por VEGF y FGF, que probablemente

serán además menos estables o maduros. En cambio, en los tubos implantados en ratones *S-ENG⁺*, no observamos un aumento de la distancia migrada y sí un menor número de células endoteliales; en este caso, S-endogлина debe estar impidiendo el aumento de la invasión endotelial al anular el efecto del probable aumento de los niveles de endogлина endógena que tiene lugar en los ratones *WT*. Una posible hipótesis es que sea esto lo que está sucediendo *in vivo* en respuesta al aumento de los niveles de endogлина en el endotelio al desencadenarse la respuesta angiogénica, en un ambiente rico en VEGF. En retinas de ratones *L-ENG⁺* observamos una vascularización desordenada, probablemente debida a la imposibilidad del endotelio para estabilizarse, que junto con una reducida capacidad proliferativa de las células endoteliales, lleva a un continuo *sprouting* desorganizado. El aumento de los niveles de S-endogлина impediría esta desestabilización permanente del endotelio en respuesta a este estímulo angiogénico, por lo que éste sí sigue formando vasos hacia el foco hipóxico. Pero estos vasos presentan alteraciones estructurales, siendo más alargados y con un menor número de células, posiblemente debido a alteraciones en la capacidad de migración de las células endoteliales *S-ENG⁺*.

5. Efecto de la sobreexpresión de endogлина sobre la cobertura mural del vaso en angiogénesis

Como se describe en la “Introducción” de este trabajo, la cobertura mural y correcta maduración de los vasos es esencial en la regulación de la irrigación de los tejidos. Se trata de un proceso en el que se cree que endogлина también está involucrada, ya que los ratones *Eng⁺* mueren en el día 11,5 de gestación por alteraciones vasculares entre las que se ha descrito una deficiente diferenciación de las CMLV y asociación a las células endoteliales (Bourdeau *et al*, 1999; Li *et al*, 1999; Arthur *et al*, 2000). Además, los pacientes de HHT1 sufren epistaxis recurrentes y hemorragias internas debido, al menos en parte, a la presencia de vasos inmaduros (Orlova *et al*, 2011). Con anterioridad se ha demostrado la capacidad de endogлина para interactuar con integrinas a través del motivo RGD de su dominio extracelular (Rossi *et al*, 2013b) y, muy recientemente, se ha demostrado que, a través de estas uniones, endogлина en el endotelio favorece la adhesión de células murales (Rossi *et al*, 2015).

Para saber si la sobreexpresión de endogлина favorece la unión de células murales a los vasos en formación, analizamos la expresión de genes marcadores de células murales en retina y en *plugs* de Matrigel®. En nuestros resultados, no observamos diferencias en cuanto a la expresión de *Pdgfrb* en retina entre los ratones *L-ENG⁺* y los *WT*. La expresión de *Pdgfrb* en retina fue menor en los animales que sobreexpresan S-endogлина que en animales *WT*, cuando

relacionamos su expresión relativa con la expresión de genes ubicuos, lo que sugiere que en el total de la retina de los animales *S-ENG^t* habría menos células murales. Si tenemos en cuenta que también había menos endotelio, podemos deducir que hay menos células formando los vasos. Al representar la expresión de *Pdgfrb* en función de la expresión de marcadores endoteliales, esto es, *Eng* y *Pecam1*, y *Cdh5*, vimos cómo la proporción célula mural / célula endotelial se mantiene estable independientemente de que se sobreexpresen o no alguna de las dos isoformas de endogлина (Figura 54).

El análisis de la expresión de *Cspg4* y *Pdgfrb* en *plugs* sugirió que la sobreexpresión de S-endogлина se asocia a una mayor cobertura mural, es decir, la proporción de células murales en el *plug* con respecto al total de células, es mayor en *plugs* implantados en ratones *S-ENG^t* que en los *WT* (Figura 55). Al representar la expresión de estos dos marcadores en función de marcadores de células endoteliales, para aproximarnos al ratio célula mural / célula endotelial, vimos cómo las diferencias observadas para *Pdgfrb* desaparecían. En cambio, la expresión de *Cspg4* relativizada por la expresión de *Tek* mantuvo estas diferencias, sugiriendo una mayor cantidad de pericitos por célula endotelial en ratones *S-ENG^t* (Figura 56). En los ratones *L-ENG^t* no se observaron diferencias con los ratones control en cuanto a la expresión de estos tres genes relativizada por marcadores células endoteliales (bien *Eng/Pecam1*, o bien *Tek*). Considerando que la expresión de *Cspg4* se encuentra restringida a los pericitos en el *plug*, mientras que *Pdgfrb* puede ser expresado por otras células que también pueden estar presentes en el *plug* como fibroblastos o macrófagos, podemos pensar que la sobreexpresión de S-endogлина favorece la maduración de los vasos formados en el *plug*. Esta hipótesis se puede aplicar también al resultado de expresión de *Pdgfrb* en retina. En cuanto a la expresión de *Acta2*, ésta fue significativamente menor en *plugs L-ENG^t* que en los *WT*, aunque estas diferencias desaparecían al expresarla en función de la expresión de marcadores endoteliales (Figura 56). Cabe considerar nuevamente que *Acta2* también se expresa por fibroblastos y macrófagos, por lo que es menos específico que *Cspg4*.

Quisimos ampliar este estudio analizando la expresión de citoquinas con una función quimiotáctica de las células murales. Se trata de *Cxcl12* y PDGF-B, proteínas que en la vasculatura son expresadas principalmente por las células endoteliales. *Cxcl12* se ha descrito además como potente quimiotáctico de células mesenquimales pluripotentes a los vasos, donde se diferencian a células de soporte vascular (Ceradini *et al*, 2004; Hamdan *et al*, 2011; Wong *et al*, 2015).

Pese a que se ha demostrado que, en células endoteliales, el silenciamiento de endogлина inhibe la expresión del gen *Cxcl12* (Young *et al*, 2012), en nuestros resultados la sobreexpresión

de cualquiera de las dos isoformas de endoglina no pareció afectar a sus niveles en *plugs* de Matrigel® al compararlos con los *WT*. En cambio, observamos una mayor expresión de *Pdgfb* en las muestras de *plugs* de ratones *S-ENG^f* que en los *WT*, diferencias que desaparecían al expresar el resultado en función del marcador endotelial *Tek* (Figura 57). En anillos de aorta tampoco se observó ninguna diferencia en la expresión de *Cxcl12* ni de *Pdgfb* en anillos de ratones *L-ENG^f* o *S-ENG^f*, respecto a los controles (Figura 58).

Aunque la deficiencia en endoglina se haya asociado en diversos trabajos con una reducida cobertura mural de los vasos, no parece que una mayor expresión de endoglina la aumente. Sí parece suceder así cuando se sobreexpresa S-endoglina. Esto nos lleva a pensar que el dominio extracelular de endoglina favorece la adhesión de células murales al endotelio. Estos datos estarían de acuerdo con un estudio reciente que demuestra que el dominio extracelular de endoglina media la adhesión de células murales (Rossi *et al*, 2015). Por tanto, endoglina es necesaria para una correcta adhesión mural, pero un aumento de sus niveles hace que el dominio intracelular medie una respuesta que impide la unión de pericitos. Una hipótesis es que la activación y desestabilización del endotelio que produce endoglina sean incompatibles temporalmente, de manera mediada por otro mecanismo regulador, con la cobertura mural del vaso. Serían necesarios más experimentos para demostrar si estas hipótesis son verdaderas.

6. Modelo: posible papel de endoglina durante la angiogénesis

El conjunto de nuestros resultados, junto con las evidencias previas, nos permite plantear una serie de hipótesis sobre el papel que puede estar jugando endoglina a lo largo del proceso de angiogénesis, si bien éstas quedan totalmente abierta a futuras investigaciones que completen este trabajo.

Podemos proponer un modelo en el que los niveles de endoglina aumentarían de forma local en las células endoteliales en las que se produce una activación y que desencadenan el proceso de *sprouting*, es decir, durante el proceso de desestabilización del endotelio quiescente. Sería necesario que sus niveles se redujesen en las células endoteliales de la zona más atrasada del vaso de nueva formación para el crecimiento del vaso. Esta reducción en los niveles favorecería la subsecuente estabilización del endotelio y la adhesión de células murales. Los niveles de endoglina regresarían a niveles basales en el endotelio estable del vaso maduro. Un esquema de esta hipótesis se recoge a continuación en la Figura 59, y se explican con más detalle en la Tabla 17:

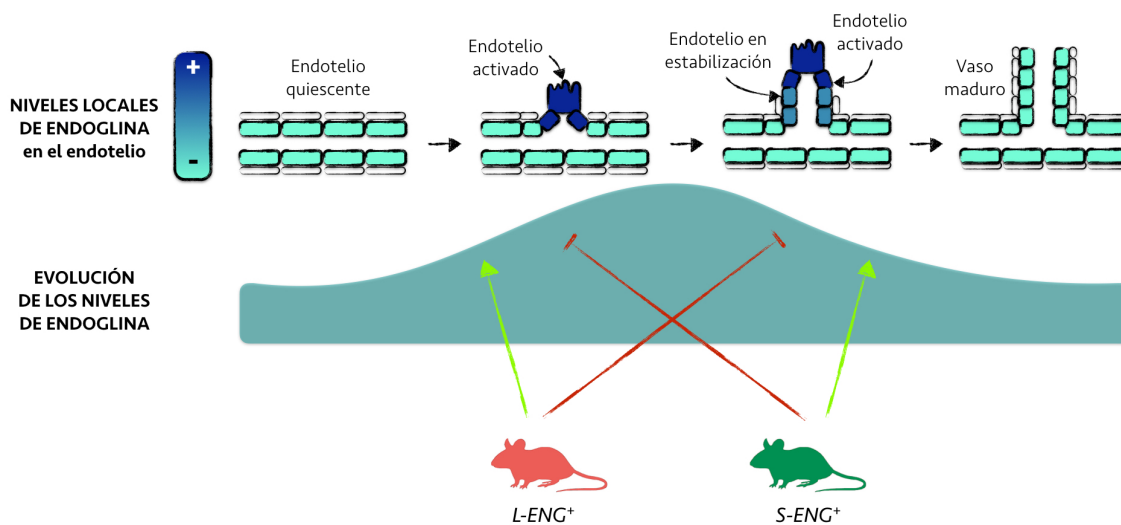


Figura 59. Hipótesis sobre la dinámica de expresión de endoglina durante la angiogénesis

Niveles locales de endoglina en los diferentes estadios de diferenciación del endotelio. Evolución de los niveles relativos de endoglina en el tejido.

Tabla 17. Posible papel de endoglina en las diferentes fases de la angiogénesis

| Fase angiogénesis | Niveles endoglina | Efecto |
|--------------------------------|-------------------|--|
| Vaso estable | Basales | Los niveles basales de endoglina contribuyen al mantenimiento de la homeostasis del vaso: interacciones de las células de la pared vascular y regulación de la permeabilidad vascular y el paso de células. |
| Inicio sprouting | Aumentan | Promoción de la migración de las células endoteliales hacia el estímulo, menos división celular. Mediado por el dominio intracelular. No afecta al genotipo <i>tip / stalk</i> . ¿Impide el reclutamiento y unión de células murales? Quizá no directamente, pero sí al activar el endotelio. |
| Crecimiento del vaso | ¿Disminuyen? | El equilibrio migración / proliferación celular se balancea hacia la proliferación, favoreciendo el crecimiento del vaso. |
| Resolución y maduración | ¿Basales? | Permiten la estabilización del vaso y la unión de células murales. Promovido por el dominio extracelular. |

Conclusions

*“An author doesn't necessarily understand
the meaning of his own story
better than anyone else.”*

Alice in Wonderland, Lewis Carroll

From the results presented in this work, we come up to the following conclusions:

1. Overexpression of endoglin does not improve post-ischemic reperfusion.
2. The fundamental role that endoglin plays in post-ischemic reperfusion is mediated by its cytosolic domain.
3. Continuous overexpression of endoglin leads to an impaired angiogenesis and an altered structure of the new blood vessels.
4. Alterations in angiogenesis caused by L- or S-endoglin overexpression do not seem to be due to modifications in the tip / stalk selection during sprouting.
5. An excess of endoglin in the endothelial cell reduces its proliferation in a cytosolic domain-mediated manner.
6. Endoglin overexpression promotes endothelial cell migration in a cytosolic-domain independent way, whereas this cytosolic domain mediates the increased endothelial cell invasiveness of the extracellular matrix.
7. Extracellular domain of endoglin promotes pericyte recruitment to the new capillary.

Bibliografía

“Fuera del perro, el libro es el mejor amigo del hombre.
Dentro del perro, quizá esté muy oscuro para leer.”

Groucho Marx

- Abraham S, Kogata N, Fassler R & Adams RH (2008) Integrin beta1 subunit controls mural cell adhesion, spreading, and blood vessel wall stability. *Circ Res* **102**: 562–570 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18202311>
- Abraham S, Yeo M, Montero-Balaguer M, Paterson H, Dejana E, Marshall CJ & Mavria G (2009) VE-Cadherin-Mediated Cell-Cell Interaction Suppresses Sprouting via Signaling to MLC2 Phosphorylation. *Curr. Biol.* **19**: 668–674 Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2009.02.057>
- Adams RH & Alitalo K (2007) Molecular regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**: 464–478 Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17522591
- Adams RH & Eichmann A (2010) Axon guidance molecules in vascular patterning. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2**: a001875 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20452960>
- Ahluwalia A & Tamawski AS (2012) Critical role of hypoxia sensor–HIF-1alpha in VEGF gene activation. Implications for angiogenesis and tissue injury healing. *Curr Med Chem* **19**: 90–97 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22300081>
- Allinson KR, Lee HS, Fruttiger M, McCarty JH, McCarty J & Arthur HM (2012) Endothelial expression of TGFβ type II receptor is required to maintain vascular integrity during postnatal development of the central nervous system. *PLoS One* **7**: e39336 Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3383742&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Alt A, Miguel-Romero L, Donderis J, Aristorena M, Blanco FJ, Round A, Rubio V, Bernabeu C & Marina A (2012) Structural and functional insights into endoglin ligand recognition and binding. *PLoS One* **7**: e29948 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22347366>
- American Veterinary Medical Association (2013) AVMA Guidelines for the Euthanasia of Animals: 2013 Edition. Available at: <https://www.avma.org/KB/Policies/Documents/euthanasia.pdf>
- Anderberg C, Cunha SI, Zhai Z, Cortez E, Pardali E, Johnson JR, Franco M, Paez-Ribes M, Cordiner R, Fuxe J, Johansson BR, Goumans MJ, Casanovas O, ten Dijke P, Arthur HM & Pietras K (2013) Deficiency for endoglin in tumor vasculature weakens the endothelial barrier to metastatic dissemination. *J Exp Med* **210**: 563–579 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23401487>
- Ardelean DS, Jerkic M, Yin M, Peter M, Ngan B, Kerbel RS, Foster FS & Letarte M (2014a) Endoglin and activin receptor-like kinase 1 heterozygous mice have a distinct pulmonary and hepatic angiogenic profile and response to anti-VEGF treatment. *Angiogenesis* **17**: 129–146 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24061911>
- Ardelean DS, Yin M, Jerkic M, Peter M, Ngan B, Kerbel RS, Foster FS & Letarte M (2014b) Anti-VEGF therapy reduces intestinal inflammation in Endoglin heterozygous mice subjected to experimental colitis. *Angiogenesis* **17**: 641–659 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24510304>
- Aristorena M, Blanco FJ, de Las Casas-Engel M, Ojeda-Fernandez L, Gallardo-Vara E, Corbi A, Botella LM & Bernabeu C (2014) Expression of endoglin isoforms in the myeloid lineage and their role during aging and macrophage polarization. *J Cell Sci* **127**: 2723–2735 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24777481>
- Arthur HM, Ure J, Smith AJ, Renforth G, Wilson DI, Torsney E, Charlton R, Parums D V, Jowett T, Marchuk DA, Burn J & Diamond AG (2000) Endoglin, an ancillary TGFβ receptor, is required for extraembryonic angiogenesis and plays a key role in heart development. *Dev Biol* **217**: 42–53 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10625534>
- Asahara T, Masuda H, Takahashi T, Kalka C, Pastore C, Silver M, Kearne M, Magner M & Isner JM (1999) Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal

- vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circ Res* **85**: 221–228 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10436164>
- Asai J, Takenaka H, Hirakawa S, Sakabe J, Hagura A, Kishimoto S, Maruyama K, Kajiya K, Kinoshita S, Tokura Y & Katoh N (2012) Topical simvastatin accelerates wound healing in diabetes by enhancing angiogenesis and lymphangiogenesis. *Am J Pathol* **181**: 2217–2224 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23138019>
- Asai J, Takenaka H, Ii M, Asahi M, Kishimoto S, Katoh N & Losordo DW (2013) Topical application of ex vivo expanded endothelial progenitor cells promotes vascularisation and wound healing in diabetic mice. *Int Wound J* **10**: 527–533 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22738265>
- Ashikari-Hada S, Habuchi H, Kariya Y & Kimata K (2005) Heparin regulates vascular endothelial growth factor165-dependent mitogenic activity, tube formation, and its receptor phosphorylation of human endothelial cells. Comparison of the effects of heparin and modified heparins. *J Biol Chem* **280**: 31508–31515 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16027124>
- Attanasio S & Snell J (2009) Therapeutic angiogenesis in the management of critical limb ischemia: current concepts and review. *Cardiol. Rev.* **17**: 115–20 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19384084>
- Bagley RG, Weber W, Rouleau C & Teicher BA (2005) Pericytes and endothelial precursor cells: cellular interactions and contributions to malignancy. *Cancer Res* **65**: 9741–9750 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16266995>
- Bai Y, Leng Y, Yin G, Pu X, Huang Z, Liao X, Chen X & Yao Y (2014) Effects of combinations of BMP-2 with FGF-2 and/or VEGF on HUVECs angiogenesis in vitro and CAM angiogenesis in vivo. *Cell Tissue Res* **356**: 109–121 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24442492>
- Baker M, Robinson SD, Lechertier T, Barber PR, Tavora B, D'Amico G, Jones DT, Vojnovic B & Hodivala-Dilke K (2012) Use of the mouse aortic ring assay to study angiogenesis. *Nat. Protoc.* **7**: 89–104 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22193302>
- Baltimore D (1970) RNA-dependent DNA polymerase in virions of RNA tumour viruses. *Nature* **226**: 1209–1211 Available at: <http://www.nature.com/nature/journal/v226/n5252/abs/2261209a0.html>
- Barnett JM, Suarez S, McCollum GW & Penn JS (2014) Endoglin promotes angiogenesis in cell- and animal-based models of retinal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **55**: 6490–6498 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25159209>
- Basu RK, Hubchak S, Hayashida T, Runyan CE, Schumacker PT & Schnaper HW (2011) Interdependence of HIF-1 α and TGF- β /Smad3 signaling in normoxic and hypoxic renal epithelial cell collagen expression. *Am J Physiol Ren. Physiol* **300**: F898–905 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21209004>
- Bellon T, Corbi A, Lastres P, Cales C, Cebrian M, Vera S, Cheifetz S, Massague J, Letarte M & Bernabeu C (1993) Identification and expression of two forms of the human transforming growth factor- β -binding protein endoglin with distinct cytoplasmic regions. *Eur J Immunol* **23**: 2340–2345 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8370410>
- Benedito R, Roca C, Sorensen I, Adams S, Gossler A, Fruttiger M & Adams RH (2009) The notch ligands Dll4 and Jagged1 have opposing effects on angiogenesis. *Cell* **137**: 1124–1135 Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19524514
- Benedito R, Trindade A, Hirashima M, Henrique D, da Costa LL, Rossant J, Gill PS & Duarte A (2008) Loss of Notch signalling induced by Dll4 causes arterial calibre reduction by increasing endothelial cell response to angiogenic stimuli. *BMC Dev Biol* **8**: 117 Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19087347

- Bessman MJ, Lehman IR, Simms ES & Kornberg A (1958) Enzymatic synthesis of deoxyribonucleic acid. II. General properties of the reaction. *J. Biol. Chem.* **233**: 171–7 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13563463>
- Birukova AA, Birukov KG, Gorshkov B, Liu F, Garcia JG & Verin AD (2005) MAP kinases in lung endothelial permeability induced by microtubule disassembly. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **289**: L75–84 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15778245>
- Bishop PN (2015) The role of extracellular matrix in retinal vascular development and preretinal neovascularization. *Exp. Eye Res.* **133**: 30–6 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25819452>
- Blanco FJ & Bernabeu C (2011) Alternative splicing factor or splicing factor-2 plays a key role in intron retention of the endoglin gene during endothelial senescence. *Aging Cell* **10**: 896–907 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21668763>
- Blanco FJ & Bernabeu C (2012) The Splicing Factor SRSF1 as a Marker for Endothelial Senescence. *Front Physiol* **3**: 54 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22470345>
- Blanco FJ, Grande MT, Langa C, Oujo B, Velasco S, Rodriguez-Barbero A, Perez-Gomez E, Quintanilla M, Lopez-Novoa JM & Bernabeu C (2008) S-endoglin expression is induced in senescent endothelial cells and contributes to vascular pathology. *Circ Res* **103**: 1383–1392 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18974388>
- Blanco FJ, Ojeda-Fernandez L, Aristorena M, Gallardo-Vara E, Benguria A, Dopazo A, Langa C, Botella LM & Bernabeu C (2015) Genome-wide transcriptional and functional analysis of endoglin isoforms in the human promonocytic cell line U937. *J Cell Physiol* **230**: 947–958 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25216259>
- Blanco R & Gerhardt H (2013) VEGF and Notch in tip and stalk cell selection. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **3**: a006569 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3530037/?tool=pmcentrez>
- Bockhorn M, Tsuzuki Y, Xu L, Frilling A, Broelsch CE & Fukumura D (2003) Differential vascular and transcriptional responses to anti-vascular endothelial growth factor antibody in orthotopic human pancreatic cancer xenografts. *Clin Cancer Res* **9**: 4221–4226 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14519649>
- Bodey B, Bodey Jr. B, Siegel SE & Kaiser HE (1998) Upregulation of endoglin (CD105) expression during childhood brain tumor-related angiogenesis. Anti-angiogenic therapy. *Anticancer Res* **18**: 1485–1500 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9673360>
- Boroujerdi A, Welsch-Alves J V, Tigges U & Milner R (2012) Chronic cerebral hypoxia promotes arteriogenic remodeling events that can be identified by reduced endoglin (CD105) expression and a switch in beta1 integrins. *J Cereb Blood Flow Metab* **32**: 1820–1830 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22739620>
- Botella LM, Sanchez-Elsner T, Sanz-Rodriguez F, Kojima S, Shimada J, Guerrero-Esteo M, Cooreman MP, Ratzu V, Langa C, Vary CP, Ramirez JR, Friedman S & Bernabeu C (2002) Transcriptional activation of endoglin and transforming growth factor-beta signaling components by cooperative interaction between Sp1 and KLF6: their potential role in the response to vascular injury. *Blood* **100**: 4001–4010 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12433697>
- Bourdeau A, Dumont DJ & Letarte M (1999) A murine model of hereditary hemorrhagic telangiectasia. *J Clin Invest* **104**: 1343–1351 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10562296>
- Bourdeau A, Faughnan ME & Letarte M (2000) Endoglin-deficient mice, a unique model to study hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Trends Cardiovasc. Med.* **10**: 279–85 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11343967>
- Bruna A, Darken RS, Rojo F, Ocana A, Penuelas S, Arias A, Paris R, Tortosa A, Mora J, Baselga J &

- Seoane J (2007) High TGFbeta-Smad activity confers poor prognosis in glioma patients and promotes cell proliferation depending on the methylation of the PDGF-B gene. *Cancer Cell* **11**: 147–160 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17292826>
- Buhring HJ, Muller CA, Letarte M, Gougos A, Saalmuller A, van Agthoven AJ & Busch FW (1991) Endoglin is expressed on a subpopulation of immature erythroid cells of normal human bone marrow. *Leukemia* **5**: 841–847 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1961019>
- Burrows FJ, Derbyshire EJ, Tazzari PL, Amlot P, Gazdar AF, King SW, Letarte M, Vitetta ES & Thorpe PE (1995) Up-regulation of endoglin on vascular endothelial cells in human solid tumors: implications for diagnosis and therapy. *Clin Cancer Res* **1**: 1623–1634 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9815965>
- Cai J, Pardali E, Sanchez-Duffhues G & ten Dijke P (2012) BMP signaling in vascular diseases. *FEBS Lett* **586**: 1993–2002 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22710160>
- Cai WJ, Li MB, Wu X, Wu S, Zhu W, Chen D, Luo M, Eitenmuller I, Kampmann A, Schaper J & Schaper W (2009) Activation of the integrins alpha 5beta 1 and alpha vbeta 3 and focal adhesion kinase (FAK) during arteriogenesis. *Mol Cell Biochem* **322**: 161–169 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18998200>
- Carmeliet P & Jain RK (2011) Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature* **473**: 298–307 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21593862>
- Carvalho RL, Jonker L, Goumans MJ, Larsson J, Bouwman P, Karlsson S, Dijke PT, Arthur HM & Mummery CL (2004) Defective paracrine signalling by TGFbeta in yolk sac vasculature of endoglin mutant mice: a paradigm for hereditary haemorrhagic telangiectasia. *Development* **131**: 6237–6247 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15548578>
- Castonguay R, Werner ED, Matthews RG, Presman E, Mulivor AW, Solban N, Sako D, Pearsall RS, Underwood KW, Seehra J, Kumar R & Grinberg A V (2011) Soluble endoglin specifically binds bone morphogenetic proteins 9 and 10 via its orphan domain, inhibits blood vessel formation, and suppresses tumor growth. *J Biol Chem* **286**: 30034–30046 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21737454>
- Ceradini DJ, Kulkarni AR, Callaghan MJ, Tepper OM, Bastidas N, Kleinman ME, Capla JM, Galiano RD, Levine JP & Gurtner GC (2004) Progenitor cell trafficking is regulated by hypoxic gradients through HIF-1 induction of SDF-1. *Nat Med* **10**: 858–864 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15235597>
- Chappell JC, Wiley DM & Bautch VL (2011) Regulation of blood vessel sprouting. *Semin Cell Dev Biol* **22**: 1005–1011 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22020130?dopt=Citation>
- Cheifetz S, Bellon T, Cales C, Vera S, Bernabeu C, Massague J & Letarte M (1992) Endoglin is a component of the transforming growth factor-beta receptor system in human endothelial cells. *J Biol Chem* **267**: 19027–19030 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1326540>
- Chen C-W, Okada M, Proto JD, Gao X, Sekiya N, Beckman SA, Corselli M, Crisan M, Saporov A, Tobita K, Péault B & Huard J (2013) Human pericytes for ischemic heart repair. *Stem Cells* **31**: 305–16 Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3572307&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Cho S-W, Moon S, Lee S, Kang S-W, Kim J, Lim JM, Kim H, Kim B-S & Chung H-M (2007) Improvement of postnatal neovascularization by human embryonic stem cell derived endothelial-like cell transplantation in a mouse model of hindlimb ischemia. *Circulation* **116**: 2409–19 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17984381>
- Chow RL & Lang R a (2001) Early eye development in vertebrates. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **17**: 255–296 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11687490>
- Conley BA, Koleva R, Smith JD, Kacer D, Zhang D, Bernabeu C & Vary CP (2004) Endoglin controls

- cell migration and composition of focal adhesions: function of the cytosolic domain. *J Biol Chem* **279**: 27440–27449 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15084601>
- Conley BA, Smith JD, Guerrero-Esteo M, Bernabeu C & Vary CP (2000) Endoglin, a TGF-beta receptor-associated protein, is expressed by smooth muscle cells in human atherosclerotic plaques. *Atherosclerosis* **153**: 323–335 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11164421>
- Cook BD, Ferrari G, Pintucci G & Mignatti P (2008) TGF-1 induces rearrangement of FLK-1-VE-cadherin-beta-catenin complex at the adherens junction through VEGF-mediated signaling. *J. Cell. Biochem.* **105**: 1367–1373 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2588645/>
- Costamagna D, Quattrocchi M, van Tienen F, Umans L, de Coo IF, Zwijsen A, Huylebroeck D & Sampaolesi M (2015) Smad 1/5/8 are myogenic regulators of murine and human mesoangioblasts. *J Mol Cell Biol* **8**: 73–87 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26450990>
- Coults L, Chawengsaksophak K & Rossant J (2005) Endothelial cells and VEGF in vascular development. *Nature* **438**: 937–945 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16355211>
- Crisan M, Corselli M, Chen WCW & Péault B (2012) Perivascular cells for regenerative medicine. *J. Cell. Mol. Med.* **16**: 2851–2860 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22882758>
- Darland DC, Massingham LJ, Smith SR, Piek E, Saint-Geniez M & D'Amore P a. (2003) Pericyte production of cell-associated VEGF is differentiation-dependent and is associated with endothelial survival. *Dev. Biol.* **264**: 275–288 Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0012160603004925>
- David L, Feige JJ & Bailly S (2009) Emerging role of bone morphogenetic proteins in angiogenesis. *Cytokine Growth Factor Rev* **20**: 203–212 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19502096>
- David L, Mallet C, Keramidas M, Lamande N, Gasc JM, Dupuis-Girod S, Plauchu H, Feige JJ & Bailly S (2008) Bone morphogenetic protein-9 is a circulating vascular quiescence factor. *Circ Res* **102**: 914–922 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18309101>
- David L, Mallet C, Mazerbourg S, Feige JJ & Bailly S (2007) Identification of BMP9 and BMP10 as functional activators of the orphan activin receptor-like kinase 1 (ALK1) in endothelial cells. *Blood* **109**: 1953–1961 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17068149>
- Davis GE & Bayless KJ (2003) An integrin and Rho GTPase-dependent pinocytic vacuole mechanism controls capillary lumen formation in collagen and fibrin matrices. *Microcirculation* **10**: 27–44 Available at: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1038/sj.mn.7800175/abstract>
- Davis GE, Bayless KJ & Mavila A (2002) Molecular basis of endothelial cell morphogenesis in three-dimensional extracellular matrices. *Anat. Rec.* **268**: 252–275 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12382323>
- Dawson MR, Levine JM & Reynolds R (2000) NG2-expressing cells in the central nervous system: are they oligodendroglial progenitors? *J. Neurosci. Res.* **61**: 471–479 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10956416>
- Dehghanian F, Hojati Z & Kay M (2014) New Insights into VEGF-A Alternative Splicing: Key Regulatory Switching in the Pathological Process. *Avicenna J Med Biotechnol* **6**: 192–199 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25414781>
- Dejana E & Orsenigo F (2013) Endothelial adherens junctions at a glance. *J. Cell Sci.* **126**: 2545–9 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23781019>
- Dell'Era P, Nicoli S, Peri G, Nieddu M, Ennas MG & Presta M (2005) FGF2-induced upregulation of DNA polymerase-delta p12 subunit in endothelial cells. *Oncogene* **24**: 1117–21 Available at:

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15608665>
- Depping R, Steinhoff A, Schindler SG, Friedrich B, Fagerlund R, Metzgen E, Hartmann E & Köhler M (2008) Nuclear translocation of hypoxia-inducible factors (HIFs): Involvement of the classical importin α/β pathway. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* **1783**: 394–404 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18187047>
- Derynck R & Feng XH (1997) TGF-beta receptor signaling. *Biochim. Biophys. Acta* **1333**: F105–50 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9395284>
- Derynck R & Zhang YE (2003) Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. *Nature* **425**: 577–584 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14534577>
- Diez-Marques L, Ortega-Velazquez R, Langa C, Rodriguez-Barbero A, Lopez-Novoa JM, Lamas S & Bernabeu C (2002) Expression of endoglin in human mesangial cells: modulation of extracellular matrix synthesis. *Biochim Biophys Acta* **1587**: 36–44 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12009422>
- ten Dijke P & Arthur HM (2007) Extracellular control of TGFbeta signalling in vascular development and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**: 857–869 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17895899>
- ten Dijke P, Goumans MJ & Pardali E (2008) Endoglin in angiogenesis and vascular diseases. *Angiogenesis* **11**: 79–89 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18283546>
- Duwel A, Eleno N, Jerkic M, Arevalo M, Bolanos JP, Bernabeu C & Lopez-Novoa JM (2007) Reduced tumor growth and angiogenesis in endoglin-haploinsufficient mice. *Tumour Biol* **28**: 1–8 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17108712>
- Eichmann A & Simons M (2012) VEGF signaling inside vascular endothelial cells and beyond. *Curr. Opin. Cell Biol.* **24**: 188–193 Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0955067412000154>
- Eilken HM & Adams RH (2010) Dynamics of endothelial cell behavior in sprouting angiogenesis. *Curr Opin Cell Biol* **22**: 617–625 Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=20817428
- Eklund L & Olsen BR (2006) Tie receptors and their angiopoietin ligands are context-dependent regulators of vascular remodeling. *Exp. Cell Res.* **312**: 630–641 Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0014482705004143> \npapers3://publication/doi/10.1016/j.yexcr.2005.09.002
- Engvall E & Perlmann P (1971) Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry* **8**: 871–874 Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/001927917190454X> \npapers2://publication/doi/10.1016/0019-2791(71)90454-X
- Evrard SM, D'Audigier C, Mauge L, Israël-Biet D, Guerin CL, Bieche I, Kovacic JC, Fischer A-M, Gaussem P & Smadja DM (2012) The profibrotic cytokine transforming growth factor- β 1 increases endothelial progenitor cell angiogenic properties. *J. Thromb. Haemost.* **10**: 670–9 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22284809>
- Fernandez LA, Garrido-Martin EM, Sanz-Rodriguez F, Pericacho M, Rodriguez-Barbero A, Eleno N, Lopez-Novoa JM, Duwell A, Vega MA, Bernabeu C & Botella LM (2007) Gene expression fingerprinting for human hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Hum Mol Genet* **16**: 1515–1533 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17420163>
- Fernandez LA, Sanz-Rodriguez F, Zarrabeitia R, Perez-Molino A, Hebbel RP, Nguyen J, Bernabeu C & Botella LM (2005) Blood outgrowth endothelial cells from Hereditary Haemorrhagic Telangiectasia patients reveal abnormalities compatible with vascular lesions. *Cardiovasc Res*

- 68:235–248 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15993872>
- Fernandez-Ruiz E, St-Jacques S, Bellon T, Letarte M & Bernabeu C (1993) Assignment of the human endoglin gene (END) to 9q34→qter. *Cytogenet Cell Genet* **64**: 204–207 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8404038>
- Ferrara N, Frantz G, LeCouter J, Dillard-Telm L, Pham T, Draksharapu A, Giordano T & Peale F (2003a) Differential expression of the angiogenic factor genes vascular endothelial growth factor (VEGF) and endocrine gland-derived VEGF in normal and polycystic human ovaries. *Am J Pathol* **162**: 1881–1893 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12759245>
- Ferrara N, Gerber HP & LeCouter J (2003b) The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* **9**: 669–676 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12778165>
- Finkenzyler G, Hager S & Stark GB (2012) Effects of bone morphogenetic protein 2 on human umbilical vein endothelial cells. *Microvasc Res* **84**: 81–85 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22487440>
- Folkman J (1971) Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med* **285**: 1182–1186 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4938153>
- Folkman J, Merler E, Abernathy C & Williams G (1971) Isolation of a tumor factor responsible for angiogenesis. *J Exp Med* **133**: 275–288 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4332371>
- Foresta C, Schipilliti M, De Toni L, Magagna S, Lancerotto L, Azzena B, Vindigni V & Mazzoleni F (2011) Blood levels, apoptosis, and homing of the endothelial progenitor cells after skin burns and escharectomy. *J Trauma* **70**: 459–465 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21307748>
- Francescone III R a., Faibish M & Shao R (2011) A Matrigel-Based Tube Formation Assay to Assess the Vasculogenic Activity of Tumor Cells. *J. Vis. Exp.*: 2–5 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=A+Matrigel-Based+Tube+Formation+Assay+to+Assess+the+Vasculogenic+Activity+of+Tumor+Cells+francescone>
- Fruttiger M (2007) Development of the retinal vasculature. *Angiogenesis* **10**: 77–88 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17322966>
- Fuchs S, Hermanns MI & Kirkpatrick CJ (2006) Retention of a differentiated endothelial phenotype by outgrowth endothelial cells isolated from human peripheral blood and expanded in long-term cultures. *Cell Tissue Res* **326**: 79–92 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16736194>
- Fujita D, Tanabe A, Sekijima T, Soen H, Narahara K, Yamashita Y, Terai Y, Kamegai H & Ohmichi M (2010) Role of extracellular signal-regulated kinase and AKT cascades in regulating hypoxia-induced angiogenic factors produced by a trophoblast-derived cell line. *J Endocrinol* **206**: 131–140 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20371567>
- Gabbiani G, Kocher O, Bloom WS, Vandekerckhove J & Weber K (1984) Actin expression in smooth muscle cells of rat aortic intimal thickening, human atheromatous plaque, and cultured rat aortic media. *J. Clin. Invest.* **73**: 148–52 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC424985/?tool=pmcentrez>
- Gaengel K, Genove G, Armulik A & Betsholtz C (2009) Endothelial-mural cell signaling in vascular development and angiogenesis. *Arter. Thromb Vasc Biol* **29**: 630–638 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19164813>
- Gaengel K, Niaudet C, Hagikura K, Siemsen BL, Muhl L, Hofmann JJ, Ebarasi L, Nyström S, Rymo S, Chen LL, Pang MF, Jin Y, Raschperger E, Roswall P, Schulte D, Benedito R, Larsson J, Hellström M, Fuxe J, Uhlén P, et al (2012) The Sphingosine-1-Phosphate Receptor S1PR1 Restricts Sprouting Angiogenesis by Regulating the Interplay between VE-Cadherin and VEGFR2. *Dev.*

- Cell* **23**: 587–599 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=The+Sphingosine-1-Phosphate+Receptor+S1PR1+Restricts+Sprouting+Angiogenesis+by+Regulating+the+Interplay+between+VE-Cadherin+and+VEGFR2>
- Gallagher S, Winston SE, Fuller SA & Hurrell JGR (2004) Immunoblotting and immunodetection. *Curr. Protoc. Mol. Biol.* **Chapter 10**: Unit 10.8 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18265338>
- Gavard J (2014) Endothelial permeability and VE-cadherin: A wacky comradeship. *Cell Adhes. Migr.* **8**: 158–164 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3916348/?tool=pmcentrez>
- Gavard J & Gutkind JS (2006) VEGF controls endothelial-cell permeability by promoting the beta-arrestin-dependent endocytosis of VE-cadherin. *Nat Cell Biol* **8**: 1223–1234 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17060906>
- Geng L, Chaudhuri A, Talmon G, Wisecarver JL & Wang J (2013) TGF-Beta suppresses VEGFA-mediated angiogenesis in colon cancer metastasis. *PLoS One* **8**: e59918 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23536895>
- Gerhardt H, Golding M, Fruttiger M, Ruhrberg C, Lundkvist A, Abramsson A, Jeltsch M, Mitchell C, Alitalo K, Shima D & Betsholtz C (2003) VEGF guides angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia. *J Cell Biol* **161**: 1163–1177 Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12810700
- Geudens I & Gerhardt H (2011) Coordinating cell behaviour during blood vessel formation. *Development* **138**: 4569–4583 Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=21965610
- Ghosh AK, Shanafelt TD, Cimmino A, Taccioli C, Volinia S, Liu CG, Calin GA, Croce CM, Chan DA, Giaccia AJ, Secreto C, Wellik LE, Lee YK, Mukhopadhyay D & Kay NE (2009) Aberrant regulation of pVHL levels by microRNA promotes the HIF/VEGF axis in CLL B cells. *Blood* **113**: 5568–5574 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19336759>
- Gill M, Dias S, Hattori K, Rivera ML, Hicklin D, Witte L, Girardi L, Yurt R, Himel H & Rafii S (2001) Vascular trauma induces rapid but transient mobilization of VEGFR2(+)AC133(+) endothelial precursor cells. *Circ Res* **88**: 167–174 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11157668>
- Goldberg PL, MacNaughton DE, Clements RT, Minnear FL & Vincent PA (2002) p38 MAPK activation by TGF-beta1 increases MLC phosphorylation and endothelial monolayer permeability. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **282**: L146–54 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11741826>
- González-Mariscal L, Betanzos A & Avila-Flores A (2000) MAGUK proteins: structure and role in the tight junction. *Semin. Cell Dev. Biol.* **11**: 315–324 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=MAGUK+proteins%3A+structure+and+role+in+the+tight+junction+mariscal>
- González-Núñez M, Muñoz-Félix JM & López-Novoa JM (2013) The ALK-1/Smad1 pathway in cardiovascular physiopathology. A new target for therapy? *Biochim Biophys Acta* **1832**: 1492–1510 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23707512>
- González-Núñez M, Riobos AS, Castellano O, Fuentes-Calvo I, de Los Ángeles Sevilla M, Oujo B, Pericacho M, Cruz-Gonzalez I, Pérez-Barriocanal F, Ten Dijke P & López-Novoa JM (2015) Heterozygous disruption of activin receptor-like kinase 1 is associated with increased arterial pressure in mice. *Dis. Model. Mech.* **8**: 1427–39 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4631783/?tool=pmcentrez>
- Gougos A & Letarte M (1988a) Biochemical characterization of the 44G4 antigen from the HOON

- pre-B leukemic cell line. *J Immunol* **141**: 1934–1940 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3262645>
- Gougos A & Letarte M (1988b) Identification of a human endothelial cell antigen with monoclonal antibody 44G4 produced against a pre-B leukemic cell line. *J Immunol* **141**: 1925–1933 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3262644>
- Gougos A & Letarte M (1990) Primary structure of endoglin, an RGD-containing glycoprotein of human endothelial cells. *J Biol Chem* **265**: 8361–8364 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1692830>
- Gougos A, St Jacques S, Greaves A, O'Connell PJ, d'Apice AJ, Buhning HJ, Bernabeu C, van Mourik JA & Letarte M (1992) Identification of distinct epitopes of endoglin, an RGD-containing glycoprotein of endothelial cells, leukemic cells, and syncytiotrophoblasts. *Int Immunol* **4**: 83–92 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1371694>
- Goumans MJ, Lebrin F & Valdimarsdottir G (2003a) Controlling the angiogenic switch: a balance between two distinct TGF- β receptor signaling pathways. *Trends Cardiovasc Med* **13**: 301–307 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14522471>
- Goumans MJ, Liu Z & ten Dijke P (2009) TGF- β signaling in vascular biology and dysfunction. *Cell Res* **19**: 116–127 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19114994>
- Goumans MJ, Valdimarsdottir G, Itoh S, Lebrin F, Larsson J, Mummery C, Karlsson S & ten Dijke P (2003b) Activin receptor-like kinase (ALK)₁ is an antagonistic mediator of lateral TGF β /ALK5 signaling. *Mol Cell* **12**: 817–828 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14580334>
- Goumans MJ, Valdimarsdottir G, Itoh S, Rosendahl A, Sideras P & ten Dijke P (2002) Balancing the activation state of the endothelium via two distinct TGF- β type I receptors. *EMBO J* **21**: 1743–1753 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11927558>
- Graulich W, Nettelbeck DM, Fischer D, Kissel T & Muller R (1999) Cell type specificity of the human endoglin promoter. *Gene* **227**: 55–62 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9931433>
- Gray MJ, Zhang J, Ellis LM, Semenza GL, Evans DB, Watowich SS & Gallick GE (2005) HIF-1 α , STAT3, CBP/p300 and Ref-1/APE are components of a transcriptional complex that regulates Src-dependent hypoxia-induced expression of VEGF in pancreatic and prostate carcinomas. *Oncogene* **24**: 3110–3120 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15735682>
- Groppa E, Brkic S, Bovo E, Reginato S, Sacchi V, Di Maggio N, Muraro MG, Calabrese D, Heberer M, Gianni-Barrera R & Banfi A (2015) VEGF dose regulates vascular stabilization through Semaphorin3A and the Neuropilin-1+ monocyte/TGF- β ₁ paracrine axis. *EMBO Mol. Med.* **7**: 1366–84 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4604689/?tool=pmcentrez>
- Guedez L, Rivera AM, Salloum R, Miller ML, Diegmüller JJ, Bungay PM & Stetler-Stevenson WG (2003) Quantitative assessment of angiogenic responses by the directed in vivo angiogenesis assay. *Am J Pathol* **162**: 1431–1439 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12707026>
- Guerrero-Esteo M, Lastres P, Letamendía a, Pérez-Alvarez MJ, Langa C, López L a, Fabra a, García-Pardo a, Vera S, Letarte M & Bernabéu C (1999) Endoglin overexpression modulates cellular morphology, migration, and adhesion of mouse fibroblasts. *Eur. J. Cell Biol.* **78**: 614–23 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10535303>
- Guerrero-Esteo M, Sanchez-Elsner T, Letamendia A & Bernabeu C (2002) Extracellular and cytoplasmic domains of endoglin interact with the transforming growth factor- β receptors I and II. *J Biol Chem* **277**: 29197–29209 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12015308>
- Hakanpaa L, Sipila T, Leppanen V-M, Gautam P, Nurmi H, Jacquemet G, Eklund L, Ivaska J, Alitalo K

- & Saharinen P (2015) Endothelial destabilization by angiopoietin-2 via integrin β_1 activation. *Nat. Commun.* **6**: 5962 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4316742/?tool=pmcentrez>
- Hamdan R, Zhou Z & Kleinerman ES (2011) SDF-1 α induces PDGF-B expression and the differentiation of bone marrow cells into pericytes. *Mol Cancer Res* **9**: 1462–1470 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21911740>
- Harhaj NS & Antonetti D a. (2004) Regulation of tight junctions and loss of barrier function in pathophysiology. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **36**: 1206–1237 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Regulation+of+tight+junctions+and+loss+of+barrier+function+in+pathophysiology+harhaj>
- Hazarika S, Dokun AO, Li Y, Popel AS, Kontos CD & Annex BH (2007) Impaired angiogenesis after hindlimb ischemia in type 2 diabetes mellitus: differential regulation of vascular endothelial growth factor receptor 1 and soluble vascular endothelial growth factor receptor 1. *Circ Res* **101**: 948–956 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17823371>
- Heldin CH & Westermark B (1999) Mechanism of action and in vivo role of platelet-derived growth factor. *Physiol. Rev.* **79**: 1283–1316 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10508235>
- Hellstrom M, Kalen M, Lindahl P, Abramsson A & Betsholtz C (1999) Role of PDGF-B and PDGFR-beta in recruitment of vascular smooth muscle cells and pericytes during embryonic blood vessel formation in the mouse. *Development* **126**: 3047–3055 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10375497>
- Hellstrom M, Phng LK, Hofmann JJ, Wallgard E, Coultas L, Lindblom P, Alva J, Nilsson AK, Karlsson L, Gaiano N, Yoon K, Rossant J, Iruela-Arispe ML, Kalen M, Gerhardt H & Betsholtz C (2007) Dll4 signalling through Notch1 regulates formation of tip cells during angiogenesis. *Nature* **445**: 776–780 Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17259973
- Herbert SP & Stainier DY (2011) Molecular control of endothelial cell behaviour during blood vessel morphogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* **12**: 551–564 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21860391>
- Hirschi KK, Rohovsky SA & D'Amore PA (1998) PDGF, TGF- β , and heterotypic cell-cell interactions mediate endothelial cell-induced recruitment of 10T1/2 cells and their differentiation to a smooth muscle fate. *J. Cell Biol.* **141**: 805–814 Available at: <http://jcb.rupress.org/content/141/3/805.long>
- Hofmann JJ & Iruela-Arispe M (2007a) Notch expression patterns in the retina: An eye on receptor-ligand distribution during angiogenesis. *Gene Expr. Patterns* **7**: 461–470 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Notch+expression+patterns+in+the+retina%3A+An+eye+on+receptor+ligand+during+angiogenesis>
- Hofmann JJ & Iruela-Arispe M (2007b) Notch signaling in blood vessels: Who is talking to whom about what? *Circ. Res.* **100**: 1556–1568 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Notch+signaling+in+blood+vessels%3A+Who+is+talking+to+whom+about+what%3F>
- Holderfield MT & Hughes CC (2008) Crosstalk between vascular endothelial growth factor, notch, and transforming growth factor-beta in vascular morphogenesis. *Circ Res* **102**: 637–652 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18369162>
- Hu N, Jiang D, Huang E, Liu X, Li R, Liang X, Kim SH, Chen X, Gao J-L, Zhang H, Zhang W, Kong Y-H, Zhang J, Wang J, Shui W, Luo X, Liu B, Cui J, Rogers MR, Shen J, et al (2013) BMP9-regulated angiogenic signaling plays an important role in the osteogenic differentiation of mesenchymal progenitor cells. *J. Cell Sci.* **126**: 532–41 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23203800>

- Huang F & Chen Y-G (2012) Regulation of TGF- β receptor activity. *Cell Biosci.* **2**: 9 Available at: <http://www.cellandbioscience.com/content/2/1/9>
- Hung SP, Yang MH, Tseng KF & Lee OK (2013) Hypoxia-Induced Secretion of TGF-beta1 in Mesenchymal Stem Cell Promotes Breast Cancer Cell Progression. *Cell Transpl.* **22**: 1869–1882 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23067574>
- Hynes RO (2009) The extracellular matrix: not just pretty fibrils. *Science* **326**: 1216–1219 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=The+extracellular+matrix%3A+not+just+pretty+fibrils>
- Ide A, Baker N & Warren S (1939) Vascularization of the Brown Pearce rabbit epithelioma transplant as seen in the transparent ear chamber. *Am. J. Roentgenol.* **42**: 891–899
- Ikushima H, Komuro A, Isogaya K, Shinozaki M, Hellman U, Miyazawa K & Miyazono K (2008) An Id-like molecule, HHM, is a synexpression group-restricted regulator of TGF-beta signalling. *EMBO J* **27**: 2955–2965 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18923419>
- Isogai Z, Ono RN, Ushiro S, Keene DR, Chen Y, Mazziari R, Charbonneau NL, Reinhardt DP, Rifkin DB & Sakai LY (2003) Latent transforming growth factor beta-binding protein 1 interacts with fibrillin and is a microfibril-associated protein. *J. Biol. Chem.* **278**: 2750–2757 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Latent+transforming+growth+factor+beta-binding+protein+1+interacts+with+fibrillin+and+is+a+microfibril-associated+protein>
- Jain RK (2003) Molecular regulation of vessel maturation. *Nat Med* **9**: 685–693 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12778167>
- Jakobsson L, Franco C a, Bentley K, Collins RT, Ponsioen B, Aspalter IM, Rosewell I, Busse M, Thurston G, Medvinsky A, Schulte-Merker S & Gerhardt H (2010) Endothelial cells dynamically compete for the tip cell position during angiogenic sprouting. *Nat. Cell Biol.* **12**: 943–953 Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/ncb2103>
- Jerkic M & Letarte M (2015) Increased endothelial cell permeability in endoglin-deficient cells. *FASEB J* **29**: 3678–3688 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25972355>
- Jerkic M, Peter M, Ardelean D, Fine M, Konerding MA & Letarte M (2010) Dextran sulfate sodium leads to chronic colitis and pathological angiogenesis in Endoglin heterozygous mice. *Inflamm Bowel Dis* **16**: 1859–1870 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20848471>
- Jerkic M, Rivas-Elena J V, Prieto M, Carron R, Sanz-Rodriguez F, Perez-Barriocanal F, Rodriguez-Barbero A, Bernabeu C & Lopez-Novoa JM (2004) Endoglin regulates nitric oxide-dependent vasodilatation. *FASEB J* **18**: 609–611 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14734648>
- Jerkic M, Rivas-Elena J V, Santibanez JF, Prieto M, Rodriguez-Barbero A, Perez-Barriocanal F, Pericacho M, Arevalo M, Vary CP, Letarte M, Bernabeu C & Lopez-Novoa JM (2006a) Endoglin regulates cyclooxygenase-2 expression and activity. *Circ Res* **99**: 248–256 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16840721>
- Jerkic M, Rodriguez-Barbero A, Prieto M, Toporsian M, Pericacho M, Rivas-Elena J V, Obreo J, Wang A, Perez-Barriocanal F, Arevalo M, Bernabeu C, Letarte M & Lopez-Novoa JM (2006b) Reduced angiogenic responses in adult Endoglin heterozygous mice. *Cardiovasc Res* **69**: 845–854 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16405930>
- Jones N & Dumont DJ (2000) Tek/Tie2 signaling: new and old partners. *Cancer Metastasis Rev.* **19**: 13–7 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11191051>
- Jonker L (2014) TGF-beta & BMP receptors endoglin and ALK1: overview of their functional role and status as antiangiogenic targets. *Microcirculation* **21**: 93–103 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25279424>
- Joo HJ, Song S, Seo H-R, Shin JH, Choi S-C, Park JH, Yu CW, Hong SJ & Lim D-S (2015) Human

- endothelial colony forming cells from adult peripheral blood have enhanced sprouting angiogenic potential through up-regulating VEGFR2 signaling. *Int. J. Cardiol.* **197**: 33–43 Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167527315013145>
- Jourde-Chiche N, Dou L, Sabatier F, Calaf R, Cerini C, Robert S, Camoin-Jau L, Charpiot P, Argiles A, Dignat-George F & Brunet P (2009) Levels of circulating endothelial progenitor cells are related to uremic toxins and vascular injury in hemodialysis patients. *J Thromb Haemost* **7**: 1576–1584 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19583820>
- Jovine L, Darie CC, Litscher ES & Wassarman PM (2005) Zona pellucida domain proteins. *Annu Rev Biochem* **74**: 83–114 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15952882>
- Kacian DL & Myers JC (1976) Synthesis of extensive, possibly complete, DNA copies of poliovirus RNA in high yields and at high specific activities. *Proc Natl Acad Sci USA* **73**: 2191–2195 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC430492/>
- Kalluri R (2003) Basement membranes: structure, assembly and role in tumour angiogenesis. *Nat Rev Cancer* **3**: 422–433 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12778132>
- Kamei M, Saunders WB, Bayless KJ, Dye L, Davis GE & Weinstein BM (2006) Endothelial tubes assemble from intracellular vacuoles in vivo. *Nature* **442**: 453–456 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16799567>
- Kelly-Goss MR, Sweat RS, Stapor PC, Peirce SM & Murfee WL (2014) Targeting pericytes for angiogenic therapies. *Microcirculation* **21**: 345–357 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Targeting+pericytes+for+angiogenic+therapies+goss>
- van de Kerkhof PC, Rulo HF, van Pelt JP, van Vlijmen-Willems IM & De Jong EM (1998) Expression of endoglin in the transition between psoriatic uninvolved and involved skin. *Acta Derm Venereol* **78**: 19–21 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9498020>
- Kim JH, Kim JH, Yu YS, Kim DH & Kim K-W (2009) Recruitment of pericytes and astrocytes is closely related to the formation of tight junction in developing retinal vessels. *J. Neurosci. Res.* **87**: 653–659 Available at: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jnr.21884/abstract>
- Kisanuki YY, Hammer RE, Miyazaki J, Williams SC, Richardson J a & Yanagisawa M (2001) Tie2-Cre transgenic mice: a new model for endothelial cell-lineage analysis in vivo. *Dev. Biol.* **230**: 230–242 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11161575>
- Koch S, Tugues S, Li X, Gualandi L & Claesson-Welsh L (2011) Signal transduction by vascular endothelial growth factor receptors. *Biochem J* **437**: 169–183 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21711246>
- Koleva RI, Conley BA, Romero D, Riley KS, Marto JA, Lux A & Vary CP (2006) Endoglin structure and function: Determinants of endoglin phosphorylation by transforming growth factor-beta receptors. *J Biol Chem* **281**: 25110–25123 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16785228>
- Kuiper P, Hawinkels LJ, de Jonge-Muller ES, Biemond I, Lamers CB & Verspaget HW (2011) Angiogenic markers endoglin and vascular endothelial growth factor in gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors. *World J Gastroenterol* **17**: 219–225 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21245995>
- Kumar S, Pan CC, Bloodworth JC, Nixon A, Theuer C, Hoyt DG & Lee NY (2013) Antibody-directed coupling of endoglin and MMP-14 is a key mechanism for endoglin shedding and deregulation of TGF- β signaling. *Oncogene* **33**: 1–10 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24077288>
- van Laake LW, van den Driesche S, Post S, Feijen A, Jansen MA, Driessens MH, Mager JJ, Snijder RJ, Westermann CJ, Doevendans PA, van Echteld CJ, ten Dijke P, Arthur HM, Goumans MJ, Lebrin F & Mummery CL (2006) Endoglin has a crucial role in blood cell-mediated vascular repair.

- Circulation* **114**: 2288–2297 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17088457>
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680–685 Available at: <http://www.nature.com/nature/journal/v227/n5259/abs/227680a0.html>
- Laitinen L (1987) Griffonia simplicifolia lectins bind specifically to endothelial cells and some epithelial cells in mouse tissues. *Histochem. J.* **19**: 225–234 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3597137>
- Lampugnani MG, Orsenigo F, Gagliani MC, Tacchetti C & Dejana E (2006) Vascular endothelial cadherin controls VEGFR-2 internalization and signaling from intracellular compartments. *J Cell Biol* **174**: 593–604 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16893970>
- Larrivee B, Freitas C, Trombe M, Lv X, Delafarge B, Yuan L, Bouvree K, Breant C, Del Toro R, Brechot N, Germain S, Bono F, Dol F, Claes F, Fischer C, Autiero M, Thomas JL, Carmeliet P, Tessier-Lavigne M & Eichmann A (2007) Activation of the UNC5B receptor by Netrin-1 inhibits sprouting angiogenesis. *Genes Dev* **21**: 2433–2447 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17908930>
- Larrivee B, Prahst C, Gordon E, del Toro R, Mathivet T, Duarte A, Simons M & Eichmann A (2012) ALK1 signaling inhibits angiogenesis by cooperating with the Notch pathway. *Dev Cell* **22**: 489–500 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22421041>
- Lastres P, Bellon T, Cabanas C, Sanchez-Madrid F, Acevedo A, Gougos A, Letarte M & Bernabeu C (1992) Regulated expression on human macrophages of endoglin, an Arg-Gly-Asp-containing surface antigen. *Eur J Immunol* **22**: 393–397 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1537377>
- Lastres P, Martin-Perez J, Langa C & Bernabeu C (1994) Phosphorylation of the human-transforming-growth-factor-beta-binding protein endoglin. *Biochem J* **301**: 765–768 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8053900>
- Lawler S, Feng XH, Chen RH, Maruoka EM, Turck CW, Griswold-Prenner I & Derynck R (1997) The type II transforming growth factor-beta receptor autophosphorylates not only on serine and threonine but also on tyrosine residues. *J. Biol. Chem.* **272**: 14850–14859 Available at: <http://www.jbc.org/content/272/23/14850.long>
- Lebrin F, Deckers M, Bertolino P & Ten Dijke P (2005) TGF-beta receptor function in the endothelium. *Cardiovasc Res* **65**: 599–608 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15664386>
- Lebrin F, Goumans MJ, Jonker L, Carvalho RL, Valdimarsdottir G, Thorikay M, Mummery C, Arthur HM & ten Dijke P (2004) Endoglin promotes endothelial cell proliferation and TGF-beta/ALK1 signal transduction. *EMBO J* **23**: 4018–4028 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15385967>
- Lebrin F, Srun S, Raymond K, Martin S, van den Brink S, Freitas C, Breant C, Mathivet T, Larrivee B, Thomas JL, Arthur HM, Westermann CJ, Disch F, Mager JJ, Snijder RJ, Eichmann A & Mummery CL (2010) Thalidomide stimulates vessel maturation and reduces epistaxis in individuals with hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Nat Med* **16**: 420–428 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20364125>
- Lee JW, Bae SH, Jeong JW, Kim SH & Kim KW (2004a) Hypoxia-inducible factor (HIF-1)alpha: its protein stability and biological functions. *Exp Mol Med* **36**: 1–12 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15031665>
- Lee N, Dolores M, Conway A & Cheng C (2004b) Zyxin, axin, and Wiskott-Aldrich syndrome protein are adaptors that link the cadherin/catenin protein complex to the cytoskeleton at adherens junctions in the seminiferous epithelium of the rat testis. *J. Androl.* **25**: 200–215 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14760006>

- Lee NY & Blobel GC (2007) The interaction of endoglin with beta-arrestin2 regulates transforming growth factor-beta-mediated ERK activation and migration in endothelial cells. *J Biol Chem* **282**: 21507–21517 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17540773>
- Lee NY, Golzio C, Gatza CE, Sharma A, Katsanis N & Blobel GC (2012) Endoglin regulates PI3-kinase/Akt trafficking and signaling to alter endothelial capillary stability during angiogenesis. *Mol Biol Cell* **23**: 2412–2423 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22593212>
- Lee S, Chen TT, Barber CL, Jordan MC, Murdock J, Desai S, Ferrara N, Nagy A, Roos KP & Iruela-Arispe ML (2007) Autocrine VEGF signaling is required for vascular homeostasis. *Cell* **130**: 691–703 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17719546>
- Levy AP, Levy NS, Wegner S & Goldberg MA (1995) Transcriptional regulation of the rat vascular endothelial growth factor gene by hypoxia. *J Biol Chem* **270**: 13333–13340 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7768934>
- Li B, Sharpe EE, Maupin AB, Teleron AA, Pyle AL, Carmeliet P & Young PP (2006) VEGF and PlGF promote adult vasculogenesis by enhancing EPC recruitment and vessel formation at the site of tumor neovascularization. *FASEB J* **20**: 1495–1497 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16754748>
- Li C, Hampson IN, Hampson L, Kumar P, Bernabeu C & Kumar S (2000) CD105 antagonizes the inhibitory signaling of transforming growth factor beta1 on human vascular endothelial cells. *FASEB J* **14**: 55–64 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10627280>
- Li C, Issa R, Kumar P, Hampson IN, Lopez-Novoa JM, Bernabeu C & Kumar S (2003) CD105 prevents apoptosis in hypoxic endothelial cells. *J Cell Sci* **116**: 2677–2685 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12746487>
- Li DY, Sorensen LK, Brooke BS, Umess LD, Davis EC, Taylor DG, Boak BB & Wendel DP (1999) Defective angiogenesis in mice lacking endoglin. *Science* **284**: 1534–1537 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10348742>
- Li L, Welsch-Alves J, van der Flier A, Boroujerdi A, Hynes RO & Milner R (2012) An angiogenic role for the alpha5beta1 integrin in promoting endothelial cell proliferation during cerebral hypoxia. *Exp Neurol* **237**: 46–54 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22721769>
- Lieu C, Heymach J, Overman M, Tran H & Kopetz S (2011) Beyond VEGF: Inhibition of the fibroblast growth factor pathway and antiangiogenesis. *Clin. Cancer Res.* **17**: 6130–6139 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Beyond+VEGF%3A+Inhibition+of+the+fibroblast+growth+factor+pathway+and+antiangiogenesis>
- Limbourg A, Korff T, Napp LC, Schaper W, Drexler H & Limbourg FP (2009) Evaluation of postnatal arteriogenesis and angiogenesis in a mouse model of hind-limb ischemia. *Nat Protoc* **4**: 1737–1746 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19893509>
- Liu Y, Cox SR, Morita T & Kourembanas S (1995) Hypoxia regulates vascular endothelial growth factor gene expression in endothelial cells. Identification of a 5' enhancer. *Circ Res* **77**: 638–643 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7641334>
- Liu Y, Jovanovic B, Pins M, Lee C & Bergan RC (2002) Over expression of endoglin in human prostate cancer suppresses cell detachment, migration and invasion. *Oncogene* **21**: 8272–8281 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12447690>
- Liu Y, Tian H, Blobel GC, Theuer CP, Hurwitz HI & Nixon AB (2014a) Effects of the combination of TRC105 and bevacizumab on endothelial cell biology. *Invest New Drugs* **32**: 851–859 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24994097>
- Liu Z, Kobayashi K, van Dinther M, van Heiningen SH, Valdimarsdottir G, van Laar T, Scharpfenecker M, Lowik CW, Goumans MJ, Ten Dijke P & Pardali E (2009) VEGF and inhibitors of TGFbeta type-I receptor kinase synergistically promote blood-vessel formation by inducing alpha5-integrin expression. *J Cell Sci* **122**: 3294–3302 Available at:

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19706683>
- Liu Z, Lebrin F, Maring JA, van den Driesche S, van der Brink S, van Dinther M, Thorikay M, Martin S, Kobayashi K, Hawinkels LJ, van Meeteren LA, Pardali E, Korving J, Letarte M, Arthur HM, Theuer C, Goumans MJ, Mummery C & Ten Dijke P (2014b) ENDOGLIN Is Dispensable for Vasculogenesis, but Required for Vascular Endothelial Growth Factor-Induced Angiogenesis. *PLoS One* **9**: e86273 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24489709>
- Llorca O, Trujillo A, Blanco FJ & Bernabeu C (2007) Structural model of human endoglin, a transmembrane receptor responsible for hereditary hemorrhagic telangiectasia. *J Mol Biol* **365**: 694–705 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17081563>
- Logsdon E a, Finley SD, Popel AS & Mac Gabhann F (2014) A systems biology view of blood vessel growth and remodelling. *J. Cell. Mol. Med.* **18**: 1491–508 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4190897/?tool=pmcentrez>
- López-Casillas F, Payne HM, Andres JL & Massagué J (1994) Betaglycan can act as a dual modulator of TGF-beta access to signaling receptors: mapping of ligand binding and GAG attachment sites. *J. Cell Biol.* **124**: 557–68 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2119924/?tool=pmcentrez>
- Lopez-Holgado N, Alberca M, Sanchez-Guijo FM, Villaron EM, Rivas J V, Lopez-Novoa JM, Brinon JG, Arevalo MA, Oterino E, Santamaria C, San Miguel JF & del Canizo MC (2009) Prospective comparative analysis of the angiogenic capacity of monocytes and CD133+ cells in a murine model of hind limb ischemia. *Cytotherapy* **11**: 1041–1051 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19929468>
- Lopez-Novoa JM & Bernabeu C (2010) The physiological role of endoglin in the cardiovascular system. *Am J Physiol Hear. Circ Physiol* **299**: H959–74 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20656886>
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr L & Randall R (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265–275 Available at: http://www.life.illinois.edu/biochem/355/articles/LowryJBC193_265.pdf
- Lu X, Le Noble F, Yuan L, Jiang Q, De Lafarge B, Sugiyama D, Breant C, Claes F, De Smet F, Thomas JL, Autiero M, Carmeliet P, Tessier-Lavigne M & Eichmann A (2004) The netrin receptor UNC5B mediates guidance events controlling morphogenesis of the vascular system. *Nature* **432**: 179–186 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15510105>
- Luan L, Yang X, Zhou C, Wang K & Qin L (2015) Post-hypoxic and ischemic neuroprotection of BMP-7 in the cerebral cortex and caudate-putamen tissue of rat. *Acta Histochem.* **117**: 148–54 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25577291>
- Ludin A, Itkin T, Gur-Cohen S, Mildner A, Shezen E, Golan K, Kollet O, Kalinkovich A, Porat Z, D'Uva G, Schajnovitz A, Voronov E, Brenner D a, Apte RN, Jung S & Lapidot T (2012) Monocytes-macrophages that express α -smooth muscle actin preserve primitive hematopoietic cells in the bone marrow. *Nat. Immunol.* **13**: 1072–1082 Available at: <http://www.nature.com/nijournal/v13/n11/full/ni.2408.html>
- Lum L, Reid MS & Blobel CP (1998) Intracellular maturation of the mouse metalloprotease disintegrin MDC15. *J. Biol. Chem.* **273**: 26236–26247 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Intracellular+maturati+of+the+mouse+metal+loprotease+disintegrin+MDC15>
- Ma F, Morancho A, Montaner J & Rosell A (2015) Endothelial progenitor cells and revascularization following stroke. *Brain Res* **1623**: 150–159 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25725381>
- Ma J, Wang Q, Fei T, Han JD & Chen YG (2007) MCP-1 mediates TGF-beta-induced angiogenesis by stimulating vascular smooth muscle cell migration. *Blood* **109**: 987–994 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17032917>

- Ma X, Labinaz M, Goldstein J, Miller H, Keon WJ, Letarte M & O'Brien E (2000) Endoglin is overexpressed after arterial injury and is required for transforming growth factor-beta-induced inhibition of smooth muscle cell migration. *Arter. Thromb Vasc Biol* **20**: 2546–2552 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11116051>
- Mahmoud M, Allinson KR, Zhai Z, Oakenfull R, Ghandi P, Adams RH, Fruttiger M & Arthur HM (2010) Pathogenesis of arteriovenous malformations in the absence of endoglin. *Circ. Res.* **106**: 1425–1433 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20224041>
- Mahmoud M, Borthwick GM, Hislop AA & Arthur HM (2009) Endoglin and activin receptor-like-kinase 1 are co-expressed in the distal vessels of the lung: implications for two familial vascular dysplasias, HHT and PAH. *Lab Invest* **89**: 15–25 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19015642>
- Mahmoud M, Upton PD & Arthur HM (2011) Angiogenesis regulation by TGFbeta signalling: clues from an inherited vascular disease. *Biochem Soc Trans* **39**: 1659–1666 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22103504>
- Mancini ML, Terzic A, Conley BA, Oxburgh LH, Nicola T & Vary CP (2009) Endoglin plays distinct roles in vascular smooth muscle cell recruitment and regulation of arteriovenous identity during angiogenesis. *Dev Dyn* **238**: 2479–2493 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19705428>
- Manetti M, Guiducci S, Ibba-Manneschi L & Matucci-Cerinic M (2010) Mechanisms in the loss of capillaries in systemic sclerosis: angiogenesis versus vasculogenesis. *J Cell Mol Med* **14**: 1241–1254 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20132409>
- Marazuela M, Sanchez-Madrid F, Acevedo A, Larranaga E & de Landazuri MO (1995) Expression of vascular adhesion molecules on human endothelia in autoimmune thyroid disorders. *Clin Exp Immunol* **102**: 328–334 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7586686>
- Marcola M & Rodrigues CE (2015) Endothelial progenitor cells in tumor angiogenesis: another brick in the wall. *Stem Cells Int* **2015**: 832649 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26000021>
- Margosio B, Marchetti D, Vergani V, Giavazzi R, Rusnati M, Presta M & Taraboletti G (2003) Thrombospondin 1 as a scavenger for matrix-associated fibroblast growth factor 2. *Blood* **102**: 4399–4406 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12947001>
- Marsden PA, Goligorsky MS & Brenner BM (1991) Endothelial cell biology in relation to current concepts of vessel wall structure and function. *J Am Soc Nephrol* **1**: 931–948 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1883964>
- Martin-Ramirez J, Hofman M, van den Biggelaar M, Hebbel RP & Voorberg J (2012) Establishment of outgrowth endothelial cells from peripheral blood. *Nat Protoc* **7**: 1709–1715 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22918388>
- Massague J (1998) TGF-beta signal transduction. *Annu Rev Biochem* **67**: 753–791 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9759503>
- Medina RJ, O'Neill CL, Sweeney M, Guduric-Fuchs J, Gardiner TA, Simpson DA & Stitt AW (2010) Molecular analysis of endothelial progenitor cell (EPC) subtypes reveals two distinct cell populations with different identities. *BMC Med Genomics* **3**: 18 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20465783>
- van Meeteren LA, Thorikay M, Bergqvist S, Pardali E, Stampino CG, Hu-Lowe D, Goumans MJ & ten Dijke P (2012) Anti-human activin receptor-like kinase 1 (ALK1) antibody attenuates bone morphogenetic protein 9 (BMP9)-induced ALK1 signaling and interferes with endothelial cell sprouting. *J Biol Chem* **287**: 18551–18561 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22493445>
- Meurer SK, Tihaa L, Borkham-Kamphorst E & Weiskirchen R (2011) Expression and functional

- analysis of endoglin in isolated liver cells and its involvement in fibrogenic Smad signalling. *Cell Signal*. **23**: 683–99 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21146604>
- Meurer SK, Tihaa L, Lahme B, Gressner AM & Weiskirchen R (2005) Identification of endoglin in rat hepatic stellate cells: new insights into transforming growth factor beta receptor signaling. *J Biol Chem* **280**: 3078–3087 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15537649>
- Milam KE & Parikh SM (2015) The angiopoietin-Tie2 signaling axis in the vascular leakage of systemic inflammation. *Tissue barriers* **3**: e957508 Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4372013&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Miller DW, Graulich W, Karges B, Stahl S, Ernst M, Ramaswamy A, Sedlacek HH, Muller R & Adamkiewicz J (1999) Elevated expression of endoglin, a component of the TGF-beta-receptor complex, correlates with proliferation of tumor endothelial cells. *Int J Cancer* **81**: 568–572 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10225446>
- Milner R & Campbell IL (2002) Developmental regulation of beta1 integrins during angiogenesis in the central nervous system. *Mol Cell Neurosci* **20**: 616–626 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12213443>
- Miyazawa K, Shinozaki M, Hara T, Furuya T & Miyazono K (2002) Two major Smad pathways in TGF-beta superfamily signalling. *Genes to Cells* **7**: 1191–1204 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Two+major+Smad+pathways+in+TGF-beta+superfamily+signalling+miyazawa>
- Moustakas A & Heldin C-H (2005) Non-Smad TGF-beta signals. *J. Cell Sci.* **118**: 3573–84 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16105881>
- Moya IM, Umans L, Maas E, Pereira PNG, Beets K, Francis A, Sents W, Robertson EJ, Mummery CL, Huylebroeck D & Zwijsen A (2012) Stalk Cell Phenotype Depends on Integration of Notch and Smad1/5 Signaling Cascades. *Dev. Cell* **22**: 501–514
- Muenzner P, Bachmann V, Zimmermann W, Hentschel J & Hauck CR (2010) Human-restricted bacterial pathogens block shedding of epithelial cells by stimulating integrin activation. *Science* **329**: 1197–1201 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20813953>
- Muller WA, Ratti CM, McDonnell SL & Cohn ZA (1989) A human endothelial cell-restricted, externally disposed plasmalemmal protein enriched in intercellular junctions. *J. Exp. Med.* **170**: 399–414 Available at: <http://jem.rupress.org/content/170/2/399.abstract>
- Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G & Erlich H (1986) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: The polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **51**: 263–273 Available at: <http://symposium.cshlp.org/content/51/263.extract>
- Munoz R, Arias Y, Ferreras JM, Jimenez P, Rojo MA, Bernabeu C, Cordoba-Diaz D & Girbes T (2012) Transient injury-dependent up-regulation of CD105 and its specific targeting with an anti-vascular anti-mouse endoglin-nigrin b immunotoxin. *Med Chem* **8**: 996–1002 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22779758>
- Muñoz-Chápuli R (2011) Evolution of angiogenesis. *Int. J. Dev. Biol.* **55**: 345–351 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Evolution+of+angiogenesis+chapuli>
- Nassiri F, Cusimano MD, Scheithauer BW, Rotondo F, Fazio A, Yousef GM, Syro L V, Kovacs K & Lloyd R V (2011) Endoglin (CD105): a review of its role in angiogenesis and tumor diagnosis, progression and therapy. *Anticancer Res* **31**: 2283–2290 Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=21737653
- Nave AH, Mižiková I, Niess G, Steenbock H, Reichenberger F, Talavera ML, Veit F, Herold S, Mayer K, Vadász I, Weissmann N, Seeger W, Brinckmann J & Morty RE (2014) Lysyl oxidases play a causal role in vascular remodeling in clinical and experimental pulmonary arterial

- hypertension. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **34**: 1446–1458 Available at: <http://atvb.ahajournals.org/content/34/7/1446.long>
- Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S & Poltorak Z (1999) Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB J* **13**: 9–22 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9872925>
- Nolan-Stevaux O, Zhong W, Culp S, Shaffer K, Hoover J, Wickramasinghe D & Ruefli-Brasse A (2012) Endoglin requirement for BMP9 signaling in endothelial cells reveals new mechanism of action for selective anti-endoglin antibodies. *PLoS One* **7**: e50920 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23300529>
- Nowak DG, Woolard J, Amin EM, Konopatskaya O, Saleem M a, Churchill AJ, Lodomery MR, Harper SJ & Bates DO (2008) Expression of pro- and anti-angiogenic isoforms of VEGF is differentially regulated by splicing and growth factors. *J. Cell Sci.* **121**: 3487–3495 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Expression+of+pro+and+anti-angiogenic+isoforms+of+VEGF+is+differentially+regulated+by+splicing+and+growth+factors>
- O'Connell PJ, McKenzie A, Fiscaro N, Rockman SP, Pearse MJ & d'Apice AJ (1992) Endoglin: a 180-kD endothelial cell and macrophage restricted differentiation molecule. *Clin Exp Immunol* **90**: 154–159 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1395096>
- Oblander S a, Zhou Z, Gálvez BG, Starcher B, Shannon JM, Durbeej M, Arroyo AG, Tryggvason K & Apte SS (2005) Distinctive functions of membrane type 1 matrix-metalloprotease (MT1-MMP or MMP-14) in lung and submandibular gland development are independent of its role in pro-MMP-2 activation. *Dev. Biol.* **277**: 255–69 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15572153>
- Oh H, Takagi H, Suzuma K, Otani A, Matsumura M & Honda Y (1999) Hypoxia and Vascular Endothelial Growth Factor Selectively Up-regulate Angiopoietin-2 in Bovine Microvascular Endothelial Cells. *J. Biol. Chem.* **274**: 15732–15739 Available at: <http://www.jbc.org/content/274/22/15732.abstract>
- Oh SP, Seki T, Goss KA, Imamura T, Yi Y, Donahoe PK, Li L, Miyazono K, ten Dijke P, Kim S & Li E (2000) Activin receptor-like kinase 1 modulates transforming growth factor-beta 1 signaling in the regulation of angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 2626–2631 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10716993>
- Olivey HE, Mundell NA, Austin AF & Barnett JV (2006) Transforming growth factor-beta stimulates epithelial-mesenchymal transformation in the proepicardium. *Dev. Dyn.* **235**: 50–9 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3160345/?tool=pmcentrez>
- Olson N & van der Vliet A (2011) Interactions between nitric oxide and hypoxia-inducible factor signaling pathways in inflammatory disease. *Nitric Oxide* **25**: 125–137 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21199675>
- Olsson AK, Dimberg A, Kreuger J & Claesson-Welsh L (2006) VEGF receptor signalling - in control of vascular function. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **7**: 359–371 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=VEGF+receptor+signalling+-+in+control+of+vascular+function+olssom>
- Orlova V V, Liu Z, Goumans MJ & ten Dijke P (2011) Controlling angiogenesis by two unique TGF-beta type I receptor signaling pathways. *Histol Histopathol* **26**: 1219–1230 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21751154>
- Oshima M, Oshima H & Taketo MM (1996) TGF-beta receptor type II deficiency results in defects of yolk sac hematopoiesis and vasculogenesis. *Dev Biol* **179**: 297–302 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8873772>
- Oujo B, Munoz-Felix JM, Arevalo M, Nunez-Gomez E, Perez-Roque L, Pericacho M, Gonzalez-Nunez M, Langa C, Martinez-Salgado C, Perez-Barriocanal F, Bernabeu C & Lopez-Novoa JM (2014) L-Endoglin overexpression increases renal fibrosis after unilateral ureteral obstruction. *PLoS One* **9**: e110365 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25313562>

- Paczkowska E, Roginska D, Pius-Sadowska E, Jurewicz A, Piecyk K, Safranow K, Dziedziejko V, Grzegorzolka R, Bohatyrewicz A & Machalinski B (2014) Evidence for proangiogenic cellular and humoral systemic response in patients with acute onset of spinal cord injury. *J Spinal Cord Med* **38**: 729–44 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24968203>
- Pan CC, Kumar S, Shah N, Hoyt DG, Hawinkels LJ, Mythreye K & Lee NY (2014) Src-mediated post-translational regulation of endoglin stability and function is critical for angiogenesis. *J Biol Chem* **289**: 25486–25496 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25070888>
- Papapetropoulos A, Garcia-Cardena G, Madri JA & Sessa WC (1997) Nitric oxide production contributes to the angiogenic properties of vascular endothelial growth factor in human endothelial cells. *J Clin Invest* **100**: 3131–3139 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9399960>
- Pappa CA, Alexandrakis MG, Boula A, Psarakis FE, Kolovou A, Bantouna V, Stavroulaki E & Tsiarakis G (2013) Emerging roles of endoglin/CD105 and angiogenic cytokines for disease development and progression in multiple myeloma patients. *Hematol. Oncol.* **31**: 201–5 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23576184>
- Pardali E, Goumans MJ & ten Dijke P (2010) Signaling by members of the TGF-beta family in vascular morphogenesis and disease. *Trends Cell Biol* **20**: 556–567 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20656490>
- Park JE, Keller GA & Ferrara N (1993) The vascular endothelial growth factor (VEGF) isoforms: differential deposition into the subepithelial extracellular matrix and bioactivity of extracellular matrix-bound VEGF. *Mol Biol Cell* **4**: 1317–1326 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8167412>
- Park S, Dimaio TA, Liu W, Wang S, Sorenson CM & Sheibani N (2013) Endoglin regulates the activation and quiescence of endothelium by participating in canonical and non-canonical TGF-beta signaling pathways. *J Cell Sci* **126**: 1392–1405 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23418351>
- Park S, DiMaio TA, Scheef EA, Sorenson CM & Sheibani N (2010) PECAM-1 regulates proangiogenic properties of endothelial cells through modulation of cell-cell and cell-matrix interactions. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **299**: C1468–84 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3006334/?tool=pmcentrez>
- Park S, Sorenson CM & Sheibani N (2015) PECAM-1 isoforms, eNOS and endoglin axis in regulation of angiogenesis. *Clin. Sci.* **129**: 217–234 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=PECAM-1+isoforms%2C+eNOS+and+endoglin+axis+in+regulation+of+angiogenesis+park>
- Parker WL, Goldring MB & Philip A (2003) Endoglin is expressed on human chondrocytes and forms a heteromeric complex with betaglycan in a ligand and type II TGFbeta receptor independent manner. *J Bone Min. Res* **18**: 289–302 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12568406>
- Passaniti A, Taylor RM, Pili R, Guo Y, Long P V, Haney JA, Pauly RR, Grant DS & Martin GR (1992) A simple, quantitative method for assessing angiogenesis and antiangiogenic agents using reconstituted basement membrane, heparin, and fibroblast growth factor. *Lab. Invest.* **67**: 519–28 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1279270>
- Pece-Barbara N, Vera S, Kathirkamathamby K, Liebner S, Di Guglielmo GM, Dejana E, Wrana JL & Letarte M (2005) Endoglin null endothelial cells proliferate faster and are more responsive to transforming growth factor beta1 with higher affinity receptors and an activated Alk1 pathway. *J Biol Chem* **280**: 27800–27808 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15923183>
- Peichev M, Naiyer AJ, Pereira D, Zhu Z, Lane WJ, Williams M, Oz MC, Hicklin DJ, Witte L, Moore MA & Rafii S (2000) Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34(+) cells identifies a population of functional endothelial precursors. *Blood* **95**: 952–8 Available at:

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10648408>
- Pelosi E, Castelli G, Martin-Padura I, Bordoni V, Santoro S, Conigliaro A, Cerio AM, De Santis Puzzonina M, Marighetti P, Biffoni M, Alonzi T, Amicone L, Alcalay M, Bertolini F, Testa U & Tripodi M (2012) Human haemato-endothelial precursors: cord blood CD34+ cells produce haemogenic endothelium. *PLoS One* **7**: e51109 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23226561>
- Perez-Gomez E, Eleno N, Lopez-Novoa JM, Ramirez JR, Velasco B, Letarte M, Bernabeu C & Quintanilla M (2005) Characterization of murine S-endoglin isoform and its effects on tumor development. *Oncogene* **24**: 4450–4461 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15806144>
- Pericacho M, Velasco S, Prieto M, Llano E, López-Novoa JM & Rodríguez-Barbero A (2013) Endoglin haploinsufficiency promotes fibroblast accumulation during wound healing through Akt activation. *PLoS One* **8**: e54687 Available at: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0054687>
- Persson AB & Buschmann IR (2011) Vascular growth in health and disease. *Front Mol Neurosci* **4**: 14 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21904523>
- Peshavariya HM, Chan EC, Liu GS, Jiang F & Dusting GJ (2014) Transforming growth factor- β 1 requires NADPH oxidase 4 for angiogenesis in vitro and in vivo. *J. Cell. Mol. Med.* **18**: 1172–83 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24629065>
- Phng LK & Gerhardt H (2009) Angiogenesis: a team effort coordinated by notch. *Dev Cell* **16**: 196–208 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19217422?dopt=Citation>
- Potente M, Gerhardt H & Carmeliet P (2011) Basic and therapeutic aspects of angiogenesis. *Cell* **146**: 873–887 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21925313>
- Prea SM, Chan EC, Dusting GJ, Vingrys AJ, Bui B V & Liu GS (2015) Gene Therapy with Endogenous Inhibitors of Angiogenesis for Neovascular Age-Related Macular Degeneration: Beyond Anti-VEGF Therapy. *J Ophthalmol* **2015**: 201726 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25821585>
- Presta M, Dell’Era P, Mitola S, Moroni E, Ronca R & Rusnati M (2005) Fibroblast growth factor/fibroblast growth factor receptor system in angiogenesis. *Cytokine Growth Factor Rev.* **16**: 159–178
- Quintanilla M, Ramirez JR, Perez-Gomez E, Romero D, Velasco B, Letarte M, Lopez-Novoa JM & Bernabeu C (2003) Expression of the TGF-beta coreceptor endoglin in epidermal keratinocytes and its dual role in multistage mouse skin carcinogenesis. *Oncogene* **22**: 5976–5985 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12955076>
- Qureshi ST, Gros P, Letarte M & Malo D (1995) The murine endoglin gene (Eng) maps to chromosome 2. *Genomics* **26**: 165–166 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7782079>
- Ray BN, Lee NY, How T & Blobe GC (2010a) ALK5 phosphorylation of the endoglin cytoplasmic domain regulates Smad1/5/8 signaling and endothelial cell migration. *Carcinogenesis* **31**: 435–441 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20042635>
- Ray BN, Lee NY, How T & Blobe GC (2010b) ALK5 phosphorylation of the endoglin cytoplasmic domain regulates Smad1/5/8 signaling and endothelial cell migration. *Carcinogenesis* **31**: 435–441 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20042635>
- Ribatti D, Nico B & Crivellato E (2011) The role of pericytes in angiogenesis. *Int. J. Dev. Biol.* **55**: 261–268 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21710434>
- Riedel K, Riedel F, Goessler UR, Germann G & Sauerbier M (2007) Tgf-beta antisense therapy increases angiogenic potential in human keratinocytes in vitro. *Arch Med Res* **38**: 45–51 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17174722>

- Rivera LB & Brekken RA (2011) SPARC promotes pericyte recruitment via inhibition of endoglin-dependent TGF-beta1 activity. *J Cell Biol* **193**: 1305–1319 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21708981>
- Rodriguez-Barbero A, Obreo J, Eleno N, Rodriguez-Pena A, Duwel A, Jerkic M, Sanchez-Rodriguez A, Bernabeu C & Lopez-Novoa JM (2001) Endoglin expression in human and rat mesangial cells and its upregulation by TGF-beta1. *Biochem Biophys Res Commun* **282**: 142–147 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11263983>
- Rokhlin OW, Cohen MB, Kubagawa H, Letarte M & Cooper MD (1995) Differential expression of endoglin on fetal and adult hematopoietic cells in human bone marrow. *J Immunol* **154**: 4456–4465 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7722302>
- Ronca R, Giacomini A, Rusnati M & Presta M (2015) The potential of fibroblast growth factor/fibroblast growth factor receptor signaling as a therapeutic target in tumor angiogenesis. *Expert Opin. Ther. Targets* **19**: 1361–77 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26125971>
- Rossi E, Lopez-Novoa JM & Bernabeu C (2014) Endoglin involvement in integrin-mediated cell adhesion as a putative pathogenic mechanism in hereditary hemorrhagic telangiectasia type 1 (HHT1). *Front Genet* **5**: 457 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25709613>
- Rossi E, Sanz-Rodriguez F, Eleno N, Duwell A, Blanco FJ, Langa C, Botella LM, Cabanas C, Lopez-Novoa JM & Bernabeu C (2013a) Endothelial endoglin is involved in inflammation: role in leukocyte adhesion and transmigration. *Blood* **121**: 403–415 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23074273>
- Rossi E, Sanz-Rodriguez F, Eleno N, Duwell A, Blanco FJ, Langa C, Botella LM, Cabanas C, Lopez-Novoa JM & Bernabeu C (2013b) Endothelial endoglin is involved in inflammation: role in leukocyte adhesion and transmigration. *Blood* **121**: 403–415 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23074273>
- Rossi E, Smadja DM, Boscolo E, Langa C, Arevalo MA, Pericacho M, Gamella-Pozuelo L, Kauskot A, Botella LM, Gaussem P, Bischoff J, Lopez-Novoa JM & Bernabeu C (2015) Endoglin regulates mural cell adhesion in the circulatory system. *Cell. Mol. Life Sci.* Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26646071>
- Rudini N, Felici A, Giampietro C, Lampugnani M, Corada M, Swirsding K, Garre M, Liebner S, Letarte M, ten Dijke P & Dejana E (2008) VE-cadherin is a critical endothelial regulator of TGF-beta signalling. *EMBO J* **27**: 993–1004 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18337748>
- Ruoslahti E & Pierschbacher MD (1987) New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins. *Science (80-.)* **238**: 491–497 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2821619>
- Sabbà C, Gallitelli M, Pasculli G, Suppressa P, Resta F & Tafaro GE (2006) HHT: a rare disease with a broad spectrum of clinical aspects. *Curr. Pharm. Des.* **12**: 1217–20 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16611103>
- Sadick H, Riedel F, Naim R, Goessler U, Hormann K, Hafner M & Lux A (2005) Patients with hereditary hemorrhagic telangiectasia have increased plasma levels of vascular endothelial growth factor and transforming growth factor-beta1 as well as high ALK1 tissue expression. *Haematologica* **90**: 818–828 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15951295>
- Sanchez-Elsner T, Botella LM, Velasco B, Langa C & Bernabeu C (2002) Endoglin expression is regulated by transcriptional cooperation between the hypoxia and transforming growth factor-beta pathways. *J Biol Chem* **277**: 43799–43808 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12228247>
- Santibanez JF, Blanco FJ, Garrido-Martin EM, Sanz-Rodriguez F, del Pozo MA & Bernabeu C (2008) Caveolin-1 interacts and cooperates with the transforming growth factor-beta type I receptor ALK1 in endothelial caveolae. *Cardiovasc Res* **77**: 791–799 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18065769>

- Santibanez JF, Letamendia A, Perez-Barriocanal F, Silvestri C, Saura M, Vary CP, Lopez-Novoa JM, Attisano L & Bernabeu C (2007) Endoglin increases eNOS expression by modulating Smad2 protein levels and Smad2-dependent TGF-beta signaling. *J Cell Physiol* **210**: 456–468 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17058229>
- Sanz-Rodriguez F, Guerrero-Esteo M, Botella LM, Banville D, Vary CP & Bernabeu C (2004) Endoglin regulates cytoskeletal organization through binding to ZRP-1, a member of the Lim family of proteins. *J Biol Chem* **279**: 32858–32868 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15148318>
- Saunier EF & Akhurst RJ (2006) TGF beta inhibition for cancer therapy. *Curr. Cancer Drug Targets* **6**: 565–78 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17100564>
- Saylor PJ, Escudier B & Michaelson MD (2012) Importance of fibroblast growth factor receptor in neovascularization and tumor escape from antiangiogenic therapy. *Clin Genitourin Cancer* **10**: 77–83 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22382009>
- Scharpfenecker M, van Dinther M, Liu Z, van Bezooijen RL, Zhao Q, Pukac L, Lowik CW & ten Dijke P (2007) BMP-9 signals via ALK1 and inhibits bFGF-induced endothelial cell proliferation and VEGF-stimulated angiogenesis. *J Cell Sci* **120**: 964–972 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17311849>
- Seghers L, de Vries MR, Pardali E, Hoefler IE, Hierck BP, ten Dijke P, Goumans MJ & Quax PH (2012) Shear induced collateral artery growth modulated by endoglin but not by ALK1. *J Cell Mol Med* **16**: 2440–2450 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22436015>
- Sheibani N, Sorenson CM & Frazier W a. (1999) Tissue specific expression of alternatively spliced murine PECAM-1 isoforms. *Dev. Dyn.* **214**: 44–54 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9915575>
- Sheibani N, Sorenson CM & Frazier WA (2000) Differential modulation of cadherin-mediated cell-cell adhesion by platelet endothelial cell adhesion molecule-1 isoforms through activation of extracellular regulated kinases. *Mol. Biol. Cell* **11**: 2793–2802 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10930470>
- Shi Y & Massague J (2003) Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell* **113**: 685–700 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12809600>
- Shibuya M & Claesson-Welsh L (2006) Signal transduction by VEGF receptors in regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Exp Cell Res* **312**: 549–560 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16336962>
- Sidney LE LE, Branch MJM, Dunphy SSE, Dua HS & Hopkinson A (2014) Concise review: Evidence for CD34 as a common marker for diverse progenitors. *Stem Cells* **32**: 1380–1389 Available at: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/stem.1661/full> <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24497003>
- Siekman AF, Affolter M & Belting H-G (2013) The tip cell concept 10 years after: new players tune in for a common theme. *Exp. Cell Res.* **319**: 1255–63 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23419245>
- Siekman AF & Lawson ND (2007) Notch signalling limits angiogenic cell behaviour in developing zebrafish arteries. *Nature* **445**: 781–784 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17259972>
- Siemerink MJ, Klaassen I, Vogels IMC, Griffioen AW, Van Noorden CJF & Schlingemann RO (2012) CD34 marks angiogenic tip cells in human vascular endothelial cell cultures. *Angiogenesis* **15**: 151–163 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=CD34+marks+angiogenic+tip+cells+in+human+vascular+endothelial+cell+cultures>
- Silva R, D'Amico G, Hodivala-Dilke KM & Reynolds LE (2008) Integrins: the keys to unlocking

- angiogenesis. *Arter. Thromb Vasc Biol* **28**: 1703–1713 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18658045>
- Silvestre JS, Mallat Z, Tedgui A & Levy BI (2008) Post-ischæmic neovascularization and inflammation. *Cardiovasc Res* **78**: 242–249 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18252762>
- De Smet F, Tembuyser B, Lenard A, Claes F, Zhang J, Michielsen C, Van Schepdael A, Herbert J-M, Bono F, Affolter M, Dewerchin M & Carmeliet P (2014) Fibroblast growth factor signaling affects vascular outgrowth and is required for the maintenance of blood vessel integrity. *Chem. Biol.* **21**: 1310–7 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25200605>
- Song JW, Bazou D & Munn LL (2012) Anastomosis of endothelial sprouts forms new vessels in a tissue analogue of angiogenesis. *Integr. Biol. (Camb)*. **4**: 857–62 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3759296/?tool=pmcentrez>
- Sorensen LK, Brooke BS, Li DY & Urness LD (2003) Loss of distinct arterial and venous boundaries in mice lacking endoglin, a vascular-specific TGFbeta coreceptor. *Dev Biol* **261**: 235–250 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12941632>
- Srinivasan S, Hanes M a., Dickens T, Porteous MEM, Oh SP, Hale LP & Marchuk D a. (2003) A mouse model for hereditary hemorrhagic telangiectasia (HHT) type 2. *Hum. Mol. Genet.* **12**: 473–482 Available at: <http://hmg.oxfordjournals.org/content/12/5/473.long>
- St-Jacques S, Cymerman U, Pece N & Letarte M (1994a) Molecular characterization and in situ localization of murine endoglin reveal that it is a transforming growth factor-beta binding protein of endothelial and stromal cells. *Endocrinology* **134**: 2645–2657 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8194490>
- St-Jacques S, Forte M, Lye SJ & Letarte M (1994b) Localization of endoglin, a transforming growth factor-beta binding protein, and of CD44 and integrins in placenta during the first trimester of pregnancy. *Biol Reprod* **51**: 405–413 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7528549>
- Stahl A, Connor KM, Sapieha P, Chen J, Dennison RJ, Krahn NM, Seaward MR, Willett KL, Aderman CM, Guerin KI, Hua J, Lofqvist C, Hellstrom A & Smith LE (2010) The mouse retina as an angiogenesis model. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **51**: 2813–2826 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20484600>
- Suzuki Y, Ohga N, Morishita Y, Hida K, Miyazono K & Watabe T (2010) BMP-9 induces proliferation of multiple types of endothelial cells in vitro and in vivo. *J Cell Sci* **123**: 1684–1692 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20406889>
- Temin HM & Mizutani S (1970) RNA-dependent DNA polymerase in virions of Rous sarcoma virus. *Nature* **226**: 1211–1213 Available at: <http://www.nature.com/nature/journal/v226/n5252/abs/2261211a0.html>
- Tian H, Mythreye K, Golzio C, Katsanis N & Blobel GC (2012) Endoglin mediates fibronectin/alpha5beta1 integrin and TGF-beta pathway crosstalk in endothelial cells. *EMBO J* **31**: 3885–3900 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22940691>
- Toporsian M, Gros R, Kabir MG, Vera S, Govindaraju K, Eidelman DH, Husain M & Letarte M (2005) A role for endoglin in coupling eNOS activity and regulating vascular tone revealed in hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Circ Res* **96**: 684–692 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15718503>
- Tomavaca O, Chia M, Duffon N, Almagro LO, Conway DE, Randi AM, Schwartz M a, Matter K & Balda MS (2015) ZO-1 controls endothelial adherens junctions, cell-cell tension, angiogenesis, and barrier formation. *J. Cell Biol.* **208**: 821–38 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25753039>
- Tremolada G, Del Turco C, Lattanzio R, Maestroni S, Maestroni A, Bandello F & Zerbini G (2012) The role of angiogenesis in the development of proliferative diabetic retinopathy: impact of

- intravitreal anti-VEGF treatment. *Exp Diabetes Res* **2012**: 728325 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22566995>
- Tseng WP, Yang SN, Lai CH & Tang CH (2010) Hypoxia induces BMP-2 expression via ILK, Akt, mTOR, and HIF-1 pathways in osteoblasts. *J Cell Physiol* **223**: 810–818 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Hypoxia+induces+BMP-2+expression+via+ILK%2C+Akt%2C+mTOR%2C+and+HIF-1+pathways+in+osteoblasts+tseng>
- Tual-Chalot S, Allinson KR, Fruttiger M & Arthur HM (2013) Whole mount immunofluorescent staining of the neonatal mouse retina to investigate angiogenesis in vivo. *J. Vis. Exp.*: e50546 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23892721>
- Tual-Chalot S, Mahmoud M, Allinson KR, Redgrave RE, Zhai Z, Oh SP, Fruttiger M & Arthur HM (2014) Endothelial depletion of *Acvrl1* in mice leads to arteriovenous malformations associated with reduced endoglin expression. *PLoS One* **9**: e98646 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24896812>
- Turner N & Grose R (2010) Fibroblast growth factor signalling: from development to cancer. *Nat Rev Cancer* **10**: 116–129 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20094046>
- Ulyatt C, Walker J & Ponnambalam S (2011) Hypoxia differentially regulates VEGFR1 and VEGFR2 levels and alters intracellular signaling and cell migration in endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* **404**: 774–779 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21168388>
- Upton PD, Davies RJ, Trembath RC & Morrell NW (2009) Bone morphogenetic protein (BMP) and activin type II receptors balance BMP9 signals mediated by activin receptor-like kinase-1 in human pulmonary artery endothelial cells. *J. Biol. Chem.* **284**: 15794–804 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2708876/?tool=pmcentrez>
- Valluru M, Staton CA, Reed MW & Brown NJ (2011) Transforming Growth Factor-beta and Endoglin Signaling Orchestrate Wound Healing. *Front Physiol* **2**: 89 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22164144>
- Vane JR, Anggard EE & Botting RM (1990) Regulatory functions of the vascular endothelium. *N Engl J Med* **323**: 27–36 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2113184>
- Velasco S, Alvarez-Munoz P, Pericacho M, Dijke PT, Bernabeu C, Lopez-Novoa JM & Rodriguez-Barbero A (2008) L- and S-endoglin differentially modulate TGFbeta1 signaling mediated by ALK1 and ALK5 in L6E9 myoblasts. *J Cell Sci* **121**: 913–919 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18303046>
- Venkatesha S, Toporsian M, Lam C, Hanai J, Mammoto T, Kim YM, Bdolah Y, Lim KH, Yuan HT, Libermann TA, Stillman IE, Roberts D, D'Amore PA, Epstein FH, Sellke FW, Romero R, Sukhatme VP, Letarte M & Karumanchi SA (2006) Soluble endoglin contributes to the pathogenesis of preeclampsia. *Nat Med* **12**: 642–649 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16751767>
- Walshe TE, Saint-Geniez M, Maharaj AS, Sekiyama E, Maldonado AE & D'Amore PA (2009) TGF-beta is required for vascular barrier function, endothelial survival and homeostasis of the adult microvasculature. *PLoS One* **4**: e5149 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19340291>
- Wang SN & Hirschberg R (2000) Growth factor ultrafiltration in experimental diabetic nephropathy contributes to interstitial fibrosis. *Am J Physiol Ren. Physiol* **278**: F554–60 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10751215>
- Wang X, Abraham S, McKenzie JA, Jeffs N, Swire M, Tripathi VB, Luhmann UF, Lange CA, Zhai Z, Arthur HM, Bainbridge JW, Moss SE & Greenwood J (2013) LRG1 promotes angiogenesis by modulating endothelial TGF-beta signalling. *Nature* **499**: 306–311 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23868260>

- Weis SM & Cheresh DA (2005) Pathophysiological consequences of VEGF-induced vascular permeability. *Nature* **437**: 497–504 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16177780>
- Weis SM & Cheresh DA (2011) Tumor angiogenesis: molecular pathways and therapeutic targets. *Nat Med* **17**: 1359–1370 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22064426>
- Westphal JR, Willems HW, Schalkwijk CJ, Ruiter DJ & de Waal RM (1993) A new 180-kDa dermal endothelial cell activation antigen: in vitro and in situ characteristics. *J Invest Dermatol* **100**: 27–34 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8423388>
- Willam C, Koehne P, Jurgensen JS, Grafe M, Wagner KD, Bachmann S, Frei U & Eckardt K-U (2000) Tie2 Receptor Expression Is Stimulated by Hypoxia and Proinflammatory Cytokines in Human Endothelial Cells. *Circ. Res.* **87**: 370–377 Available at: <http://circres.ahajournals.org/content/87/5/370.full>
- Wong AL, Haroon ZA, Werner S, Dewhirst MW, Greenberg CS & Peters KG (1997) Tie2 Expression and Phosphorylation in Angiogenic and Quiescent Adult Tissues. *Circ. Res.* **81**: 567–574 Available at: <http://circres.ahajournals.org/content/81/4/567.abstract>
- Wong SP, Rowley JE, Redpath AN, Tilman JD, Fellous TG & Johnson JR (2015) Pericytes, mesenchymal stem cells and their contributions to tissue repair. *Pharmacol. Ther.* **151**: 107–120 Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0163725815000753>
- Woo TH, Patel BK, Cinco M, Smythe LD, Symonds ML, Norris M a & Dohnt MF (1998) Real-time homogeneous assay of rapid cycle polymerase chain reaction product for identification of *Leptonema illini*. *Anal. Biochem.* **259**: 112–7 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9606151>
- Wragg JW, Durant S, McGettrick HM, Sample KM, Egginton S & Bicknell R (2014) Shear stress regulated gene expression and angiogenesis in vascular endothelium. *Microcirculation* **21**: 290–300 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24471792>
- Wu J & Sheibani N (2003) Modulation of VE-cadherin and PECAM-1 mediated cell-cell adhesions by mitogen-activated protein kinases. *J. Cell. Biochem.* **90**: 121–37 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12938162>
- Yamaguchi J, Kusano KF, Masuo O, Kawamoto A, Silver M, Murasawa S, Bosch-Marce M, Masuda H, Losordo DW, Isner JM & Asahara T (2003) Stromal cell-derived factor-1 effects on ex vivo expanded endothelial progenitor cell recruitment for ischemic neovascularization. *Circulation* **107**: 1322–1328 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12628955>
- Yamakawa M, Liu LX, Date T, Belanger AJ, Vincent KA, Akita GY, Kuriyama T, Cheng SH, Gregory RJ & Jiang C (2003) Hypoxia-inducible factor-1 mediates activation of cultured vascular endothelial cells by inducing multiple angiogenic factors. *Circ Res* **93**: 664–673 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12958144>
- Yamashita H, Ichijo H, Grimsby S, Moren A, ten Dijke P & Miyazono K (1994) Endoglin forms a heteromeric complex with the signaling receptors for transforming growth factor-beta. *J Biol Chem* **269**: 1995–2001 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8294451>
- Yang X, Liaw L, Prudovsky I, Brooks PC, Vary C, Oxburgh L & Friesel R (2015) Fibroblast growth factor signaling in the vasculature. *Curr. Atheroscler. Rep.* **17**: 509 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25813213>
- Yoon CH, Hur J, Park KW, Kim JH, Lee CS, Oh IY, Kim TY, Cho HJ, Kang HJ, Chae IH, Yang HK, Oh BH, Park YB & Kim HS (2005) Synergistic neovascularization by mixed transplantation of early endothelial progenitor cells and late outgrowth endothelial cells: the role of angiogenic cytokines and matrix metalloproteinases. *Circulation* **112**: 1618–1627 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16145003>
- Young K, Conley B, Romero D, Tweedie E, O'Neill C, Pinz I, Brogan L, Lindner V, Liaw L & Vary CPH (2012) BMP9 regulates endoglin-dependent chemokine responses in endothelial cells. *Blood*

- 120: 4263–73 Available at:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3501721/?tool=pmcentrez>
- Zengin E, Chalajour F, Gehling UM, Ito WD, Treede H, Lauke H, Weil J, Reichenspurner H, Kilic N & Ergun S (2006) Vascular wall resident progenitor cells: a source for postnatal vasculogenesis. *Development* **133**: 1543–1551 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16524930>
- Zhang H, Shaw AR, Mak A & Letarte M (1996) Endoglin is a component of the transforming growth factor (TGF)-beta receptor complex of human pre-B leukemic cells. *J Immunol* **156**: 564–573 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8543807>
- Zhang L & Xu Q (2014) Stem/Progenitor cells in vascular regeneration. *Arter. Thromb Vasc Biol* **34**: 1114–1119 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24828515>
- Zhang YE (2009) Non-Smad pathways in TGF-beta signaling. *Cell Res* **19**: 128–139 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19114990>
- Zhu Y, Sun Y, Xie L, Jin K, Sheibani N & Greenberg DA (2003) Hypoxic induction of endoglin via mitogen-activated protein kinases in mouse brain microvascular endothelial cells. *Stroke* **34**: 2483–2488 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12947156>
- Zucco L, Zhang Q, Kuliszewski MA, Kandic I, Faughnan ME, Stewart DJ & Kutryk MJ (2014) Circulating angiogenic cell dysfunction in patients with hereditary hemorrhagic telangiectasia. *PLoS One* **9**: e89927 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24587130>

Summary

*“ You’re wondering now, what to do,
now you know this is the end. ”*

Amy Winehouse

Angiogenesis is the formation *de novo* of blood vessels from preexisting ones in response to several stimuli, mainly hypoxia. During this process, preexisting endothelial cells (ECs) perform highly orchestrated morphogenic events that include basement membrane degradation, EC sprouting and branching, vessel lumen formation, vessels anastomosis and maturation, and mural cells recruitment, resulting in a new vascular network that provides blood to the hypoxic tissue.

Endoglin is an auxiliary or type III receptor for several members of the TGF- β superfamily of cytokines. It is a dimeric transmembrane glycoprotein without any kinase activity. Although endoglin has no signaling capability *per se*, it is able to modulate TGF- β s and BMPs signaling through the receptor complex [1]. Deficiency in endoglin expression is responsible for a disease called Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia Type-1, characterized by vascular malformations [2].

There are two membrane-bound endoglin isoforms, L-endoglin and S-endoglin. The major and most studied isoform is L-endoglin. Both isoforms have the same extracellular domain but S-endoglin lacks most of the intracellular domain where types I and II TGF- β receptors phosphorylation sites are located, as well as anchoring places for cytoskeleton and other scaffolding proteins.

Endoglin role in angiogenesis has been addressed several times in bibliography. Most studies demonstrate endoglin overexpression in the endothelium during active angiogenesis [3, 4] and the negative effect that defective or lack of endoglin expression have on appropriate blood vessel formation [2, 5]. Moreover, endoglin expression increase in the angiogenic edge, where vessel sprouting takes place to trigger angiogenesis [1, 6]. Despite these evidences, the precise endoglin role within the active endothelial cell (EC) undergoing angiogenesis is mainly unknown. Thus, our aim in this work was to study the effect of increased endoglin levels in angiogenesis, and the implications of its intracellular domain.

For this purpose, we generated two transgenic mice overexpressing either L-endoglin or S-endoglin (*L-ENG^t* or *S-ENG^t*), main and minority endoglin isoforms respectively, in a C57BL/6J background. We used wild type (*WT*) C57BL/6J mice as controls. Moreover, we generated primary cultures of ECs (MLECs, Mouse Lung ECs) isolated from these mice, and human ECs lines overexpressing either L- or S-endoglin by specific infection. Therefore, S-endoglin overexpression allowed us to study if the cytosolic domain is necessary for a particular endoglin-mediated effect. We overexpressed human endoglin isoforms to be able to distinguish endogenous protein from the exogenous one.

We first evaluated lower limb reperfusion after femoral ischemia, induced by femoral artery ligation [7]. Whereas *S-ENG⁺* animals showed a markedly impaired limb reperfusion compared with *WT* mice, *L-ENG⁺* mice did not show any significant difference in reperfusion with *WT* animals (Fig. 1). The response observed in *S-ENG⁺* animals is similar to that reported for *Eng^{+/+}* mice [5].

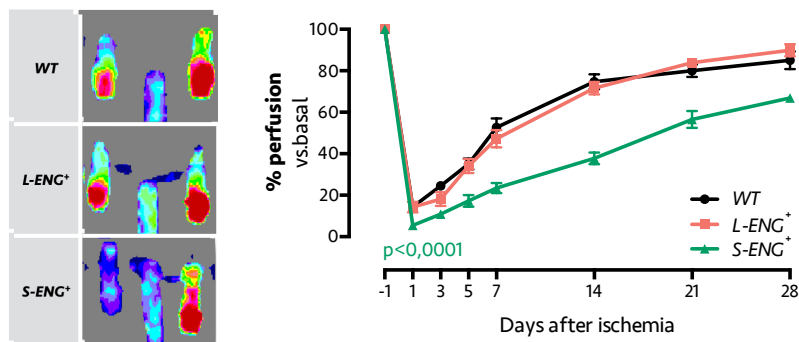


Fig.1. Post-ischemic reperfusion.

Evaluation of reperfusion after hindlimb ischemia in *WT*, *L-ENG⁺* and *S-ENG⁺* mice.

Evaluation of angiogenesis in the retina of p6 days old pups, showed an increased endogen endoglin expression in the angiogenic edge, where sprouting takes place [8]. *L-ENG⁺* retinas showed lower vascular plexus progression, together with higher vessel density than *WT* retinas due to an increased ramification. On the contrary, in *S-ENG⁺* retinas longer vessel formation was observed in comparison with *WT* retinas, but no differences in vascular plexus progression were assessed. qPCR analysis showed increased *Tek* expression in *L-ENG⁺* retinas, suggesting a reduction of endothelium stabilization [9]. S-endoglin overexpression leads to a reduced expression of EC markers within the tissue (*Eng*, *Pecam1* and *Cdh5*), suggesting lower EC content (Fig 2).

These results suggest a role of elevated endoglin levels in triggering sprouting and destabilization of the endothelium. A maintained L-endoglin overexpression would lead to an oversprouting due to lack of stabilization of the backward vessel. S-endoglin overexpression, on the contrary, does not induce this destabilization but larger vessel production, together with a reduced EC number.

DIVAA (Direct *In Vivo* Angiogenesis Assay) assay consist in subcutaneous implantation in the mice of silicon tubes filled with Matrigel® plus proangiogenic factors. These tubes are invaded by vessels from the mice due to an angiogenic response [10]. Evaluation of angiogenesis

in vivo in the DIVAA revealed increased invasion of “blood-filled vessels” in tubes implanted in *L-ENG⁺* mice. No differences were observed in *S-ENG⁺* mice when compared with *WT* animals. L- and S-endoglin overexpression lead to a reduced ECs content within the tubes after 9 days of implantation (Fig. 3). qPCR analysis of specific EC markers expression showed no significant differences between the three mice lines studied.

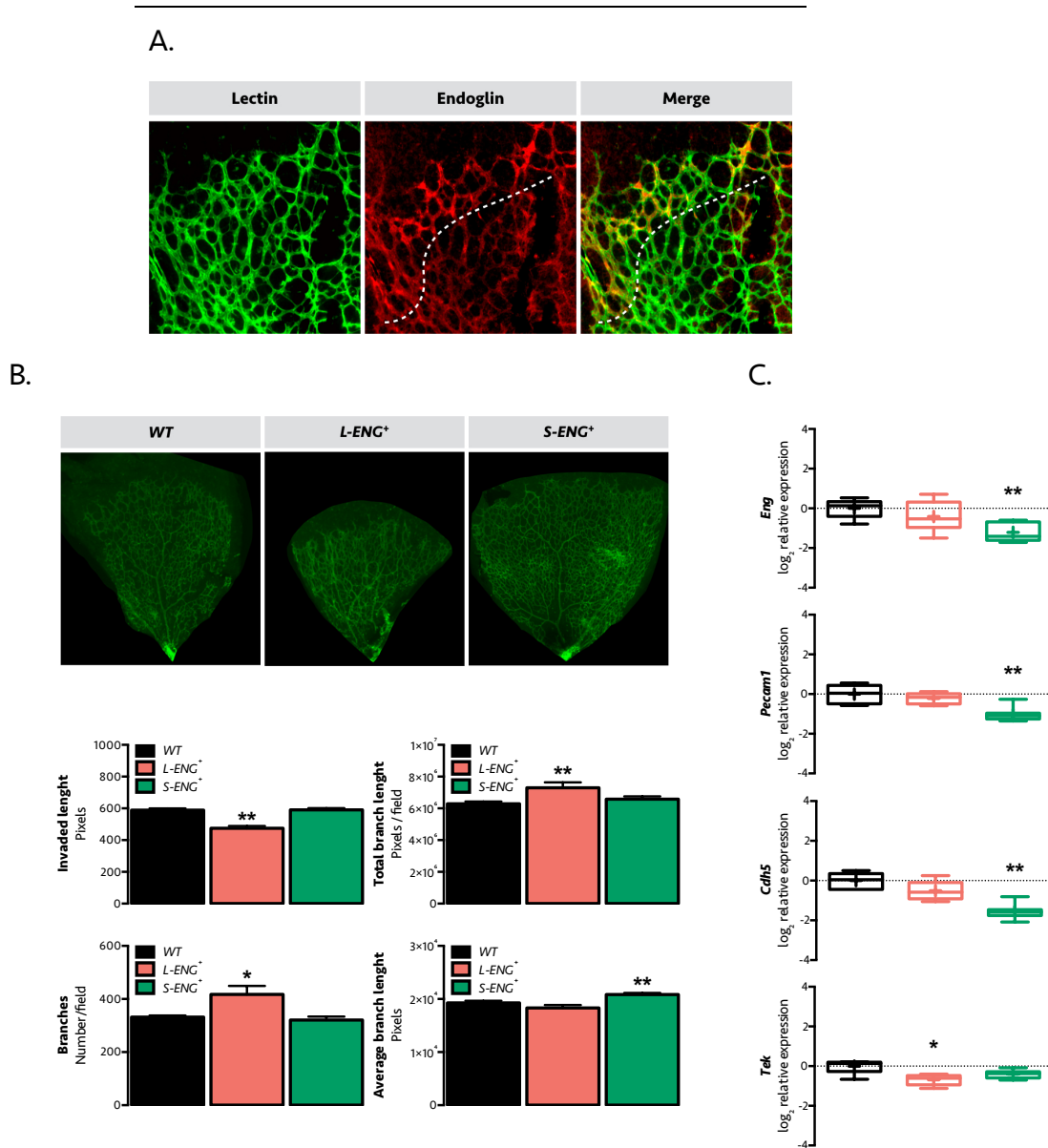
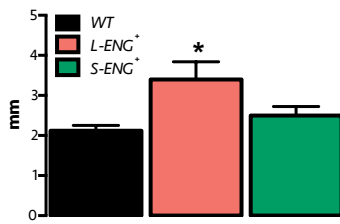


Fig.2. Retina vascularization.

Analysis, in the angiogenic retina, of mouse endoglin expression (A), vessel structure (B) and ECs marker expression (C), in *WT*, *L-ENG⁺* and *S-ENG⁺* mice.

A.



B.

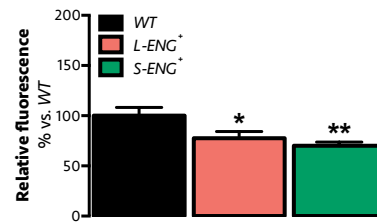


Fig.3. Angiogenesis in DIVAA.

Measurement of the invasion of blood in the Matrigel[®] tube (A) and the amount of ECs that invaded the tubes, labeled with FITC-lectin (B), in WT, L-ENG⁺ and S-ENG⁺ mice.

This result suggests a decreased angiogenesis in L-ENG⁺ and S-ENG⁺ mice. Increased invasion of “blood-filled vessels” in tubes implanted in L-ENG⁺ mice can be due to lack of stabilization of vessels within the tube, leading to the formation of leaky vessels and the extravasation of blood, interfering with our measurement.

We studied sprouting regulation in these *in vivo* models analyzing the expression of specific markers of sprouting cells by qPCR [11,12]. Relativization of *Kdr* and *Notch1* expression by the expression of ECs markers (either *Eng / Pecam1* or *Cdh5*) revealed no differences in the expression of *Notch1*, while *Kdr* was different in S-ENG⁺ retinas when compared with WT, if relativized by *Cdh5*. No differences between the mice lines were found in the Matrigel[®] plug assay in the analysis by qPCR of the expression of *Kdr*, *Notch1*, *Dll4* and *Jag1* (Fig. 4).

We further studied sprouting using an *ex vivo* model of aortic rings cultured in Matrigel[®] [13]. We did not find any difference between aortic rings isolated from L-ENG⁺ and S-ENG⁺ mice, when compared with WT mice, as revealed by sprout volume quantification at day 5 of the assay (Fig. 5). qPCR analysis of EC and sprouting markers at day 5 showed no differences between rings from the different mice lines studied.

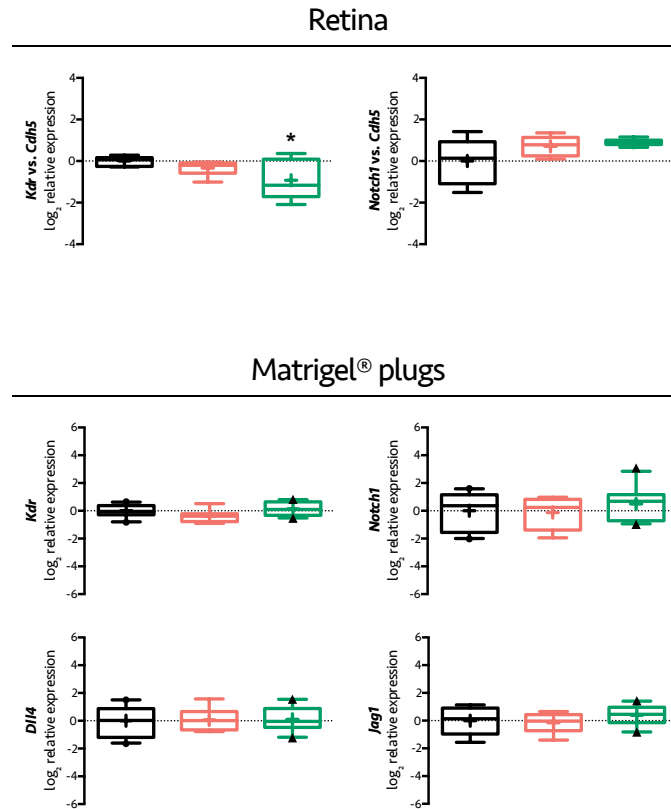


Fig.4. Sprouting markers expression *in vivo*.

qPCR analysis of sprouting markers expression in retinas and Matrigel® plugs of *WT* (□), *L-ENG*⁺ (□) and *S-ENG*⁺ (□) mice.

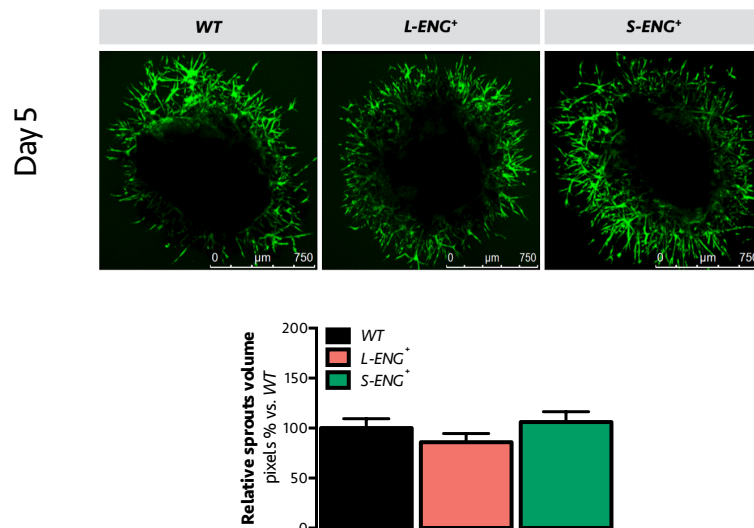


Fig.5. Sprouting in aortic rings in Matrigel®.

Quantification of the volume occupied by sprouts at day 5 of the assay, in aortic rings isolated from *WT*, *L-ENG*⁺ and *S-ENG*⁺ mice.

EC proliferation and migration towards the angiogenic stimuli are key and highly regulated processes during sprouting angiogenesis [12].

The study of proliferation in ECs overexpressing L- or S-endoglin showed a significant reduction of proliferation of *L-ENG*⁺ human ECs compared with *Mock* cells, and the same tendency on MLECs from *L-ENG*⁺ mice, compared with *WT* cells. Non statistically significant differences in proliferation were found for *S-ENG*⁺ ECs, when compared with controls (Fig. 6).

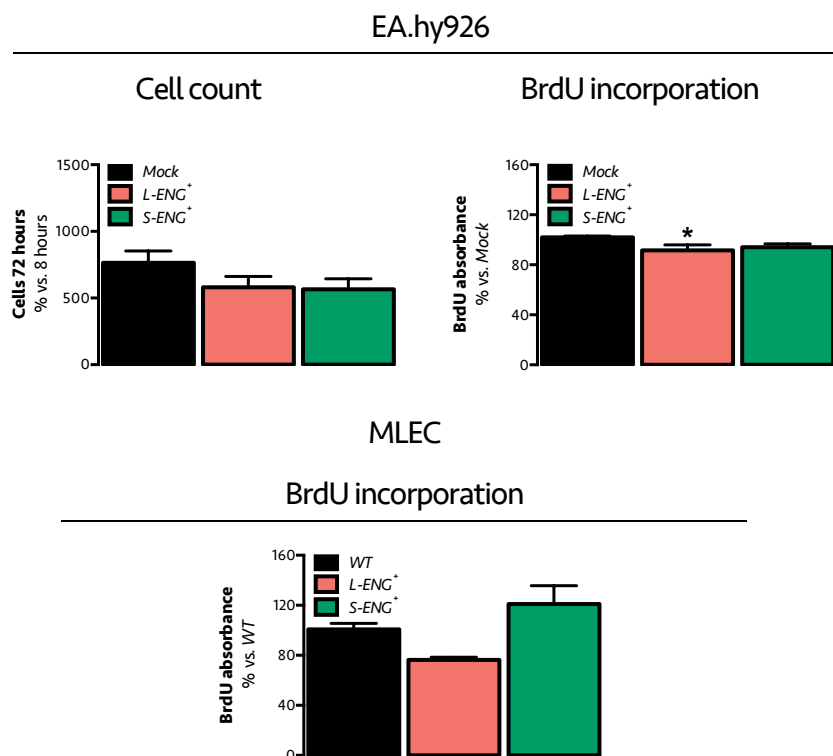


Fig.6. Endothelial cell proliferation.

Measurement of BrdU incorporation in both EA.hy926 ECs and MLECs, and count of cell number after 72 hours growing in culture, in EA.hy926 ECs.

Cell motility after endoglin overexpression was analyzed by the scratch assay in EA.hy926 ECs monolayer in culture. Moreover, we analyzed ECs invasiveness of the extracellular matrix towards the angiogenic stimuli using either uncoated or Matrigel® coated transwells. Results showed that overexpression of either L- or S-endoglin in human ECs increased their motility in culture, suggesting a role of endoglin extracellular domain in ECs migration. *L-ENG*⁺ MLECs show an increased migration towards VEGF, either in the presence or absence of a Matrigel® layer. No statistically differences in migration were found between *S-ENG*⁺ and *WT* MLECs. In the case of EA.hy926 ECs, in absence of Matrigel® coat, both *L-ENG*⁺ and *S-ENG*⁺ ECs

demonstrated an increased migration, in this case towards VEGF. However, when they had to migrate across Matrigel®, *L-ENG*⁺ cells migrated faster, while *S-ENG*⁺ presented reduced migration than *Mock* cells (Fig. 7).

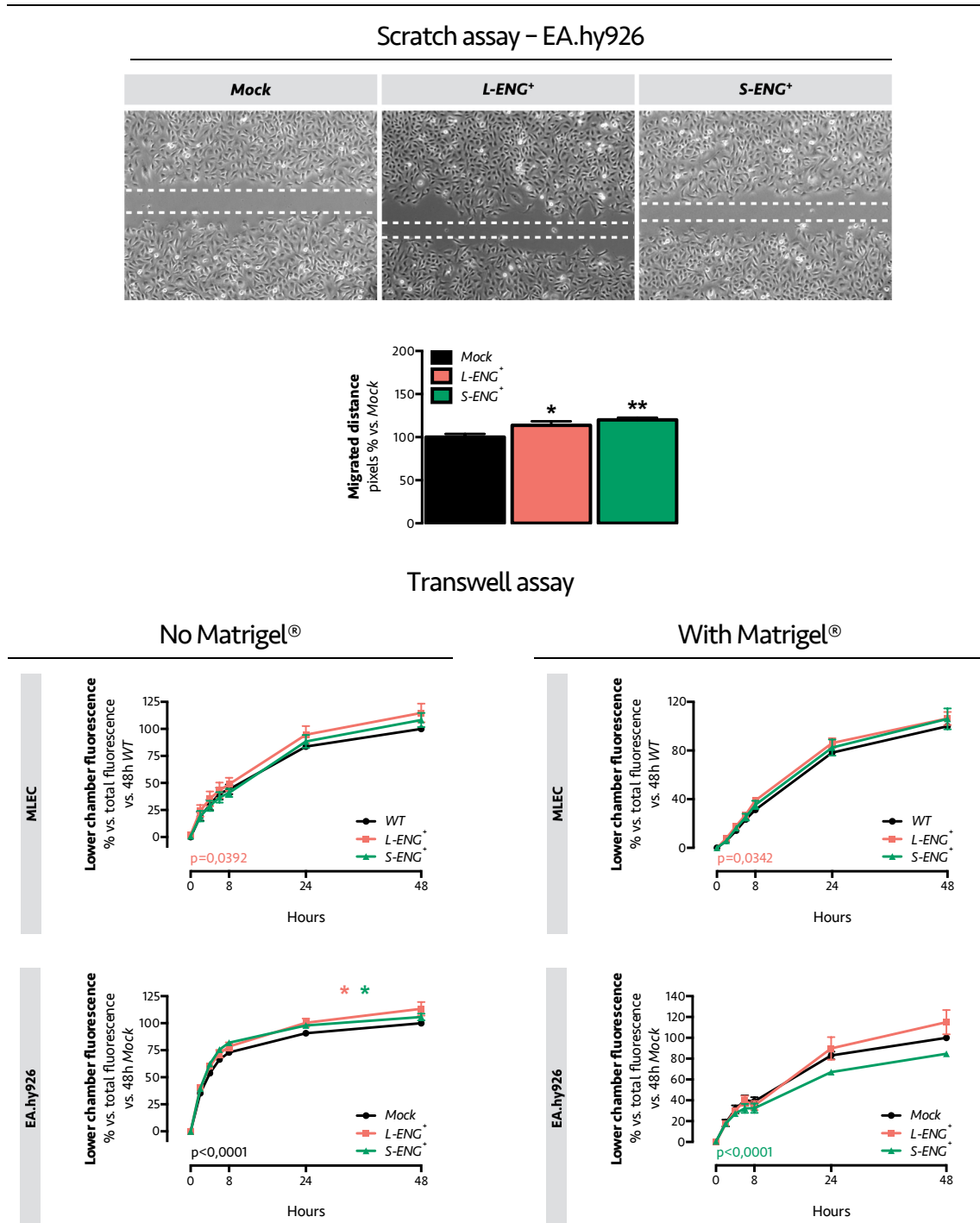


Fig.7. Endothelial cells motility and migration.

Measurement of motility of EA.hy926 ECs in culture in the wound healing assay. Analysis of ECs migration towards VEGF, through transwell either without or with Matrigel®.

We analyzed the formation of “capillary-like” structures in EA.hy926 ECs plated on Matrigel®, that allow us know the ability of this cells to organize. Overexpression of L-endoglin was associated to a reduced ramification together with larger branches when compared with *Mock* cells, in agreement with the increased invasiveness of these cells through the extracellular matrix and its reduced division rate. No differences were found for *S-ENG*⁺ cells, when compared with *Mock* cells.

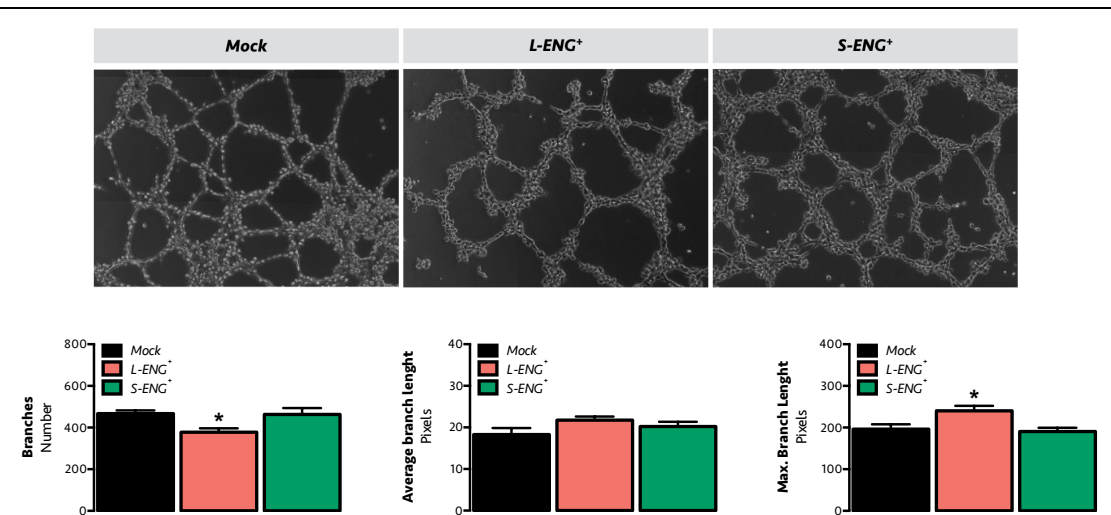


Fig.8. ECs formation of “capillary-like” structures.

Quantification of number of branches and its average length in “capillary-like” structures arranged by ECs cultured in Matrigel®.

Finally, endoglin has been reported to be key for vessel maturation [14, 15]. In a recent work, it has been shown that RGD sequence in endoglin extracellular domain mediates pericyte binding to the ECs [16].

Here, we analyzed the expression of mural cells markers by qPCR both in the pups’ retina and the Matrigel® plugs. We found no significant differences between mice lines in the expression of *Pdgfrb* when expressed relativized by ECs markers, suggesting no differences in the mural / endothelial cell ratio. There were no differences between mice lines on this ratio when analyzing *Pdgfrb* and *Acta2* expression in Matrigel® plugs, whereas there was an increase of the ratio *Cspg4* / *Tek* in *S-ENG*⁺ plugs, compared with *WT* (Fig. 9). As *Cspg4* is a better and more specific marker for pericytes, we can suggest that there may be an increased mural coverage of vessels in *S-ENG*⁺ than in *WT* plugs.

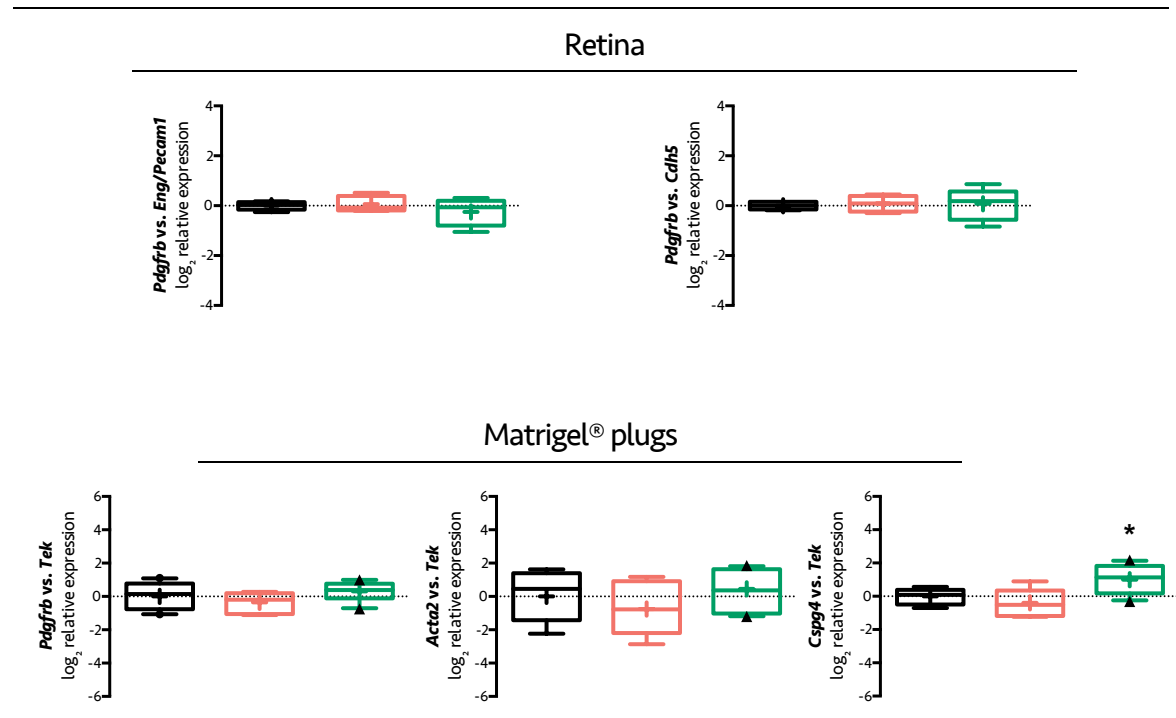


Fig.9. Mural cell markers.

qPCR analysis of mural cell markers expression in retinas and Matrigel® plugs of WT (□), L-ENG⁺ (□) and S-ENG⁺ (□) mice.

From the results above described we can obtain the following conclusions:

1. Overexpression of endoglin does not improve post-ischemic reperfusion.
2. The fundamental role that endoglin plays in post-ischemic reperfusion is mediated by its cytosolic domain.
3. Continuous overexpression of endoglin leads to an impaired angiogenesis and an altered structure of the new blood vessels.
4. Alterations in angiogenesis caused by L- or S-endoglin overexpression do not seem to be due to modifications in the tip / stalk selection during sprouting.
5. An excess of endoglin in the endothelial cell reduces its proliferation in a cytosolic domain-mediated manner.
6. Endoglin overexpression promotes endothelial cell migration in a cytosolic-domain independent way, whereas this cytosolic domain mediates the increased endothelial cell invasiveness of the extracellular matrix.
7. Extracellular domain of endoglin promotes pericyte recruitment to the new capillary.

References

1. Park S, Dimaio TA, Liu W, et al. (2013) Endoglin regulates the activation and quiescence of endothelium by participating in canonical and non-canonical TGF-beta signaling pathways. *J Cell Sci* 126:1392–1405. doi: 10.1242/jcs.117275
2. Sabbà C, Gallitelli M, Pasculli G, et al. (2006) HHT: a rare disease with a broad spectrum of clinical aspects. *Curr Pharm Des* 12:1217–20. doi: 10.2174/138161206776361219
3. Bernabeu C, Lopez-Novoa JM, Quintanilla M (2009) The emerging role of TGF-beta superfamily coreceptors in cancer. *Biochim Biophys Acta* 1792:954–973. doi: 10.1016/j.bbadis.2009.07.003
4. Van Meeteren LA, Goumans M-JJ, Ten Dijke P (2011) TGF- β Receptor Signaling Pathways in Angiogenesis; Emerging Targets for Anti-Angiogenesis Therapy. *Curr Pharm Biotechnol* 12:2108–20. doi: BSP/CPB/E-Pub/000240-12-16
5. Jerkic M, Rodriguez-Barbero A, Prieto M, et al. (2006) Reduced angiogenic responses in adult Endoglin heterozygous mice. *Cardiovasc Res* 69:845–854. doi: 10.1016/j.cardiores.2005.11.020
6. Barnett JM, Suarez S, McCollum GW, Penn JS (2014) Endoglin promotes angiogenesis in cell- and animal-based models of retinal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 55:6490–6498. doi: 10.1167/iovs.14-14945
7. Limbourg A, Korff T, Napp LC, et al. (2009) Evaluation of postnatal arteriogenesis and angiogenesis in a mouse model of hind-limb ischemia. *Nat Protoc* 4:1737–1746. doi: 10.1038/nprot.2009.185
8. Stahl A, Connor KM, Sapieha P, et al. (2010) The mouse retina as an angiogenesis model. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 51:2813–2826. doi: 10.1167/iovs.10-5176
9. Milam KE, Parikh SM (2015) The angiotensin-Tie2 signaling axis in the vascular leakage of systemic inflammation. *Tissue barriers* 3:e957508. doi: 10.4161/21688362.2014.957508
10. Guedez L, Rivera AM, Salloum R, et al. (2003) Quantitative assessment of angiogenic responses by the directed in vivo angiogenesis assay. *Am J Pathol* 162:1431–1439. doi: 10.1016/S0002-9440(10)64276-9
11. Jakobsson L, Franco Ca, Bentley K, et al. (2010) Endothelial cells dynamically compete for the tip cell position during angiogenic sprouting. *Nat Cell Biol* 12:943–953. doi: 10.1038/ncb2103
12. Blanco R, Gerhardt H (2013) VEGF and Notch in tip and stalk cell selection. *Cold Spring Harb Perspect Med* 3:a006569. doi: 10.1101/cshperspect.a006569
13. Baker M, Robinson SD, Lechertier T, et al. (2012) Use of the mouse aortic ring assay to study angiogenesis. *Nat Protoc* 7:89–104. doi: 10.1038/nprot.2011.435

14. Bourdeau A, Dumont DJ, Letarte M (1999) A murine model of hereditary hemorrhagic telangiectasia. *J Clin Invest* 104:1343–1351. doi:10.1172/JCI8088
15. Li DY, Sorensen LK, Brooke BS, et al. (1999) Defective angiogenesis in mice lacking endoglin. *Science* 284:1534–1537. doi:10.1126/science.284.5419.1534
16. Rossi E, Smadja DM, Boscolo E, et al. (2015) Endoglin regulates mural cell adhesion in the circulatory system. *Cell Mol Life Sci*. doi:10.1007/s00018-015-2099-4

