

UCH-FC
Doc- BMCN
Z 392
C.1

**SONIC HEDGEHOG (SHH) ESTIMULA EL POTENCIAL ANGIOGÉNICO DE
CÉLULAS TRONCALES MESENQUIMÁTICAS HUMANAS OBTENIDAS
DESDE LA GELATINA DE WHARTON DEL CORDÓN UMBILICAL**

Tesis entregada a la Universidad de Chile
En cumplimiento parcial de los requisitos
Para optar al grado de

Doctora en Ciencias con Mención en Biología Molecular, Celular y
Neurociencias

Facultad De Ciencias



Por

Gabriela Carolina Zavala Vivar

Noviembre, 2014

Director de Tesis Dra: Verónica Palma Alvarado

FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE
INFORME DE APROBACION
TESIS DE DOCTORADO

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Doctorado presentada por la candidata

GABRIELA CAROLINA ZAVALA VIVAR

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Ciencias con mención en Biología Molecular Celular y Neurociencias, en el examen de Defensa Privada de Tesis rendido el día 03 de Octubre del 2014

Director de Tesis:

Dra. Verónica Palma Alvarado



Comisión de Evaluación de la Tesis:

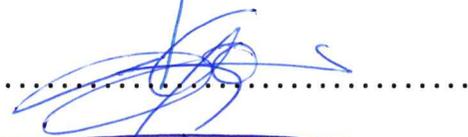
Dra. María Rosa Bono



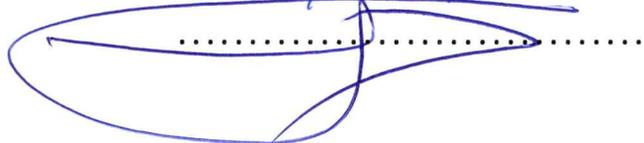
Dr. Alvaro Glavic



Dr. Hugo Olgún



Dr. Arturo Ferreira



DEDICATORIA

Esta tesis está dedicada a todos aquellos, familiares y amigos, que me acompañaron y permanecieron a mi lado durante el desarrollo de esta tesis.

RESUMEN BIOGRÁFICO



Follow through
Make your dreams come true
Don't give up the fight
You will be alright
'Cause there's no one like you in the
universe
Don't be afraid
What your mind conceives
You should make a stand
Stand up for what you believe
And tonight
We can truly say
Together we're invincible
During the struggle
They will pull us down
But please, please
Let's use this chance
To turn things around
And tonight
We can truly say
Together we're invincible
Do it on your own
It makes no difference to me

What you leave behind
What you choose to be
And whatever they say
Your souls unbreakable
During the struggle
They will pull us down
But please, please
Let's use this chance
To turn things around
And tonight
We can truly say
Together we're invincible
During the struggle
They will pull us down
Please, please
Let's use this chance
To turn things around
And tonight
We can truly say
Together we're invincible
.....Invincible, Muse

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría agradecer a todos aquellos que mediante su granito de arena apoyaron la realización de esta tesis.

Agradecer a la Dra. Verónica Palma, mi tutora, por aceptarme en su laboratorio y darme la libertad para realizar esta tesis. Al Laboratorio de Células Troncales y Biología del Desarrollo, lugar donde realicé mi tesis. A los compañeros y todos sus comentarios que ayudaron a que avanzara con mi trabajo. A Pablo Lois, por su infinita buena disposición y voluntad. Y agradecimientos especiales a la persona con quien siempre conté, siempre me apoyó: Paulina Falcón.

Al Dr. Alejandro Erices y al Laboratorio de Células Troncales y Regeneración Tisular (PUC), lugar donde di los primeros pasos de esta tesis. Con un grupo humano lleno de amigos y conocimiento, compartido semana a semana, logré aprender y empaparme con el conocimiento teórico y práctico de las células troncales. Agradecimientos especiales al Dr. Alejandro Erices quien siempre mostró su apoyo y su confianza, y siempre tuvo una palabra de ánimo cuando fue necesario. También, gracias a los amigos que aún siguen ahí!

Mis más sinceras gracias a Tomás Egaña por recibirme en su laboratorio en mi pasantía realizada en la Universidad Técnica de Munich, Alemania, y a todo su equipo humano, excelentes personas con quienes compartí trabajo y excelentes momentos.

Un sincero agradecimiento a los integrantes de mi Comisión, ya que siempre vi en ellos las ganas de ayudarme y aportar en mi tesis. Todo habría sido más difícil sin sus excelentes consejos.

Gracias a mi familia (papá, mamá, la Kika, el Tola, tíos y prima) y amigos (, que tuvieron que aguantar mi trabajo excesivo, día y noche, incluyendo fines de semana y festivos. Gracias por aguantarme y estar ahí siempre.

A mis compañeros del doc, ya que ese primer año habría sido aún más difícil sin su compañía, Adri y Lore, mi compañera del alma.

Gracias a Diego, por estar ahí durante esta etapa, por su apoyo y ayuda.

Por supuesto, agradecer el financiamiento otorgado por Conicyt para la realización de esta tesis (Beca para la Realización de Tesis Doctoral y Beca Apoyo de Tesis) y de Becas Chile para la realización de una pasantía en el extranjero.

ÍNDICE

| | |
|---|------|
| DEDICATORIA | ii |
| RESUMEN BIOGRÁFICO..... | iii |
| AGRADECIMIENTOS | iv |
| ÍNDICE | v |
| LISTADO DE TABLAS | ix |
| LISTADO DE FIGURAS | x |
| LISTADO DE ABREVIATURAS | xii |
| RESUMEN | xv |
| ABSTRACT..... | xvii |
| INTRODUCCIÓN..... | 1 |
| 1. La angiogénesis y el desarrollo vascular | 1 |
| 2. Factores angiogénicos clásicos: VEGF y ANGPT1..... | 3 |
| 2.1. VEGF, <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i> | 3 |
| 2.2. ANGPT1, <i>Angiopoietin 1</i> | 6 |
| 3. La vía de señalización SHH/GLI y su rol en el desarrollo vascular..... | 7 |
| 3.1. Los factores Hedgehog (HH) | 7 |
| 3.2. Sonic Hedgehog (SHH) | 8 |
| 3.4. Factores GLI, efectores de la señalización de SHH..... | 9 |
| 3.5. SHH como modulador de la angiogénesis | 11 |
| 3.6. ¿Es SHH un regulador angiogénico que actúa en el estroma? | 12 |
| 4. MSC: ¿célula troncal mesenquimática o estromal?..... | 14 |
| 5. MSC de la gelatina de Wharton del cordón umbilical (WJ-MS)..... | 16 |
| 6. MSC, angiogénesis y soporte trófico..... | 18 |
| Hipótesis | 20 |
| Objetivo General..... | 20 |
| Objetivos Específicos | 20 |
| MATERIALES Y MÉTODOS | 21 |
| 1. Materiales | 21 |
| 1.1. Cultivo Celular | 21 |
| 1.2. Líneas Celulares..... | 22 |
| 1.3. Tratamientos farmacológicos | 22 |
| 1.4. Extracción de RNA y síntesis DNAc | 23 |

| | | |
|-------|---|----|
| 1.5. | RT-PCR y qPCR..... | 23 |
| 1.6. | Western Blot | 24 |
| 1.7. | Inmunofluorescencia | 25 |
| 1.8. | Citometría de flujo | 26 |
| 1.9. | Ensayos de angiogénesis..... | 26 |
| 1.12. | Soluciones | 28 |
| 2. | Métodos..... | 29 |
| 2.1. | Obtención de muestras de cordón umbilical humano | 29 |
| 2.2. | Generación de cultivos de WJ-MSC a partir de cordón umbilical..... | 30 |
| 2.3 | Determinación del tiempo de duplicación poblacional | 31 |
| 2.4. | Aislamiento de HUVEC | 31 |
| 2.6. | Ensayos de diferenciación..... | 32 |
| 2.7. | Determinación de la diferenciación osteogénica (tinción con Alizarin Red S) | 32 |
| 2.8. | Determinación de la diferenciación adipogénica (tinción con Oil Red O) | 33 |
| 2.9. | Tratamientos farmacológicos | 33 |
| 2.10. | Determinación de la actividad metabólica mediante ensayo MTT | 33 |
| 2.11. | Extracción de RNA..... | 34 |
| 2.12. | Síntesis de DNAc | 34 |
| 2.13. | PCR cuantitativo (qPCR) | 35 |
| 2.14. | Extracción de proteínas | 36 |
| 2.15. | Cuantificación de proteínas | 36 |
| 2.16. | Western blot | 37 |
| 2.19. | Inmunofluorescencia de WJ-MSC en monocapa | 38 |
| 2.20. | Inmunohistoquímica (IHQ) de cordón umbilical..... | 39 |
| 2.21. | Obtención del sobrenadante celular (medio condicionado) de WJ-MSC..... | 40 |
| 2.22. | Determinación de factores angiogénicos (<i>Proteome profiler array</i>) | 40 |
| 2.23. | Ensayo de angiogénesis <i>in vitro</i> (formación de túbulos en HUVEC) | 41 |
| 2.25. | Cuantificación del ensayo CAM..... | 43 |
| 2.26. | Ensayo reportero de actividad fosfatasa alcalina (FA)..... | 44 |
| 2.27. | Análisis estadístico | 46 |
| | RESULTADOS | 47 |
| 1. | Expresión de los componentes de la vía SHH/GLI | 47 |
| 1.1. | SHH y PTCH1 se expresan en el estroma del cordón umbilical humano | 47 |
| 1.2. | WJ-MSC expresan SHH..... | 49 |

| | | |
|------|--|----|
| 1.3. | WJ-MSC secretan SHH con actividad biológica..... | 50 |
| 1.4. | Las WJ-MSC expresan PTCH1 y los componentes de la vía SHH/GLI..... | 54 |
| 2. | WJ-MSC secretan factores de crecimiento..... | 56 |
| 2.1. | WJ-MSC secretan factores angiogénicos y existe variabilidad en los secretomas de muestras provenientes de donantes distintos..... | 56 |
| 2.2. | WJ-MSC secretan factores tróficos relacionados con el proceso de reparación tisular..... | 56 |
| 2.3. | WJ-MSC secretan factores que inducen la angiogénesis <i>in vitro</i> | 57 |
| 3. | La vía SHH/GLI está activa en las WJ-MSC..... | 63 |
| 3.1. | La actividad metabólica de las WJ-MSC no se ve afectada con los tratamientos farmacológicos..... | 63 |
| 3.2. | La estimulación de la vía modula la expresión de <i>PTCH1</i> , <i>GLI1</i> y <i>FGF2</i> | 65 |
| 3.3. | El bloqueo de la señalización de SHH disminuye la expresión de <i>PTCH1</i> y aumenta la de <i>FGF2</i> en WJ-MSC..... | 66 |
| 4. | La vía SHH/GLI regula las propiedades angiogénicas de WJ-MSC..... | 67 |
| 4.1. | La estimulación de la vía SHH/GLI en WJ-MSC potencia el efecto angiogénico de su secretoma..... | 67 |
| 4.2. | La inhibición de la vía SHH/GLI disminuye las propiedades angiogénicas del secretoma de WJ-MSC..... | 70 |
| 5. | La vía SHH/GLI modula las propiedades angiogénicas de las WJ-MSC mediante la regulación de la expresión de diversos factores tróficos..... | 70 |
| 5.1. | <i>VEGF</i> y <i>ANGPT1</i> son genes regulados por la vía SHH/GLI en WJ-MSC..... | 70 |
| 5.2. | <i>VEGF</i> y <i>ANGPT1</i> se expresan en WJ-MSC..... | 72 |
| 5.3. | SHH regula la expresión del RNAm de <i>VEGF</i> en WJ-MSC..... | 72 |
| 5.4. | SHH no estimula el aumento de la expresión de <i>VEGF</i> , pero 5E1 sí fue capaz de disminuir su expresión..... | 73 |
| 5.5. | El aumento del transcrito de <i>VEGF</i> no se condice con el aumento de la proteína en WJ-MSC..... | 73 |
| 5.6. | SHH regula la expresión del RNAm de <i>ANGPT1</i> en WJ-MSC..... | 74 |
| 5.7. | La estimulación de la vía estimula la expresión de la proteína <i>ANGPT1</i> | 74 |
| 5.8. | La estimulación de la vía SHH/GLI induce la secreción de múltiples agentes angiogénicos..... | 79 |
| 6. | La vía SHH/GLI regula el potencial angiogénico de WJ-MSC <i>in vivo</i> | 81 |
| | DISCUSIÓN..... | 85 |
| 1. | Relevancia de la señalización de SHH en el estroma vascular y tumoral..... | 86 |
| 2. | SHH, un factor de nicho en el estroma..... | 87 |

| | |
|--|-----|
| 3. La vía SHH modula el perfil de expresión de los factores angiogénicos VEGF y ANGPT1 | 89 |
| 3.1. SHH y la regulación de VEGF | 89 |
| 3.2. SHH y la regulación de ANGPT1 | 92 |
| 4. La vía de SHH/GLI regula las propiedades angiogénicas de las WJ-MSc | 93 |
| 5. Interacción entre SHH y FGF2 | 96 |
| 6. Las WJ-MSc secretan factores angiogénicos | 98 |
| 6.1. Rol de la hipoxia en la expresión de factores angiogénicos | 99 |
| 7. Actividad de la vía SHH/GLI en el cordón..... | 101 |
| CONCLUSIONES | 106 |
| BIBLIOGRAFÍA..... | 107 |
| ANEXOS | 115 |
| Anexo 1. WJ-MSc poseen las características de MSc..... | 115 |
| Anexo 2. Factores analizados por el <i>Proteome Profiler Array</i> | 116 |
| Anexo 3. Expresión de componentes de la vía SHH/GLI en HUVEC..... | 117 |
| Anexo 4. Dependencia temporal del efecto de Pur sobre el potencial angiogénico del MC | 118 |

LISTADO DE TABLAS

Tabla 1. Tratamientos farmacológicos utilizados para modular la vía de señalización SHH/GLI

Tabla 2. Partidores utilizados en RT-PCR y qPCR

Tabla 3. Condiciones de uso (concentración y eficiencia) de partidores utilizados en qPCR

Tabla 4. Anticuerpos primarios utilizados en Western blot, IHQ e inmunofluorescencia

Tabla 5. Anticuerpos utilizados para análisis de marcadores mediante citometría de flujo

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1. Etapas del proceso angiogénico

Figura 2. Representación esquemática de la vía SHH/GLI en mamíferos

Figura 3. Funciones de las MSC en la médula ósea y otros nichos

Figura 4. Modelo de la hipótesis

Figura 5. SHH y PTCH1 se expresan en el estroma del cordón umbilical humano

Figura 6. WJ-MSC expresan SHH

Figura 7. WJ-MSC secretan SHH biológicamente activo

Figura 8. WJ-MSC expresan PTCH1 y los componentes de la vía SHH/GLI

Figura 9. WJ-MSC secretan factores angiogénicos y existe diversidad en los secretomas

Figura 10. Las WJ-MSC secretan factores de crecimiento relacionados con la angiogénesis y la reparación de tejidos

Figura 11. WJ-MSC secretan factores que inducen el proceso angiogénico *in vitro*

Figura 12. La modulación farmacológica de la vía SHH no afecta la actividad metabólica de WJ-MSC

Figura 13. La vía SHH/GLI está activa en WJ-MSC y responden a ella

Figura 14. El bloqueo de SHH inhibe la actividad basal de la vía en WJ-MSC

Figura 15. La vía SHH/GLI modula las propiedades angiogénicas de las WJ-MSC *in vitro*

Figura 16. WJ-MSC expresan y secretan VEGF y ANGPT1, factores angiogénicos clásicos

Figura 17. VEGF es regulado por la vía SHH/GLI a nivel de RNAm en WJ-MSC

Figura 18. La estimulación de la vía SHH/GLI no induce la expresión de VEGF en WJ-MSC

Figura 19. ANGPT1 es regulada por la vía SHH/GLI en WJ-MSC

Figura 20. La estimulación de la vía SHH/GLI tiene un efecto global sobre la secreción de factores angiogénicos

Figura 21. Las WJ-MSC inducen el proceso angiogénico *in vivo*

Figura 22. Modelo de trabajo

LISTADO DE ABREVIATURAS

| | |
|---------------|---|
| ANGPT1 | Angiopoyetina 1 |
| BSA | albúmina de suero bovino |
| CAM | membrana corioalatoídea de embrión de pollo (<i>chorioallantoic membrane</i>) |
| Cyc | ciclopamina |
| DAPI | Diclorhidrato de 4',6-diamidino-2-fenilindol |
| DNAc | DNA complementario |
| DMEM | <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> |
| DMSO | dimetil sulfóxido |
| EDTA | ácido etilendiaminotetraacético |
| FA | fosfatasa alcalina |
| FGF2 | factor de crecimiento fibroblástico 2 (<i>Fibroblastic growth factor 2</i>) |
| HH | Hedgehog |
| HPLSC | células troncales del ligamento periodontal humano (<i>human periodontal ligament stem cells</i>) |
| HRP | peroxidasa (<i>horseradish peroxidase</i>) |
| HUVEC | células endoteliales de la vena umbilical humana |

| | |
|------------------------|---|
| IHQ | inmunohistoquímica |
| kDa | kilodalton |
| MSC | célula troncal mesenquimática (<i>mesenchymal stem cell</i>) |
| MTT | metil tiazol tetrazolio |
| NBCS | suero de ternero recién nacido (<i>new born calf serum</i>) |
| pb | pares de bases |
| PBS | tampón fosfato salino |
| PCR | reacción en cadena de la polimerasa |
| PFA | paraformaldehído |
| pH | potencial de hidrógeno |
| Pur | purmorfamina |
| qPCR | reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa |
| RNA_m | ácido rinonucleico mensajero |
| rpm | revoluciones por minuto |
| RT | transcriptasa reversa |
| SDS | dodecil sulfato de sodio |
| SDS-PAGE | electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico |
| SFB | suero fetal bovino |
| SHH | Sonic hedgehog |

| | |
|----------------------|---|
| TBS | tampón tris-salino |
| TBS-T | tampón tris-salino suplementado con Tween al 0.1%. |
| T_m | temperatura de fusión (<i>melting temperature</i>) |
| VEGF | factor de crecimiento endotelial vascular (<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>) |
| WJ-MSC | células mesenquimáticas de la gelatina de Wharton |

RESUMEN

La angiogénesis es el proceso fisiológico mediante el cual se generan nuevos vasos sanguíneos a partir de otros preexistentes y requiere de la comunicación coordinada del endotelio vascular y el tejido estromal que le rodea. Esta conversación está mediada por factores solubles que pueden ser secretados por el estroma y modulan la formación y mantención de los vasos sanguíneos. En esta tesis doctoral, quisimos determinar el papel que juega la vía de señalización de Sonic Hedgehog (SHH)/GLI en la comunicación estromal-endotelial, estudiando específicamente la regulación que SHH ejerce sobre la expresión y secreción de factores angiogénicos en el estroma. Para abordar esta pregunta, seleccionamos como modelo de estudio el cordón umbilical y su componente celular estromal, las WJ-MSC (células troncales mesenquimáticas aisladas desde la zona perivascular del cordón umbilical humano). Determinamos que las WJ-MSC son una fuente del ligando SHH y responden a él, generándose una señalización autocrina. La vía SHH/GLI se encuentra activa de forma basal en estas células y las WJ-MSC responden a la vía modulando la expresión *PTCH1* y *GLI1*, genes blanco clásicos de la vía SHH/GLI y de *FGF2*, factor maestro del desarrollo vascular. Asimismo, la vía SHH/GLI regula la expresión de factores angiogénicos clásicos tales como *VEGF* y *ANGPT1* y la secreción de éste último, junto a otros factores angiogénicos, tales como Angiogenina, MMP-9, uPA, Serpina E1, Activina A, GM-CSF, PDGF AB/BB y HFG. Por último, los factores secretados por las WJ-MSC

inducen el proceso angiogénico actuando sobre las células endoteliales del cordón umbilical (HUVEC; *in vitro*) y posiblemente sobre otras poblaciones celulares vasculares (*in vivo*), propiedad que es modulada a su vez por la vía SHH/GLI, indicativo de que la señalización SHH/GLI es un componente fundamental del nicho vascular.

ABSTRACT

Angiogenesis is the physiological process by which new blood vessels are generated from pre-existing ones and requires the coordinated communication between vascular endothelium and the surrounding stromal tissue. This crosstalk is mediated by soluble factors which could be secreted by the stroma and modulate the formation and maintenance of blood vessels. In this thesis, we aimed to determine the role of the Sonic Hedgehog (SHH)/GLI pathway in stromal- endothelial communication, specifically studying the regulation that SHH exerts over the expression and secretion of angiogenic factors in the stroma. To address this question, we selected as a model system the human umbilical cord stromal cell component, the WJ-MSCs (mesenchymal stem cells isolated from the perivascular region of the umbilical cord). We determined that WJ-MSC are a source of SHH and responds to it, generating autocrine and/or paracrine signaling. The SHH/GLI pathway is active at baseline levels in these cells and WJ-MSCs respond by modulating the expression of *PTCH1* and *GLI1*, classic targets of the SHH/GLI pathway, and *FGF2*, considered a master regulator of vascular development. Moreover, the pathway regulates the expression of classical angiogenic factors such as *VEGF* and *ANGPT1* and secretion of the latter, together with other angiogenic factors, such as Angiogenin, MMP-9, uPA, Serpin E1, Activin A, GM-CSF, PDGF AB/BB and HFG. Finally, the factors secreted by WJ-MSC are able to induce angiogenesis by acting over endothelial cells of the umbilical cord (HUVEC; *in*

vitro) and possibly over other vascular cell populations (*in vivo*), a property that is modulated in turn by the SHH/GLI pathway, indicating that the pathway is a key component of the vascular niche.

INTRODUCCIÓN

1. La angiogénesis y el desarrollo vascular

La red vascular corresponde al conjunto ramificado de vasos sanguíneos que permite la circulación de la sangre, lo cual hace posible el transporte y distribución de nutrientes, desechos y células hacia todo el organismo. Esta red se genera durante el desarrollo embrionario a través del proceso denominado vasculogénesis (Carmeliet, P. y Collen, D. 1998). Este proceso corresponde a la formación de vasos sanguíneos *de novo* e involucra la diferenciación, migración y fusión de los angioblastos, precursores de origen mesodérmico, que dan origen a los vasos sanguíneos (Herbert, S. P. y Stainier, D. Y. 2011). En un principio, los angioblastos se fusionan y generan una red vascular primitiva (o plexo), que se ramifica de forma jerárquica y va adquiriendo el carácter arterial o venoso.

Las células endoteliales, que revisten la red vascular, también se originan a partir de los angioblastos, y adquirirán fenotipo arterial o venoso dependiendo del flujo hemodinámico y de las vías de señalización activas (Herbert, S. P. y Stainier, D. Y. 2011; Senger, D. R. y Davis, G. E. 2011). Por una parte, se ha establecido que la señalización de Notch regula la expresión de los factores de transcripción HEY1 y HEY2 y éstos promueven la diferenciación a linaje arterial (Zhong, T. P. y col. 2001; Fischer, A. y col. 2004), mientras que la

señalización del factor de transcripción COUPTF-II reprime la señalización de Notch y promueve la adquisición del fenotipo venoso (You, L. R. y col. 2005).

La remodelación y/o generación de vasos a partir de la red vascular primitiva ocurre a través de la Angiogénesis. Este proceso se mantiene activo hasta la adultez en procesos tales como la cicatrización de heridas, ciclo menstrual, embarazo, entre otros, y puede encontrarse alterado en condiciones patológicas como el cáncer (Carmeliet, P. 2005).

La angiogénesis es un proceso complejo que ocurre en varios pasos y requiere un control fino de la conducta de las células endoteliales y otras poblaciones celulares (Figura 1). En vasos estables o quiescentes, las células endoteliales forman una monocapa del tipo *cobblestone* o empedrado de células mitóticamente inactivas. Ante señales angiogénicas, como VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) y FGF2 (*Fibroblastic Growth Factor 2*) entre otros, las células endoteliales sufren cambios en su conducta y morfología: se pierden las interacciones célula-célula y se activan proteasas que degradan la membrana basal del vaso sanguíneo, lo que libera a las células endoteliales que, seguidamente, adquieren un carácter invasivo y móvil e inician el proceso de la ramificación del vaso (Herbert, S. P. y Stainier, D. Y. 2011; Senger, D. R. y Davis, G. E. 2011).

Para que un nuevo vaso madure y permanezca en el tiempo, se requiere del reclutamiento de células accesorias. PDGF β (*Platelet Derived Growth Factor β*), ANGPT1 (*Angiopoietin 1*) y TGF β 1 (*Transforming Growth Factor β 1*) en conjunto reclutan células murales, tales como pericitos y células musculares lisas vasculares, las cuales rodean al lumen primitivo y estabilizan la pared vascular (Jain, R. K. 2003; Rocha, S. F. y Adams, R. H. 2009). Posteriormente, se deposita membrana basal en la región más periférica del vaso, fortaleciéndose las interacciones célula-célula y suprimiendo el carácter invasivo de las

células endoteliales para finalmente conformar un nuevo vaso sanguíneo (Gaengel, K. y col. 2009).

La angiogénesis requiere la actuación coordinada de factores que estimulen el proceso, a través de la señalización sobre el endotelio y sobre el estroma circundante, siendo éste último un componente fundamental dentro de la regulación del proceso. Asimismo, el proceso también requiere de factores promotores de la maduración y anti-angiogénicos para detener el proceso, el cual en condiciones homeostáticas, es un fenómeno acotado en el tiempo.

2. Factores angiogénicos clásicos: VEGF y ANGPT1

La angiogénesis es estimulada por múltiples factores y a continuación destacaremos los denominados clásicos: VEGF y ANGPT1.

2.1. VEGF, *Vascular Endothelial Growth Factor*

VEGF es una proteína implicada en la vasculogénesis durante la embriogénesis y en la angiogénesis, desde el embrión hasta el adulto y se considera el regulador maestro del proceso. Los integrantes de la familia VEGF son glicoproteínas diméricas de 40 kDa y en mamíferos encontramos 5 miembros: VEGFA, VEGFB, VEGFC, VEGFD y PLGF que son codificados por 5 genes distintos. Estos ligandos señalizan mediante varios receptores del tipo receptor tirosina quinasa o VEGFRs: VEGFR1 (FLT-1), VEGFR2 (KDR o FLK1) y VEGFR3 (FLT4) (Yancopoulos, G. D. y col. 2000). Además utilizan co-receptores como las Neuropilinas (NRP1 y NRP2) y proteoglicanos de heparán sulfato (Olsson, A. K. y col. 2006).

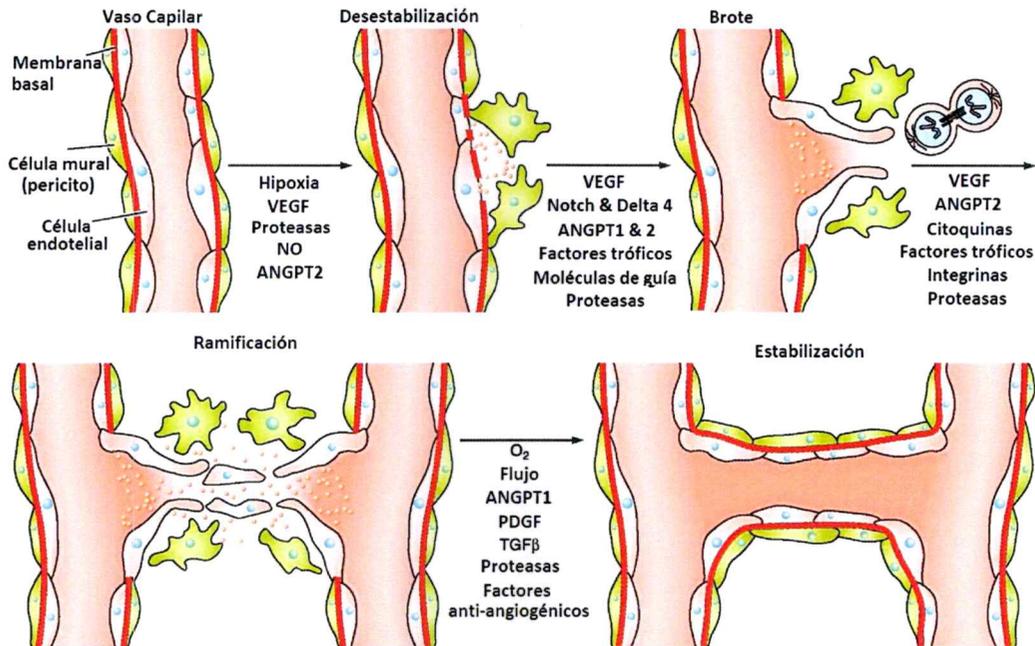


Figura 1. Etapas del proceso angiogénico.

La angiogénesis puede ser estimulada por varios estímulos, como la hipoxia u otros factores que son angiogénicos de forma autónoma, como NO (óxido nítrico), VEGF, FGF2 y ANGPT1 y 2. Estos factores actúan sobre los vasos para aumentar la permeabilidad de la pared capilar. Esta desestabilización permite a la célula endotelial migrar y proliferar para formar túbulos, proceso estimulado por VEGF, Angiopoyetinas, moléculas de guía axonal, factores de crecimiento, citoquinas y asimismo la degradación de la matriz. La maduración de los vasos nacientes se ve acompañada por la expresión de factores anti-angiogénicos, PDGFβ, TGFβ entre otros que permiten la maduración del vaso. (Modificado de Clapp, C. y col. 2009).

Los VEGFR inducen procesos celulares comunes para otros factores de crecimiento, como migración celular, supervivencia y proliferación. Pero además, señalizan para funciones que son únicas a VEGF, como es la generación de estructuras tubulares tridimensionales y la regulación de la permeabilidad vascular (Gale, N. W. y Yancopoulos, G. D. 1999; Olsson, A. K. y col. 2006).

De los ligandos, VEGFA o simplemente VEGF, es el más estudiado y posee funciones importantes durante el desarrollo del sistema vascular y la angiogénesis. Está codificado por un gen de 8 exones y mediante *splicing* alternativo se generan las distintas isoformas de la proteína, cada una con distintas actividades biológicas: VEGF121, VEGF145, VEGF165, VEGF189 y VEGF206 según el número de aminoácidos que posee en su estructura proteica (Hoeben, A. y col. 2004). Los aminoácidos codificados por los exones 1- 5 y 8, correspondientes al extremo N-terminal, están conservados en todas las isoformas (excepto VEGF148) por lo que el *splicing* alternativo ocurre en los aminoácidos codificados en los exones 6 y 7 (Poltorak, Z. y col. 1997; Neufeld, G. y col. 1999). Estos exones codifican para 2 dominios de unión a heparina, por lo cual la presencia o ausencia de estos dominios determina la interacción de los VEGF con sus receptores y su difusión en la matriz extracelular (Olsson, A. K. y col. 2006). Las isoformas que contienen este dominio (VEGF145, VEGF189 y VEGF206) interactúan fuertemente con proteoglicanos que contienen heparina en la matriz, mientras que aquellos que carecen de este dominio son completamente difusibles (VEGF121). VEGF165 contiene un dominio de unión a heparina (codificada por el exón 7) por lo cual presenta difusión moderada y es la isoforma más abundante y en consecuencia, la más estudiada (Ortega, N. y col. 1999).

La expresión de VEGF es regulada temporal y espacialmente y su desregulación lleva a alteraciones serias del desarrollo. Ratones mutantes nulos para *Vegf* (*Vegf*^{-/-}) no son viables,

sufren serias alteraciones del desarrollo vascular y mueren en etapa embrionaria (días E9.5-10.5) (Carmeliet, P. y col. 1996; Ferrara, N. y Bunting, S. 1996). El mutante heterocigoto (*Vegf*^{+/-}) también presenta alteraciones en el desarrollo vascular, es inviable y muere durante la embriogénesis (días E11-12) (Carmeliet, P. y col. 1996; Ferrara, N. y col. 1996). El mutante de VEGF es posiblemente el único ejemplo de letalidad embrionaria debido a un efecto de dosis haploinsuficiente en mamíferos.

2.2. ANGPT1, Angiopoietin 1

Las Angiopoietinas conforman una familia de glicoproteínas que posee a los siguientes miembros: Angiopoietina 1 (ANGPT1) 2, 3 y 4. Estas glicoproteínas, en su forma oligomérica, señalizan a través de los receptores de la familia TIE, específicamente con la isoforma TIE2 (Crivellato, E. 2011). Las Angiopoietinas y los receptores TIE cumplen roles preponderantes durante el desarrollo vascular, pero en estadios más tardíos que VEGF. Dado que en la red vascular adulta controlan la remodelación y estabilización de los vasos, ANGPT1 es necesaria para la correcta organización y maduración de los vasos. Además estimula la quiescencia de las células endoteliales y la integridad estructural de los vasos (Fukuhara, S. y col. 2010; Herbert, S. P. y Stainier, D. Y. 2011).

El RNAm de ANGPT1 se detecta desde E9-11 en el miocardio y luego en el mesénquima que rodea a los vasos sanguíneos. ANGPT1 no induce la proliferación de células endoteliales *in vitro* pero sí estimula la ramificación de los vasos (Davis, S. y col. 1996).

Al igual que VEGF, ANGPT1 es fundamental para el desarrollo embrionario, tal como lo demuestra el análisis de los mutantes. El mutante murino *Angpt1*^{-/-} parece desarrollarse normalmente hasta E10.5 pero muere en E12.5. En este animal es posible observar que sí bien ocurre desarrollo de la red vascular, ésta presenta una arborización pobre, vasos dilatados y bajo número de vasos de pequeño calibre. Los vasos contienen menos células

endoteliales, se observan defectos en la interacción célula-célula y con la matriz extracelular, además de ruptura de los vasos (Suri, C. y col. 1996).

Estos datos demuestran que la señalización tanto de VEGF como de ANGPT1, junto a otros factores es fundamental para el desarrollo de una red vascular funcional. Así, la regulación de la angiogénesis requiere de un complejo balance entre múltiples factores (pro y anti-angiogénicos), distintos tipos celulares (células endoteliales, murales, inflamatorias) y el estroma circundante. En el adulto, la angiogénesis se mantiene en forma fisiológica y recientes estudios han enfatizado la importancia de la señalización de Hedgehog en el reclutamiento de señales angiogénicas.

3. La vía de señalización SHH/GLI y su rol en el desarrollo vascular

3.1. Los factores Hedgehog (HH)

La vía de señalización Hedgehog (HH) se encuentra altamente conservada desde invertebrados a humanos y es esencial para el desarrollo del embrión y la mantención de la homeostasis en el adulto. Las proteínas HH se comportan como morfógenos durante el desarrollo embrionario y se han analizado con detalle los mecanismos a través de los cuales la vía induce la expresión de genes relacionados con morfogénesis, proliferación y diferenciación en mamíferos (Fuccillo, M. y col. 2006). Modulando estas funciones, la vía actúa sobre el mesodermo durante la transición epitelio-mesénquima, siendo indispensable durante el desarrollo de los miembros, pulmón, intestino, folículos pilosos y hueso (Briscoe, J. y Therond, P. P. 2013). También participa en el desarrollo y organización del tubo neural (Jeong, J. y McMahon, A. P. 2005; Holtz, A. M. y col. 2013) y de estructuras dorsales del encéfalo (Dahmane, N. y Ruiz i Altaba, A. 1999; Palma, V. y col. 2005; Ruiz i Altaba, A. y col. 2002) regulando la mantención de nichos de células troncales neurales (Palma, V. y Ruiz i Altaba, A. 2004; Fuccillo, M. y col. 2006) , entre otras funciones.

En mamíferos se encuentran tres genes HH: Indian hedgehog (IHH), Desert hedgehog (DHH) y Sonic hedgehog (SHH), siendo éste último el más estudiado.

3.2. Sonic Hedgehog (SHH)

SHH es el ligando más abundante dentro de la familia. Se traduce como una pre-proteína de 45 kDa, pero dentro de la ruta secretoria sufre de modificaciones post-traduccionales que conllevan a la generación de la forma madura con actividad biológica, de 19 kDa. SHH sufre un corte proteolítico que elimina el segmento C-terminal y además se modifica en sus 2 extremos: en el N-terminal se agrega un ácido palmítico y en su extremo C-terminal, un grupo colesterol. SHH es secretado en su forma activa y sus modificaciones lipídicas le permiten interactuar con membranas por lo cual puede permanecer unido a la célula que lo produce o bien, puede difundir para actuar sobre otras células de forma paracrina (Ingham, P. W. y McMahon, A. P. 2001; Hui, C. C. y Angers, S. 2011).

3.3. Señalización SHH/GLI canónica

La señalización SHH/GLI o canónica está mediada principalmente por la función de dos receptores: Patched 1 (PTCH1) y Smoothed (SMO) y por los factores de transcripción GLI1, GLI2 y GLI3 (Figura 2). En ausencia de ligando, la vía permanece inactiva, ya que PTCH1 inhibe la señalización intracelular mediada por SMO, pero en presencia de SHH, éste se une a su receptor PTCH1 lo que libera la inhibición sobre SMO. Una vez des-reprimido, SMO gatilla la transducción de la señal a nivel citoplasmático, lo que permite la generación de formas activadoras de los factores de transcripción GLI (específicamente GLI2 y en menor medida GLI3), y la posterior transcripción de genes blancos, tales como *GLI1* y *PTCH1*, entre otros, siendo *GLI1* otro efector positivo de la vía (Hui, C. C. y Angers, S. 2011). Por ende, la señalización canónica es aquella que culmina con la transcripción de nuevos genes, blancos de la vía SHH/GLI.

3.4. Factores GLI, efectores de la señalización de SHH

Las proteínas GLI son factores de transcripción cuyo dominio de unión a DNA está compuesto por motivos “dedos de Zinc” (*Zinc-finger*) y mediante el cual reconocen secuencias específicas en genes blanco, denominadas GBS o “*GLI-Binding Sites*” (Koebernick, K. y Pieler, T. 2002).

Los distintos factores GLI poseen diferencias estructurales que determinan su función. GLI1 contiene un dominio C-terminal que actúa como un activador transcripcional, mientras que GLI2 y GLI3 poseen además del dominio activador, un dominio N-terminal de actividad represora. Cuando la vía está silenciada, ocurre un enriquecimiento de formas represoras de los factores GLI (GLIR), ya que GLI2 y GLI3 sufren de modificaciones traduccionales (fosforilación y ubiquitinación) lo que les hace sustrato del proteosoma, generándose la degradación parcial del dominio activador. La activación de la vía inhibe esta degradación y cambia el balance desde las formas represoras hacia las activadoras (Ruiz i Altaba, A. y col. 2002; Hui, C. C. y Angers, S. 2011).

GLI1 es el principal activador de la vía, además que es blanco de la misma, por lo cual su papel sería el de proveer una potenciación en las respuestas al ligando. El estudio en mutantes indica que GLI1 es prescindible para el desarrollo, ya que los animales son viables. GLI2 también actúa como activador transcripcional, pero contiene un motivo represor que también podría ejercer esta función celular *in vivo*. GLI3 es el principal represor de la vía, y su mutación genera animales viables pero con alteraciones en el desarrollo de los miembros y cerebro. Por ello, el estudio de los mutantes en estos factores indica que GLI2 y GLI3 son los mediadores primarios de la señalización de la vía SHH (Varjosalo, M. y Taipale, J. 2008; Hui, C. C. y Angers, S. 2011).

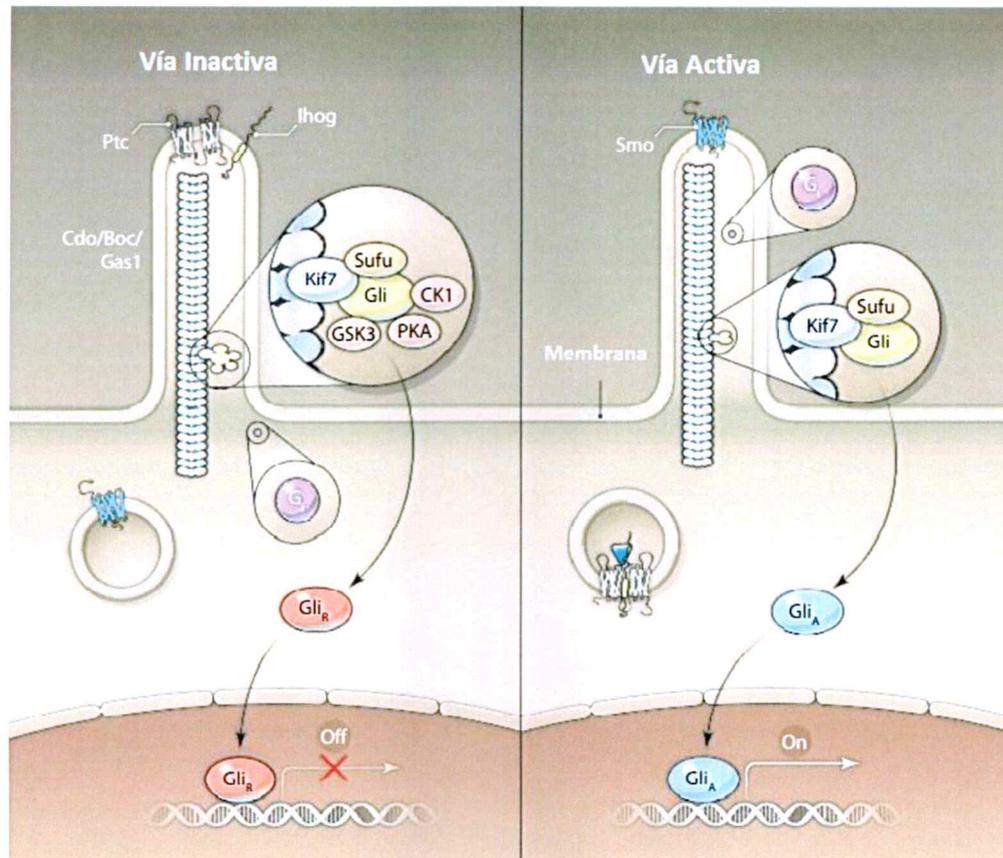


Figura 2. Representación esquemática de la vía SHH/GLI en mamíferos.

SHH se une al receptor PTCH1 (Patched 1) y también puede unirse a otros co-receptores, tales como Boc y Cdo (homólogos de Ihog en mamíferos) y Gas1. En ausencia de ligando, los factores GLI son degradados parcialmente por el proteosoma a través de la acción de PKA (proteína quinasa A), CK1 (quinasa caseína 1) y GSK3 (quinasa sintasa del glicógeno) generando formas represoras de GLI (GLIR). La unión de SHH libera la inhibición de PTCH1 sobre SMO el cual señaliza como receptor asociado a proteína G (G_i , específicamente) y permite la generación de formas activadoras de GLI (GLIA), a través de la inhibición del procesamiento proteosomal y de Sufu y Cos2/Kif7. GLIA se traslocan al núcleo y se une a secuencias específicas (GBS: *GLI Binding Sites*) presentes en la región reguladora de genes blanco e induce la expresión de ellos, como *PTCH1* y *GLI1*. (Modificado de Hui, C. C. y Angers, S. 2011).

Para el estudio funcional de la vía se cuenta con agentes farmacológicos que actúan como agonistas o antagonistas de ésta y permiten su modulación y estudio. Para inhibir la vía se usa principalmente Ciclopamina (Cyc), un alcaloide natural que se une a SMO, y 5E1, anticuerpo que se une a SHH secuestrándolo e impidiendo la interacción con PTCH1. Como agonista se utiliza SHH recombinante o Purmorfarmina (Pur), purina que se une a Smo (mismo sitio de unión que Cyc) activando la vía (Dahmane, N. y Ruiz i Altaba, A. 1999; Stanton, B. Z. y Peng, L. F. 2010; Carney, T. J. y Ingham, P. W. 2013).

3.5.SHH como modulador de la angiogénesis

La observación de mutantes de la vía HH, dio inicio al estudio del papel que juega SHH en el proceso de vascularización y posteriormente, en el proceso de angiogénesis. Ratones nulos para Shh poseen pulmones con ramificación disminuida y carecen de una vascularización normal (Pepicelli, C. V. y col. 1998). En concordancia, en un modelo de sobreexpresión de Shh en la región dorsal del tubo neural en ratones se observa no sólo una alta proliferación de precursores neurales sino que además una hipervascularización de la región dorsal del tubo dorsal en E12, lo que sugirió que Shh jugaría un papel en la angiogénesis (Rowitch, D. H. y col. 1999).

El estudio de SHH como protagonista en la angiogénesis se ha basado en la observación de mutantes, siendo las alteraciones en el sistema vascular una observación secundaria que ha ido generando gran interés. El trabajo de Pola y col. sienta las bases del estudio de cómo SHH actuaría sobre sus efectores y puede comandar el proceso angiogénico, dado que demuestra que la vía está activa y funcional en la vida post-natal y es un promotor de la angiogénesis. Es así como este grupo demostró la activación de la vía SHH/GLI en el sistema cardiovascular de ratones en zonas sometidas a isquemia. Asimismo, describieron que la vía se activa en el estroma vascular, tejido mesenquimal intersticial que rodean a los vasos

sanguíneos. Utilizando una línea de fibroblastos, demostraron que Shh estimula la expresión de *Vegf*, *Angpt1* y *Angpt2* y la disminución de *Fgf2*. Sin embargo, el tratamiento con Shh no tuvo efectos sobre la transcripción de estos genes en las células endoteliales ni tampoco en su proliferación, por lo cual se determinó que la población celular objetivo de la señalización de la vía era el estroma vascular y no el endotelio (Pola, R. y col. 2001).

Esta observación permitió proponer que SHH es un agente promotor jerárquico de la angiogénesis, pero indirecto, ya que *per se* no sería el estimulador, sino que lo haría a través de sus mecanismos de señalización transcripcional sobre el estroma. Esto porque SHH tiene el potencial de inducir la expresión y secreción de factores angiogénicos que tienen un efecto directo sobre la formación y el establecimiento de los vasos. Asimismo, estas señales estarían restringidas a compartimentos específicos ya que SHH actuaría sobre el estroma o tejido circundante a los vasos sanguíneos (mesénquima) que al responder a la vía de señalización, expresarían y secretarían factores angiogénicos que actuarían sobre las células endoteliales promoviendo, de esta forma, la proliferación, migración y establecimiento de vasos durante el complejo proceso de la angiogénesis.

3.6. ¿Es SHH un regulador angiogénico que actúa en el estroma?

Existe controversia sobre la hipótesis de que SHH es un inductor de VEGF y ANGPT1 en el estroma, ya que se reportan evidencias contradictorias. En fibroblastos de la línea NIH3T3 se demostró que Shh induce un aumento en los niveles del transcrito de *Angpt1* pero sin cambios en el transcrito de *Vegf*. Como el efecto sobre *Angpt1* fue sensible al inhibidor *Cyc*, los resultados sugieren que Shh podría contribuir al crecimiento, maduración y estabilización de los vasos sanguíneos al regular *Angpt1* en forma celular-específico a través de la inducción génica en el estroma. Lo anterior, remarca la idea que los efectos de SHH sobre los factores angiogénicos mencionados no son genéricos al estroma, ya que

dependen del contexto celular en estudio (Lee, S. W. y col. 2007). En células de la línea MRC5 (células mesenquimales derivadas de pulmón embrionario) se observaron resultados similares, ya que SHH promovió la expresión de ANGPT1 pero no la de VEGF.

Según los antecedentes presentados hasta ahora, es evidente que hay discrepancias sobre la regulación de SHH sobre VEGF y ANGPT1, pero se sostiene que son blancos canónicos de la ruta de señalización de la vía. Sin embargo, no ha podido determinarse que existan sitios de unión a los factores GLI en las regiones regulatorias de ellos. El único trabajo en este sentido se contextualiza en cáncer y la regulación de VEGF.

En el año 2011, Cao y col., estudiaron la regulación de VEGF en líneas de cáncer de mama humano. Ellos indicaron la existencia de una forma truncada de GLI1, tGLI1, el cual carece de 123 pb que no alteran el marco de lectura y que se expresaría en cáncer de mama, algunos tipos de glioma mas no en tejido sano. tGLI1 se expresó de en una línea de cáncer mamario potenciando su motilidad e invasividad. Además, se potenció la expresión de genes relacionados con la metastásis: CD24, MMP-2, MMP-9 y VEGF. De hecho, los autores demuestran por ensayo ChIP y luciferasa que tGLI1 se une al promotor de VEGF mientras que GLI1 no lo hace. (Cao, X. y col. 2012). Lo que despierta la siguiente pregunta: ¿Es VEGF blanco de la vía canónica de SHH en condiciones no patológicas o en líneas celulares no inmortalizadas?

3.7. Señalización no canónica: SHH como factor angiogénico directo en células endoteliales

Evidencias recientes indican que la señalización de la vía ocurre a través de PTCH1 y SMO, pero la transducción de la señal no estimula la expresión de genes blanco, sino que se transduce a nivel de membrana a través de SMO, el cual se comporta como receptor asociado a proteína G (G_i) (Renault, M. A. y col. 2010; Chinchilla, P. y col. 2010; Polizio, A. H.



y col. 2011; Polizio, A. H. y col. 2011). Estas funciones se denominan como *señalización SHH no canónica* (Riobo, N. A. y col. 2006).

Este tipo de respuestas se caracterizan por ser rápidas (Bijlsma, M. F. y col. 2007; Sanchez-Camacho, C. y Bovolenta, P. 2009), e implica la transducción de la señal mediante la activación de vías de señalización como PI3K/Akt (Kanda, S. y col. 2003), cAMP/PKA (Sheng, T. y col. 2006), ERK1/2/PKC- δ (Riobo, N. A. y col. 2006) en células endoteliales y RhoA/ROCK (Polizio, A. H. y col. 2011; Polizio, A. H. y col. 2011; Renault, M. A. y col. 2010; Chinchilla, P. y col. 2010) tanto en células endoteliales como en fibroblastos. La activación de estas vías culmina en la modificación del citoesqueleto de las células endoteliales lo que permite la formación de estructuras tubulares y por ende, la angiogénesis.

Estos antecedentes indican que SHH es un factor angiogénico complejo ya que actuaría en 2 dimensiones celulares de forma particular: modulando el citoesqueleto en las mismas células endoteliales y promoviendo la expresión de factores angiogénicos en el estroma. Por ello es que resulta interesante comprender cómo ocurre la señalización en el nicho comprendido por las células endoteliales y los componentes del estroma, como las células mesenquimáticas (MSC).

4. MSC: ¿célula troncal mesenquimática o estromal?

Las células troncales mesenquimáticas o MSC (del inglés, *Mesenchymal Stem Cells*) son células multipotenciales de origen mesodérmico que se encuentran en el estroma de distintos tejidos del organismo, por ejemplo, médula ósea, grasa, líquido amniótico, endometrio, cordón umbilical, entre otros (Troyer, D. L. y Weiss, M. L. 2008). El rol fisiológico de las MSC es participar de la homeostasis tisular, permitiendo el recambio celular que ocurre normalmente en los tejidos, diferenciándose a otras células o secretando factores de crecimiento que permiten la regeneración de la zona mediante la atracción de

otras células progenitoras o estimulando a las residentes para la formación de nuevas estructuras, tales como vasos sanguíneos (Stappenbeck, T. S. y Miyoshi, H. 2009).

Las MSC se localizan en los nichos vasculares en el organismo, y se plantea que su ubicación tiene relación con su función fisiológica, por lo cual postulamos que son un buen modelo para estudiar el efecto del estroma sobre los vasos sanguíneos. Incluso recientemente se ha postulado que las MSC se comportarían como los pericitos, la célula mural vascular (Kolf, C. M. y col. 2007; Roubelakis, M. G. y col. 2013) (Figura 3).

Las MSC se consideran una población celular heterogénea y actualmente no existe un marcador específico que nos permita identificarlas, por lo cual la Sociedad Internacional de Terapia Celular (ISCT, *International Society of Cellular Therapy*) determinó los caracteres mínimos para ser definidas como tales: adherencia a la superficie de cultivo y morfología fibroblastoide. Además, son caracterizadas funcionalmente mediante su capacidad de diferenciación a linaje óseo, adiposo y condrogénico *in vitro* y a través de la expresión de marcadores moleculares de linaje mesenquimático (CD105, CD90, CD73, CD44, CD29 y STRO-1). Sumado a ello, las MSC no expresan marcadores propios del linaje hematopoyético (CD45, CD34, CD31) ni del linaje inmunológico (CD80, CD86, HLA-DR) (Dominici, M. y col. 2006; Tyndall, A. y Uccelli, A. 2009).

Originalmente las MSC se aislaron a partir de médula ósea, siendo caracterizadas como precursoras de tejido conectivo. Posteriormente, se han identificado en otros tejidos adultos, tales como tejido adiposo, pulpa dentaria, ligamento periodontal, placenta y cordón umbilical. Desde la perspectiva de uso de las MSC en terapia celular, resulta atractiva entonces la posibilidad de utilizar tejidos más accesibles que la médula ósea, ya que al ser obtenidas mediante una punción del hueso de la cadera, conlleva, una intervención dolorosa e invasiva (Kolf, C. M. y col. 2007). Es así que ha resultado de gran

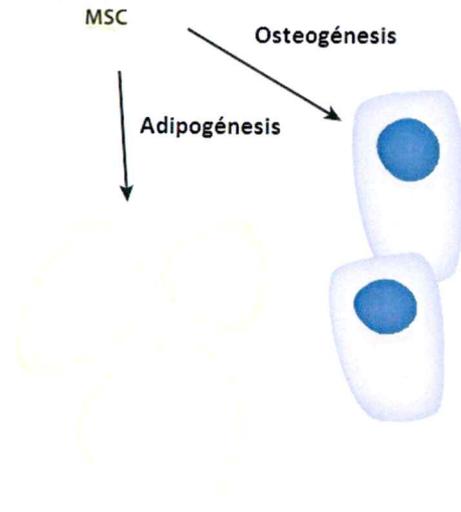
interés la descripción de MSC en tejidos abundantes y usualmente desechados, como el cordón umbilical.

5. MSC de la gelatina de Wharton del cordón umbilical (WJ-MSc)

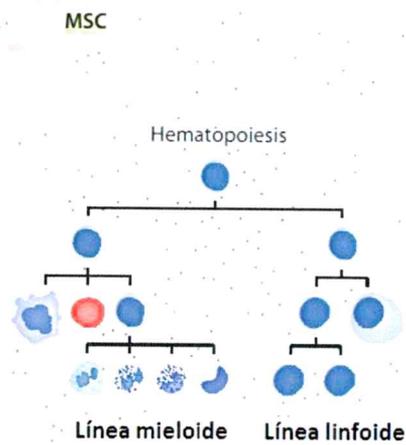
El cordón umbilical es una estructura que conecta a la madre con el feto en gestación y permite el intercambio de nutrientes y desechos a través de los vasos umbilicales, 2 arterias y una vena. Estos vasos se hallan inmersos en una sustancia gelatinosa denominada gelatina de Wharton (WJ, *Wharton's jelly*) y todas estas estructuras se encuentran rodeadas por la capa epitelial del amnios. Tanto los vasos como la gelatina de Wharton se generan a partir del mesoderma extraembrionario durante el desarrollo (Weiss, M. L. y col. 2006).

La gelatina de Wharton es rica en proteoglicanos (el más abundante es el heparán sulfato) y colágenos (tipo I, III, IV y VI). En esta matriz es donde se describió la presencia de un tipo celular con características mixtas entre un fibroblasto y una célula muscular: las WJ-MSc (*Mesenchymal Stem Cell* derivadas de la gelatina de Wharton) (Nanaev, A. K. y col. 1997). Se ha especulado que la WJ funcionaría como la adventicia (capa más externa de un vaso sanguíneo) de los vasos umbilicales, ya que estos vasos carecen de ella y además, la WJ participa en la regulación del flujo sanguíneo y previene la compresión de los vasos dentro del vientre materno (Nanaev, A. K. y col. 1997). Pero recientemente ha sido descrito que actúa como un rico reservorio de factores tróficos, muchos de efecto angiogénico (Sobolewski, K. y col. 2005). Las WJ-MSc secretan un variado conjunto de factores de crecimiento con potencial angiogénico. Así, cuando se comparó su perfil de expresión de moléculas angiogénicas con las BM-MSc se determinó un enriquecimiento de este tipo de moléculas en las aisladas desde el cordón umbilical (Hsieh, J. Y. y col. 2010; Hsieh, J. Y. y col. 2013).

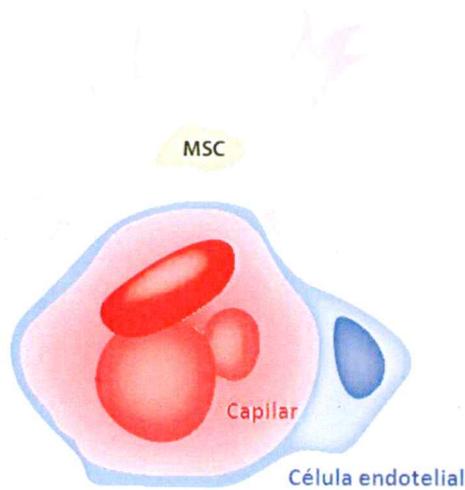
a) Diferenciación a linajes estromales



b) Secreción de factores solubles



c) Función como pericito



d) Mantenimiento de la matriz extracelular



Figura 3. Funciones de las MSC en la médula ósea y otros nichos.

(A) Las MSC pueden diferenciarse hacia linajes estromales, como adipogénico y osteogénico. (B) Las MSC secretan factores de crecimiento que actúan sobre células y tejidos circundantes. En la médula ósea, forman parte del nicho de la célula troncal hematopoyética. (C) Se propone que las MSC son similares a los pericitos y se localizan en el estroma vascular. (D) MSC mantienen la matriz extracelular, remodelándola y secretando parte de sus componentes, como ocurre en el cordón umbilical. (Tomado de Parekkadan, B. y Milwid, J. M. 2010).

Recientemente, se demostró la capacidad angiogénica de las WJ-MSc y de su secretoma (o medio condicionado, MC) *in vitro* e *in vivo* (Shohara, R. y col. 2012; Choi, M. y col. 2013; Arno, A. I. y col. 2014; Sabapathy, V. y col. 2014). En modelos de heridas crónicas, las WJ-MSc atraen macrófagos de efecto anti-inflamatorio a la zona de la herida y promueven la secreción de factores de efecto reparador de parte del animal, tales como ANGPT1, TGF β 1 y VEGF (Shohara, R. y col. 2012) y secretan factores *per se* (Edwards, S. S. y col. 2014).

Así, las WJ-MSc conforman una población estromal que circunda y soporta a los vasos umbilicales y se caracterizan por un secretoma preferentemente angiogénico, por lo cual las escogimos como modelo celular idóneo.

6. MSC, angiogénesis y soporte trófico

Las MSC, como células estromales mesenquimales, se encuentran en los lechos vasculares favoreciendo eventos de reparación tisular mediante la secreción de factores relacionados con angiogénesis, regeneración, migración celular e inmunomodulación. La vía de SHH/GLI participa en la regulación de la angiogénesis a través de mecanismos directos e indirectos y, éstos últimos, podrían guardar relación con la modulación que el estroma ejerce sobre las células endoteliales. Dado los antecedentes presentados en esta tesis doctoral se plantea estudiar el papel que juega la vía SHH/GLI en la modulación de las propiedades angiogénicas de WJ-MSc provenientes de cordón umbilical, específicamente, a través del estudio de dos factores angiogénicos clásicos: VEGF y ANGPT1 y consecuentemente su influencia en el lecho vascular. Así, los resultados obtenidos podrían extrapolarse hacia la comprensión general de la conversación que ocurre entre el estroma, las células endoteliales y los vasos sanguíneos y esclarecer acerca de la participación de la vía SHH/GLI en dicha comunicación (Figura 4).

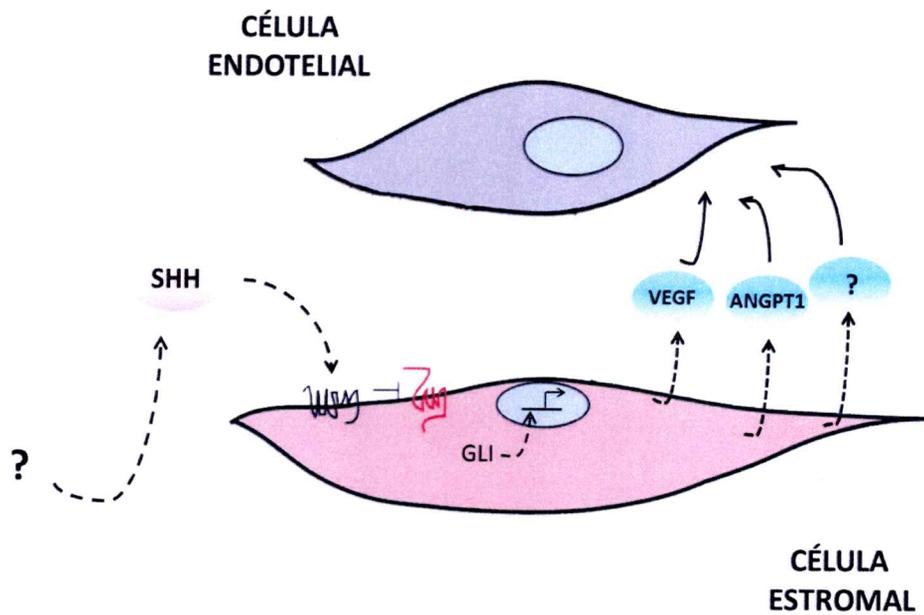


Figura 4. Modelo de la hipótesis.

En el cordón umbilical humano, las WJ-MSC (componente estromal) responden a SHH, que puede ser secretado o no por ellas, lo que induce la expresión y secreción de los factores angiogénicos VEGF y ANGPT1, entre otros. Dichos factores serían detectados por las células endoteliales (HUVEC), promoviendo el proceso de angiogénesis.

Hipótesis

La vía de señalización SHH/GLI estimula el potencial angiogénico de células troncales mesenquimáticas humanas obtenidas desde la gelatina de Wharton del cordón umbilical regulando la expresión de factores angiogénicos tales como VEGF y Angiopoietina 1.

Objetivo General

Evaluar la modulación que ejerce la vía de señalización SHH/GLI sobre la expresión de factores angiogénicos en WJ-MSC.

Objetivos Específicos

1. Caracterizar la población de WJ-MSC en términos de la expresión de componentes de la vía SHH/GLI.
2. Evaluar el efecto de los factores angiogénicos producidos por las WJ-MSC sobre el proceso de la angiogénesis *in vitro* y cómo éste puede ser modulado por la vía SHH/GLI.
3. Determinar el efecto de SHH/GLI sobre la expresión y secreción de factores angiogénicos en WJ-MSC *in vivo*.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Materiales

1.1. Cultivo Celular

- Medio DMEM, n° catálogo 12800-017, Life Technologies
- Medio M199, n° catálogo 31100-035, Life Technologies
- Penicilina/Estreptomicina (10.000 U/mL / 10.000 µg/mL), n° catálogo 15140-122, GIBCO
- Suero Bovino Fetal (SBF), n° catálogo 04-001-1A, Biological Industries
- Suero de ternera recién nacido (NBCS), n° catálogo 16010-159, Life Technologies
- Tripsina/EDTA 10X, n° catálogo 15400, Life Technologies
- L-Glutamina, n° catálogo G8540, Sigma
- Gelatina, n° catálogo 104070, Merck
- Colagenasa tipo 2, n° de catálogo 41h12762, Worthington
- Colagenasa tipo 1, n° de catálogo 17100-017, Life Technologies

- Medio de congelamiento, n° de catálogo 2X #ES-002-F, Chemicon International
- PBS 10X, n° de catálogo 46013CM, Corning
- Bicarbonato de sodio, n° catálogo 1063291000, Merck
- Azul de tripán 0.4%, n° catálogo 15250, Life Technologies

1.2. Líneas Celulares

- Saos-2, línea de osteosarcoma humano (ATCC: HTB-85)
- HEK293, línea de riñón embrionario humano (ATCC: CRL-1573)
- C3H10T1/2, células mesenquimáticas inmortalizadas de origen murino (ATCC: CCL-226)

1.3. Tratamientos farmacológicos

- Purmorfamina, n° catálogo 540220-5mg, Calbiochem
- Shh recombinante (Shh-N), n° de catálogo 461-SH-025, R&D
- Anticuerpo 5E1-c 9/27/12-363µg/ml Ig, Hybridoma Bank
- Ciclopamina (Cyc), n° catálogo APH-05011, Infinity

Tabla 1. Tratamientos farmacológicos utilizados para modular la vía de señalización SHH/GLI

| Tratamiento | Concentración stock | Preparación del stock | Concentración de uso |
|---------------------|---------------------|--------------------------|----------------------|
| Ciclopamina | 10 mM | Etanol 100% | 10 µM |
| Purmorfamina | 10 mM | DMSO | 10 µM |
| Shh-N | 100 µg/ml | PBS- Albúmina 0,3% | 3.3 µg/ml |
| 5E1 | 31 mg/ml | Sobrenadante (hibridoma) | 5 mg/ml |

1.4. Extracción de RNA y síntesis DNAc

- Kit de extracción de RNA EZNA Total RNA kit, n° catálogo R6834-02, Omega Biotek
- Random primers, n° catálogo O142, Thermo Scientific
- Ribolock, inhibidor de RNAsas, n° catálogo E00381, Thermo Scientific
- Revert Aid, enzima transcriptasa reversa, n° catálogo EP0441, Thermo Scientific
- DNAsa, n° catálogo ENO521, Fermentas
- RNAsa away, n° catálogo 10-228, Apex Bioreserch Products

1.5. RT-PCR y qPCR

- DNA polimerasa GoTaq, n° catálogo M82295, Promega
- Brilliant II SYBR Green qPCR Master Mix, n° catálogo ST.600828, Stratagene

Tabla 2. Partidores utilizados en RT-PCR y qPCR

| Gen | Partidor sentido | Partidor anti-sentido | Tm (°C) | Tamaño (pb) |
|---------------|------------------------|---------------------------|---------|-------------|
| <i>SMO</i> | GTTCTCCATCAAGAGCAAGCAG | CGATTCTTGATGTCACAGTCAGG | 60 | 258 |
| <i>PTCH1</i> | GGTGGAAGTTGGAGGACGAG | CGCTTCTGTGGTCAGGACATTAG | 60 | 136 |
| <i>SHH</i> | GAATTACAACCCCGACATCATA | CCTCGTAGTGCAGAGACTCCTC | 56 | 194 |
| <i>GLI1</i> | GGAGAAGCGTGAGCCTGAATC | TGGATGTGCTCGCTGTTGATG | 60 | 114 |
| <i>GLI2</i> | CACCGCTGCTCAAAGAGAA | TCTCCAGCCACTGTCATT | 60 | 228 |
| <i>GLI3</i> | CGAACAGATGTGAGCGAGAA | TTGATCAATGAGGCCCTCTC | 60 | 185 |
| <i>ANGPT1</i> | CAGGAGGATGGTGGTTTGATG | TGGTTTTGTCCCGCAGTATAG | 60 | 73 |
| <i>VEGF</i> | CTCTACCTCCACCATGCCAAG | AGACATCCATGAACTTCACCACTTC | 55 | 94 |
| <i>FGF2</i> | CTGGCTATGAAGGAAGATGG | TGCCCAGTTCGTTTCAGTG | 60 | 149 |
| <i>OCT4</i> | TCGAGAACCGAGTGAGAGGC | CACACTCGGACCACATCCTTC | 60 | 121 |
| <i>GAPDH</i> | TGCACCACCAACTGCTTAGC | GGCATGGACTGTGGTCATGAG | 60 | 87 |

Tabla 3. Condiciones de uso (concentración y eficiencia) de partidores utilizados en qPCR

| Gen | Tm (°C) | Concentración (nM) | Eficiencia (%) |
|---------------|---------|--------------------|----------------|
| <i>PTCH1</i> | 60 | 200 | 110 |
| <i>FGF2</i> | 60 | 200 | 107 |
| <i>VEGF</i> | 55 | 200 | 108 |
| <i>ANGPT1</i> | 55 | 400 | 115 |
| <i>OCT4</i> | 60 | 600 | 105 |
| <i>GAPDH</i> | 60 | 200 | 100 |

1.6. Western Blot

- Tampón de lisis celular: SDS 2%, glicerol 10%, Tris-HCl 5 mM, pH 6.8
- Inhibidor de Proteasas Halt TM Protease & Phosfatase Inhibitor Cocktail, n° catálogo 78440 Thermo Scientific
- Tampón de carga 6X: Tris-HCl 1M, pH 6.8, glicerol 3%, SDS 10%, azul de bromofenol 1.8×10^{-4} M, β -mercaptoetanol 0.7 M
- Tampón de corrida: Tris Base 25 mM, Glicina 0.19 M, SDS 0.1%
- Membrana de nitrocelulosa de 0.45 μ m de poro, n° catálogo 88018, Thermo Scientific
- Tampón de transferencia: Tris Base 48 mM, 39 mM, SDS 0.37%, metanol 20%
- Solución de bloqueo: leche descremada al 5% preparada en TBST
- Solución de lavado (TBST): TBS-Tween al 0.1%
- TBS: Tris-HCl 0.5 M, NaCl 1.5 M, pH 7.4
- Reactivo quimioluminiscente Pierce ECL Western Blotting Picomolar, n° catálogo 34077, Thermo Scientific

- Reactivo quimioluminiscente Pierce ECL Western Blotting Femtomolar, n° catálogo 34095, Thermo Scientific
- BSA, n° catálogo BM 0150, Winkler

1.7. Inmunofluorescencia

- Paraformaldehído (PFA) al 4%, Merck
- Solución PBS-Tritón X-100 al 0.1% (PBST)
- Solución de bloqueo: Suero de caballo preparado al 5% en PBST
- Gel de montaje: Gel/Mount, n° catálogo M01/V6, Biomed
- Medio de montaje FluoSave, n° catálogo 345789-20ML, Calbiochem

Tabla 4. Anticuerpos primarios utilizados en Western blot, IHC e inmunofluorescencia

| Anticuerpo 1° | Marca |
|---|----------------------------|
| VEGF | Ab46154, Abcam |
| PTCH1 | SC-9024, Santa Cruz |
| SHH | H-160, Santa Cruz |
| SHH | 5E1, Hybridoma Bank |
| STRO-1 | MAB1038, R&D |
| Colágeno IV | M3F7, Hybridoma Bank |
| β-actina | A5316, Sigma |
| Anticuerpo 2° | Marca |
| DyLigh 568 | 35510, Thermo Scientific |
| DyLigh 488 | 35552, Thermo Scientific |
| AlexaFluor 647 | A-21446, Life Technologies |
| Conjugado a peroxidasa (anti-conejo IgG) | SC 2004, Santa Cruz |
| Conjugado a peroxidasa (anti-ratón IgG) | SC 2005, Santa Cruz |
| Conjugado a peroxidasa (anti-cabra IgG) | SC 2768, Santa Cruz |
| Tinciones fluorescentes | Marca |
| Faloidina (TRITC) | P1951, Sigma |
| DAPI | D1306, Life Technologies |
| TO-PRO3 | T3605, Life Technologies |
| Otras tinciones | Marca |
| Nuclear fast red | N8002, Sigma |
| NBT | 11383213001, Roche |
| BCIP | 11383221001, Roche |
| Hematoxilina | 104302, Merck |
| Eosina | 1345, Merck |

1.8. Citometría de flujo

- Buffer tinción (PBS, 1% SFB)
- PFA 1%

Tabla 5. Anticuerpos utilizados para análisis de marcadores mediante citometría de flujo

| Anticuerpo | Isotipo | Numero de catálogo |
|-----------------------------------|-----------------|-------------------------|
| PE-Cy anti CD34 humano | Ratón, IgG1, κ | 560710, BD Pharmigen |
| FITC anti HLA DR-DP-DQ humano | Ratón, IgG2a, κ | 555558, BD Pharmigen |
| APC-H7 anti CD44 humano | Ratón, IgG2b, κ | 560183, BD Pharmigen |
| PerCP-Cy anti CD14 humano | Ratón, IgG2a, κ | 550787, BD Pharmigen |
| PE anti CD90 humano | Ratón, IgG1, κ | 12-0909, eBioscience |
| Alexa fluor 488 anti CD105 humano | Ratón, IgG1, κ | 323209, Biolegend |
| PE-Cy anti CD28 humano | Ratón, IgG1, κ | 559882, BD Pharmigen |
| APC anti CD73 humano | Ratón, IgG1, κ | 560847, BD Pharmigen |
| APC anti CD45 humano | Ratón, IgG1, κ | 555485, BD Pharmigen |
| Control isotipo PerCP-Cy ratón | Ratón, IgG2a, κ | 550927, BD Pharmigen |
| Control isotipo PE | Ratón, IgG1, κ | 12-4714-42, eBioscience |
| Control isotipo Alexa fluor 488 | Ratón, IgG1, κ | 400132, Labome |

1.9. Ensayos de angiogénesis

- Matrigel, Basement Membrane Matrix, n° de catálogo 354234, BD Bioscience
- Gelatina 1%, n° catálogo 104070, Merck
- Medio EBM (Endothelial Basal Medium) n° de catálogo CC-3121, Lonza
- Medio DMEM, n° catálogo 12800-017, Life Technologies
- VEGF recombinante n° catálogo PHC9391, Life Technologies
- FGF2 recombinante, n° catálogo F-170, Alomone Labs
- Medio EGM-2 (Endothelial Growth Medium-2, BulletKit EBM-2 plus SingleQuots of growth supplements) n° de catálogo CC-3162, Lonza (Suiza). Contiene: Para 10 ml:

SBF (200 µl) Hidrocortisona (4 µl), hFGF (40 µl), (VEGF 10 µl), RE-IGF-1 (10 µl), ácido ascórbico (10 µl), hEGF (10 µl), GA-100 (10 µl), heparina (10 µl).

1.10. Inmunohistoquímica (IHQ)

- Parafina, n° catálogo 111609, Merck
- Metanol 100%, n° catálogo 107018-2511, Merck
- NeoClear, n° catálogo 109843, Merck
- Solución citrato pH 3-3.3, n° catálogo H3300, Vector Biosystems
- Solución AB kit, Vectastain, n° catálogo PK6100, Vector Biosystems
- ImmPact DAB, n° catálogo SK4105, Vector Biosystems
- Medio de montaje Entellan, n° catálogo 107901, Merck

1.11. Equipos

- Centrífuga Z233MK, Hermle
- Centrífuga Rotofix 32, Hettich
- Centrífuga 5415R, Eppendorf
- Medidor de pH pH211, Hanna instruments
- Incubador con inyección de CO₂, Serie Forma II, Thermo Scientific
- Microscopio de contraste de fases AE200, Motic
- Microscopio confocal LSM 510, Zeiss

- Microscopio de epifluorescencia AxioVert 200M, Zeiss
- Balanza PT120, Sartorius
- Balanza analítica BP 121S, Sartorius
- Nanofotómetro, P-Class, Implen
- Agitador orbital Lab 7000, Díaz y García Electronics Ltda. Incubador de pollos "Circulated air Incubator" Modelo 1502, GQF Manufacturing Co.
- Lupa MZ124 con cámara integrada modelo IC80 HD, Leica
- Lector de absorbancia de placas de 96 pocillos, Sunrise™, Tecam
- Citómetro FACSCanto II, BD Biosciences
- Mr. Frosty, n° catálogo 5100-0001, Nalgene

1.12. Soluciones

- **MTT 10X:** 5 mg de MTT en PBS filtrado
- **Nuclear Fast Red:** Para 100 ml de solución, disolver 5 gramos de sulfato de amonio. A esta solución agregar 0.1 gramo de Nuclear Fast Red. Agitar lentamente, con temperatura ascendente hasta su ebullición. Hervir 5-10 minutos. Dejar enfriar y filtrar.
- **PBS:** NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na₂HPO₄ 4.3 mM, KH₂PO₄ 1.47 mM (pH= 7.4)
- **PFA 4%:** paraformaldehído en PBS, pH 7.4.
- **Solución Stop MTT:** SDS 10% en HCl 0.01 M en agua
- **Tampón Ensayo Fosfatasa alcalina (tampón AP):** Tris 100 mM (pH 9.5), NaCl 100 mM, MgCl₂ 50 mM, Tween 0.1%

- **Tampón de carga 6X:** Tris-HCL 0.25 M (pH= 6.8), SDS 8%, glicerol 40%, Bromofenol 0.2%, β -mercaptoetanol 20%
- **Tampón de corrida:** Tris-HCL 0.025 M (pH= 8.3), glicina 0.192 M, SDS 0.1%
- **Tampón de transferencia:** Tris-HCL 0.025 M (pH= 8.3), glicina 0.192 M, SDS 0.1%, metanol 20%
- **TBS 10X:** NaCl 1.4 M, KCl 26 mM, Tris 246 mM
- **TBST-0.1%:** Tween 0.1% en TBS 1X

2. Métodos

2.1. Obtención de muestras de cordón umbilical humano

Las muestras de cordón umbilical se obtuvieron a través de la empresa VidaCel, cuyo personal tomó las muestras previa firma de un consentimiento informado otorgado por las madres. Dicho consentimiento está asociado al uso de estas muestras en el contexto del proyecto FONDEF D09I1047, que lleva por título “Desarrollar Tecnologías para la obtención y potencial uso de células troncales mesenquimáticas desde gelatina de Wharton para el tratamiento de lesiones vasculares causadas por isquemia crónica de las extremidades”. El uso de muestras de cordones umbilicales fue aprobado por el Comité de Ética de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile y por el Comité Asesor de Bioética de FONDEF. Las muestras provinieron de madres sanas y embarazos normales y de término.

Luego del parto, las muestras fueron almacenadas en un frasco estéril con DMEM a 4°C hasta la entrega a nuestro laboratorio. Las muestras fueron procesadas para obtener cultivos de WJ-MSC dentro de 24 horas posterior al parto y utilizadas para cultivos de HUVEC dentro de 24-48 horas posterior al parto. Si el tiempo transcurrido fue mayor entre la toma de la muestra y la llegada de ella al laboratorio, las muestras no fueron utilizadas.

2.2. Generación de cultivos de WJ-MSC a partir de cordón umbilical

Una vez en el laboratorio, el cordón fue pesado y según este dato se calcularon las condiciones de digestión. Luego, bajo campana de flujo laminar, el cordón se depositó en una placa estéril de 15 mm de diámetro con PBS estéril y fue cortado con bisturí en trozos de 2-3 cm, cada trozo fue cortado en su eje longitudinal para exponer los vasos umbilicales, que fueron retirados con pinzas y posteriormente eliminados. El tejido restante, la WJ, se cortó con bisturí en trozos más pequeños, de 0.5 mm de diámetro, los que fueron incubados en colagenasa tipo 1 preparada en PBS a una concentración final de 1 mg/ml (0.1%). La digestión se realizó a 37°C en agitación orbital moderada por 15-17 horas (para 25-30 gramos de tejido, se utilizaron 0.025 gr de colagenasa tipo 1 en 25 ml de PBS). Luego del proceso de digestión, se obtuvo una suspensión gelatinosa que fue filtrada con gasa estéril para eliminar trozos de tejido sin digerir. Posteriormente, el filtrado fue diluido 5 veces con PBS estéril y se separó en tubos cónicos de 50 ml (10 ml por cada tubo). Luego se centrifugó a 1200 rpm por 10 minutos y se eliminó el sobrenadante. El pellet celular fue resuspendido en 50 ml de PBS para lavarlo y se volvió a centrifugar en las mismas condiciones. En este punto, cada pellet se resuspendió en 10 ml de PBS y se colectaron todos en 1 tubo cónico de 50 ml. Se centrifugó y el pellet se resuspendió en 5 ml de DMEM 10% SFB. Luego, se tomaron 10 μ L que se mezclaron con 10 μ L de azul de tripán 0.1% para realizar un conteo celular en hemocitómetro. Finalmente, las células fueron sembradas en DMEM/10% SFB/0.1% penicilina/estreptomicina en placas de 100 mm a una densidad de $1-2 \times 10^6$ células/placa y se mantuvieron en incubador con inyección de 5% CO₂ a 37°C. Cuando las células llegaron a un 80-90% de confluencia, fueron subcultivadas hasta 2 veces para luego ser congeladas.

Todos los experimentos fueron realizados con células descongeladas en subcultivos 3-6 usando muestras de al menos 3 donantes distintos.

2.3 Determinación del tiempo de duplicación poblacional

Se realizaron curvas de crecimiento para determinar tiempo de duplicación poblacional de diferentes cultivos de WJ-MSC, para lo cual se sembraron a una densidad de 2×10^4 céls/pocillo en placas de 12 pozos en medio completo y en triplicado. Luego de 24, 48 y 72 horas, las células fueron tripsinizadas y contadas en cámara de Neubauer. Para determinar el tiempo de duplicación poblacional, se consideraron los valores cuantificados para las 24 y 48 horas post-siembra y se utilizó la expresión $[(\text{horas de cultivo} \times \ln 2) / (\ln N_2/N_1)]$ donde \ln es el logaritmo natural de N_1 y N_2 (N_1 , es el número de células luego de 24 horas post-siembra y N_2 es el número luego de 48 horas) (Shohara, R. y col. 2012).

2.4. Aislamiento de HUVEC

En campana de flujo laminar, se mide la longitud del cordón y se limpia con papel humedecido en etanol 70%. La vena fue canulada para permitir el flujo de las soluciones a utilizar. Para eliminar restos de sangre y coágulos de la vena, se lavó con 10 ml de PBS 1X tibio mediante inyección con una jeringa de 10 ml. Las HUVEC se aislaron por digestión con colagenasa tipo 2 (0.2 mg/mL) en M199 por 15 minutos a 37°C. Luego se masajéó el cordón para soltar aquellas células aún unidas a la vena y se rescataron con M199. Esta suspensión celular fue centrifugada a 2000 rpm por 10 minutos, a temperatura ambiente y el pellet fue sembrado en placa de 100 mm pre-tratadas con gelatina 1%, en medio de crecimiento endotelial (medio M199 suplementado con 10% NBCS, 10% SFB, 3.2 mM de L-glutamina y 0.1% de penicilina/estreptomicina). Posteriormente fueron cultivadas a 37°C con inyección de 5% de CO₂ hasta confluencia, con cambio de medio cada 48 horas. Los experimentos fueron realizados hasta subcultivo 6.



2.5. Citometría de flujo

Las WJ-MSC fueron tripsinizadas y fueron resuspendidas en buffer de tinción (PBS, 1% SFB) y se incubaron con el anticuerpo asociado a fluoróforo por 20 minutos en un volumen final de 100 μ l, que contuvo entre 100.000 y 400.000 células, los anticuerpos utilizados se listan en la Tabla 5. Finalmente, las células fueron fijadas en PFA 1% y posteriormente fueron analizadas en el equipo FACSCanto II (BD Biosciences). Los análisis se realizaron usando el software FlowJo (Seminario de Título Samuel Martínez).

2.6. Ensayos de diferenciación

Las células fueron sembradas en DMEM 10% SFB, al alcanzar el 90% de confluencia fueron estimuladas con medios de diferenciación a linaje osteogénico (dexametasona 0.01 mM (100X), β -Glicerofosfato al 0.2% en PBS (100X), ácido ascórbico al 0.5% en PBS (100X)) o adipogénico (dexametasona 0.1 mM (100X), isobutilmetilxantina 10mg/ml en etanol (100X), indometacina 100 mM, insulina (100 Unidades) 3ul/ml) por 15 días. Cultivos control se crecieron por el mismo tiempo en medio DMEM 1% SFB. Luego de 15 días, los cultivos fueron fijados y teñidos con tinciones linaje-específicas.

2.7. Determinación de la diferenciación osteogénica (tinción con Alizarin Red S)

Se eliminó el medio de diferenciación y las células fueron lavadas con PBS. A continuación fueron fijadas en etanol-formaldehído (9 ml etanol y 1 ml de formaldehído 37%) por 30 segundos. Luego de lavar la solución de fijación con PBS, se agregó Alizarin Red S 40 mM en NaH_2PO_4 0.1 M, pH 4.3 (0.041 g/ml) y se incubó por 10 minutos a temperatura ambiente. Luego se eliminó la tinción y se lavó repetidas veces con agua destilada. Se mantuvo en PBS temperatura ambiente hasta su observación en el microscopio, donde se evaluó el depósito de cristales de calcio en color rojo.

2.8. Determinación de la diferenciación adipogénica (tinción con Oil Red O)

Se eliminó el medio de diferenciación y las células fueron lavadas con PBS. A continuación fueron fijadas en formaldehído 3.7%. Luego de múltiples lavados con PBS, se les agregó Oil Red O (0.2% en isopropanol) por 15-30 minutos a temperatura ambiente en agitación suave. Se lavó con agua destilada y se observaron al microscopio gotas de lípidos de color rojo dentro del citoplasma.

2.9. Tratamientos farmacológicos

Las células fueron expandidas hasta el 80% de confluencia en medio completo. En este punto, se eliminó el suero y se agregaron los tratamientos farmacológicos en DMEM sin suero y 0.1% de antibióticos por 48 horas (Tabla 1). Luego, se conservó el sobrenadante a -80 °C o se extrajeron RNA o proteínas.

2.10. Determinación de la actividad metabólica mediante ensayo MTT

Las células fueron sembradas en medio completo a una densidad de 1×10^4 céls/pocillo en placas de 24 pozos. Luego de 24 horas, se elimina el medio y se lavaron con PBS tibio. Posteriormente, se evaluó el efecto de las condiciones experimentales farmacológicas sobre la actividad metabólica de las WJ-MSc, para lo cual, las células fueron tratadas con 500 µl de DMEM, DMEM + 5E1 5 µg/ml, DMEM + Pur 10 µM, en 0% y 10% de suero, por 24 y 48 horas.

16 horas antes del fin de los estímulos, se agregaron 50 µl del reactivo MTT 10X a cada pocillo. Posterior a las 2 horas de incubación con el reactivo MTT, se detuvo la reacción agregando 500 µl de "Solución Stop" a cada pocillo y se incubaron las placas en las mismas condiciones de cultivo por 16-18 horas. La "Solución Stop" permitió la disolución del precipitado de formazán generado por la actividad metabólica mitocondrial, el cual fue

cuantificado. Para esto, se tomaron 200 μ l de cada condición y la actividad metabólica se determinó midiendo la absorbancia a 560 nm usando un espectrofotómetro (Sunrise™, Tecam) y usando como blanco la mezcla del medio, MTT y la “Solución Stop” en un pocillo sin células.

2.11. Extracción de RNA

Se extrajo RNA desde WJ-MSC sembradas en placas de 60 mm. Cuando las células llegaron a un 80-90% de confluencia o luego del tratamiento farmacológico correspondiente, se extrajo RNA según las instrucciones del kit Omega Biotek. Para esto, se eliminó el medio de cultivo y se lavaron con PBS. Luego, en condiciones libres de RNAsas, se agregó buffer de lisis (350 μ l para placas de 60 mm) y se homogeneizó con la punta de la pipeta. El lisado se recuperó en un tubo de 1.5 ml y se congeló a -20°C hasta la extracción de RNA. Para la extracción, las muestras fueron descongeladas y se extrajo RNA mediante columnas de afinidad. Las muestras fueron eluidas en 35 μ l de agua DEPC pre-calentada a 65°C. El RNA fue cuantificado en nanofotómetro (Nanophotometer® P-Class, Implem).

2.12. Síntesis de DNAc

Se realizó un tratamiento con DNasa al RNA a fin de eliminar cualquier traza de DNA genómico remanente de la extracción. La reacción se realizó utilizando 2 μ g de RNA, 1U de DNasa I (Promega), Buffer DNasa I 1X (Promega) y agua libre de nucleasas en un volumen final de 10-20 μ l según la concentración de la muestra de RNA. La mezcla fue incubada durante 30 minutos a 37°C. La reacción se detuvo agregando 1 μ l de DNasa *stop solution* e incubando a 65°C por 10 minutos.

El DNAc se generó a partir de la muestra tratada con DNasa y una reacción de retro-transcripción. Para esto se utilizó la enzima RT Minus (200U/ μ l, Thermo), Random primers

(Promega) a una concentración final de 0.2 μg por reacción y 2 mM de dNTPs. La reacción se realizó con 2 μg de RNA con 0.5 U/ μL de enzima inhibidora de RNAsas (Thermos) para eliminar cualquier RNAsa remanente o contaminante. La mezcla se mantuvo a temperatura ambiente por 10 minutos y luego se incubó a 42°C por 1 hora. Para inactivar la retrotranscriptasa, la mezcla se incubó a 70°C por 10 minutos. Luego, las muestras fueron diluidas hasta un volumen final de 100 μL . El DNAc se mantuvo a -20°C hasta posterior su uso.

2.13. PCR cuantitativo (qPCR)

Los partidores fueron diseñados para ser utilizados en qPCR de forma tal que los tamaños de los fragmentos amplificados tuviesen un tamaño entre 70 y 200 pb. Además, fueron diseñados para amplificar exones distintos con el fin de obtener fragmentos que, según el tamaño den cuenta de la amplificación del DNAc y no del DNA genómico, el cual pudiese estar presente como posible contaminante.

Para cada par de partidores se le realizó una curva de *melting* y de eficiencia, con el fin de determinar la amplificación de un fragmento único a alta eficiencia, respectivamente. Trabajamos con eficiencias entre 95 y 110%, los valores se detallan en la Tabla 3.

Se realizaron los tratamientos farmacológicos y se extrajo RNA de cada condición y se generó DNAc. Se utilizó *GAPDH* como control normalizador y cada muestra fue amplificada por triplicado. Se obtuvieron los valores de Ct de cada punto, tanto para el gen normalizador como para los genes investigados en esta tesis. Se usó el equipo 3000X Stratagene y el programa MxPro para el análisis de los datos. Se determinó la tasa de cambio en la expresión de los genes utilizando la expresión de $\Delta\Delta\text{Ct}$ (Bustin, S. A. y col. 2005; Pfaffl, M. W. 2010).

Finalmente, se grafican las tasas de cambio de expresión génica, correspondiendo el número 1 al nivel basal de expresión.

$$2^{(\Delta Ct \text{ variable} - \Delta Ct \text{ Control})} = \text{veces de cambio}$$

ΔCt variable: Ct gen x – Ct GAPDH (en tratamiento farmacológico)

ΔCt control: Ct gen x – Ct GAPDH (en vehículo de tratamiento farmacológico)

La reacción se realizó utilizando Input: 1-5 μ l, Supermix 10 μ l, partidor sentido y anti-sentido 200-600 nM, H₂O para completar 20 μ l de reacción. Las condiciones de uso de cada par de partidores se listan en las Tabla 2 y 3.

2.14. Extracción de proteínas

Células sembradas en placas de 60 o 100 mm fueron lisadas con tampón de lisis suplementado con inhibidor de proteasas (Roche) utilizando 100 y 300 μ l respectivamente, se arrastró todo el lisado con un *cell scraper* y se agregó a un tubo de 1.5 ml en frío, sobre hielo. Se homogeneizaron con jeringa tuberculina (10 veces) y se centrifugaron a 10.000 rpm en centrífuga (Hettich Rotofix 32) por 5 minutos a 4°C. Se rescató el sobrenadante y se congelaron a -80°C hasta su uso, además de almacenó una alícuota de 10 μ l para cuantificación.

2.15. Cuantificación de proteínas

Las muestras se cuantificaron usando el sistema comercial Bio-Rad DC Protein Assay, siguiendo las indicaciones del fabricante, usando BSA como proteína estándar para la curva de calibración. La absorbancia de las muestras fue leída en un lector de placas a 595 nm (Sunrise™, Tecam).

2.16. Western blot

Las muestras provenientes del -80°C se descongelaron en hielo y se tomó el volumen necesario para cargar entre 10-50 μg de proteínas por carril (10 μg para VEGF y β -actina; 50 μg para PTCH1 y SHH). Se agregó buffer de carga 6X y se calentaron por 5 minutos a 95°C . Las muestras se cargaron en geles de acrilamida/bisacrilamida (al 12% para VEGF, SHH y β -actina y al 8% para PTCH1). La electroforesis se realizó en tampón de corrida en voltaje constante de 70 V por 15 minutos y luego a 100 V durante 90-120 minutos. Posteriormente, las muestras fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa de 0.45 μm de poro en tampón de transferencia durante 15-60 minutos en sistema de transferencia semi-seca Transblot (Biorad). Para evaluar el paso de las proteínas hacia la membrana, ésta se tiñó por 5 minutos con el colorante Rojo Ponceau y luego se lavó con TBS-T.

Las membranas fueron bloqueadas en 5% leche en TBS-T, en agitación constante a temperatura ambiente (1 hora para VEGF y β -actina y 3 horas para PTCH1). Posteriormente, las membranas fueron incubadas con el anticuerpo 1° preparado en 5% leche en TBS-T toda la noche, en agitación constante a 4°C (condiciones en Tabla 4). Las membranas fueron lavadas con TBS-T, 3 veces X 10 minutos en agitación para luego incubar con los anticuerpos 2° acoplados a HRP anti-cabra, ratón o conejo (1:5000) durante 1 hora a temperatura ambiente en 5% leche TBS-T. Finalmente, la membrana se lavó tres veces durante 10 minutos en solución de lavado y se reveló con el reactivo quimioluminiscente (Pierce). Luego, la reacción de HRP fue revelada usando filmes fotográficos (Fuji Film) en el equipo Curix 60 (AGFA) y las bandas detectadas fueron cuantificadas con el software Image J.

El Western blot para SHH utilizando el anticuerpo 5E1 se realizó con algunas modificaciones según (Kucerova, R. y col. 2012).

2.19. Inmunofluorescencia de WJ-MSC en monocapa

Se sembraron WJ-MSC en placas de 24 pocillos a una densidad de 10.000 céls/pocillo. Luego de 24 horas, se eliminó el medio de cultivo y se lavaron con PBS, 3 veces a temperatura ambiente. A continuación fueron fijadas en PFA 4% por 20 minutos a temperatura ambiente, se eliminó el PFA y se lavaron con PBS, 3 veces. Las células fueron permeabilizadas y bloqueadas usando 5% BSA preparada en TBS-T 0.1% por una hora a temperatura ambiente. Posteriormente, se realizó la incubación con el anticuerpo 1° (anti-SHH y PTCH1 1/50, anti-VEGF 1/1000) preparado en 5% BSA en cámara húmeda por 12-14 horas a 4°C (detalles en Tabla 4). Luego los cubre-objetos fueron lavados con PBS, 3 veces para incubar las células con el anticuerpo 2° correspondiente (1/500). Además se utilizó faloidina para teñir los filamentos de actina polimerizados (1/5000). Luego de una hora a temperatura ambiente, se lavan con PBS, 3 veces y se realizó una incubación final de 5 minutos con DAPI (10 µg/ml en PBS) para teñir los núcleos

Finalmente, los cubre-objetos se lavaron con PBS y una vez con agua destilada y los fueron fijados con medio de montaje Fluorsave en portaobjetos de vidrio. Una vez secas, las muestras fueron visualizadas usando un microscopio de epifluorescencia AxioVert 200M (Carl Zeiss).

Para muestras a analizar por microscopía confocal, las condiciones experimentales fueron similares, con excepción de la tinción nuclear utilizada, en lugar de DAPI se utilizó TO-PRO3 (1/300) incubado junto el anticuerpo 2°, y fueron montadas de igual forma. Se observaron en el microscopio confocal Zeiss LSM 510 y fueron analizadas usando el programa LSM Image Browser.

2.20. Inmunohistoquímica (IHQ) de cordón umbilical

El cordón umbilical fue trozado para generar fragmentos de de 1-3 cm de largo, los cuales fueron lavados con PBS frío y fijados en PFA 4% por 18 a 24 hrs. A continuación, los trozos fueron lavados con PBS, 3 veces durante períodos de 10 minutos para retirar el exceso de PFA. Luego, el tejido fue sometido a deshidratación en un gradiente de alcoholes durante 30 minutos. Una vez deshidratado, el tejido fue tratado con aclarador NeoClear (Merck) durante 2 horas, recambiándolo a la hora. Finalmente, para preparar el tejido a ser embebido, los trozos de cordón fueron tratados con parafina durante 3 horas, siendo recambiada ésta cada hora. Finalmente fueron dejadas en parafina toda la noche en estufa a 60°C. Una vez listos, las muestras fueron embebidas en tacos de parafina, para que al día siguiente fueran cortadas con micrótomo en secciones de 15 a 20 µm de espesor y montados en placas xilanizadas. Para realizar la tinción, los cortes fueron desparafinados, sometiéndolos a 60°C durante 20 minutos, posteriormente fueron lavadas con xilol y se les sometió a un gradiente descendiente de alcoholes.

Con los cortes desparafinados, se realizó una incubación con solución citrato pH 3-3.5 para desenmascarar el antígeno durante 30 min a 80°C, seguido de la eliminación de la peroxidasa endógena utilizando la solución: 3% H₂O₂, 50% metanol en PBS. Luego, se realizaron sucesivos lavados con PBS.

Para comenzar con el proceso de tinción, las muestras fueron bloqueadas con una solución de suero de caballo al 5% en PBS durante 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente, se incubó en el anticuerpo 1° diluido en solución de bloqueo durante toda la noche a 4°C. Después de la incubación con anticuerpo 2°, se lavó con PBS y posteriormente, se incubó en solución AB durante 30 minutos a temperatura ambiente, seguido de un último lavado antes del revelado. El proceso de revelado se realizó

incubando con la solución de DAB en su diluyente. Luego se realizó una contra-tinción con hematoxilina por 45 segundos. Posteriormente, las muestras fueron deshidratadas, lavando en concentraciones crecientes de etanol a partir de agua, luego, se lavó con xilol 3 veces, para luego montar con Entellan. Las muestras fueron observadas en microscopio óptico Olympus BX51 y fotografiadas con los objetivos de 10 y 20X.

2.21. Obtención del sobrenadante celular (medio condicionado) de WJ-MSC

Las células fueron sembradas en medio completo. Cuando llegaron a un 80% de confluencia, se eliminó el medio y se lavaron con PBS. Luego se agregó DMEM 0% SFB (3 ml para placa de 60 mm y 7 ml para placa 100 mm) y se incubaron por 48 horas. Luego se recuperó el medio, y se generaron alícuotas que fueron congeladas en nitrógeno líquido y posteriormente almacenados a -80°C hasta su utilización.

2.22. Determinación de factores angiogénicos (*Proteome profiler array*)

Se determinó el contenido de factores angiogénicos en el sobrenadante (o MC, medio condicionado) de las WJ-MSC siguiendo las instrucciones del kit *Proteome profiler array* (n° catálogo # ARY007, R&D Systems). Brevemente, se descongeló el sobrenadante y se incubó por una hora con el cocktail de anticuerpos primarios, en agitación constante a temperatura ambiente, mientras se bloquea la membrana en paralelo. Luego, se eliminó la solución de bloqueo y se agregó a la membrana el sobrenadante pre-incubado que fue dejado por 12-14 horas en agitación constante a 4°C. Posteriormente, la membrana fue lavada en tampón de lavado y se incubó con los anticuerpos 2°. Luego de 3 lavados, las membranas fueron reveladas utilizando el reactivo quimioluminiscente del kit y filmes fotográficos en el equipo Curix 60 (AGFA).

Para cuantificar la expresión de los factores, se usó el programa ImageJ y mediante la herramienta “*Integrated density*” se determinó la intensidad de píxeles de cada punto, incluyendo los puntos de control interno considerando un área única para todos los puntos. La intensidad de píxeles de cada punto fue normalizada con respecto al valor de la intensidad de los puntos internos considerados como controles y fueron graficados.

2.23. Ensayo de angiogénesis *in vitro* (formación de túbulos en HUVEC)

Se utilizaron HUVEC en subcultivos 1-6. Para preparar el ensayo, la noche anterior, se dejaron una placa de 96 pocillos, puntas de 200 µl y Matrigel a 4°C para trabajar en frío, ya que el Matrigel gelifica rápidamente a temperatura ambiente. Al día siguiente, todos los materiales se pusieron en hielo y se preparó el ensayo, para lo cual, se tomó una punta amarilla a la cual se le corta un extremo para facilitar la toma del Matrigel (que es denso) y se agregaron 50 µl a cada pocillo y las burbujas remanentes fueron eliminadas con una aguja caliente. El Matrigel se dejó gelificando a 37°C por una hora. En el intertanto, las HUVEC se trataron con tripsina 1X por 5 minutos a 37°C, transcurrido ese tiempo, las células se recuperaron con medio endotelial completo y se centrifugaron a 2000 rpm por 5 minutos. Posteriormente, el pellet se resuspendió en PBS tibio y se cuantificó el número de células en hemocitómetro. Por cada pocillo del ensayo fueron sembradas 40.000 células, que se dejaron en un tubo de 1.5 ml para cada condición experimental. Luego, repetimos la centrifugación para resuspender el pellet en el medio correspondiente: EGM-2 (control positivo), Control negativo (DMEM), sobrenadante, sobrenadante + Pur, etc. Cada condición experimental se realizó por triplicado (3 pocillos por condición). Posterior a 3-4 horas se evaluó el establecimiento de puntos de ramificación y la formación de túbulos. Cada pocillo fue fotografiado en 5 campos representativos utilizando un microscopio de contraste de fases en un aumento de 10X y su cámara integrada (Motic). Para cuantificar el

resultado se contabilizaron el número de ramificaciones y de túbulos por cada fotografía usando el programa Image J.

Otros controles positivos utilizados fueron: FGF2 (20 ng/ml), VEGF (40 ng/ml) y N-SHH (3.3 µg/ml) en medio basal EBM-2.

2.24. Ensayo de angiogénesis *in vivo* en la CAM de embrión de pollo

Los embriones de pollo se obtuvieron de la Avícola Chorombo (Don Pollo, Pirque, Santiago) en el mismo día de la postura del huevo, el cual fue considerado como día embrionario 0 (E0). Una vez en el laboratorio, los huevos se almacenaron a 5°C (hasta 2 semanas), lo que permitió mantener detenido el desarrollo hasta su uso. Antes de comenzar un ensayo, los huevos se extrajeron desde su lugar de mantención a 5°C y se limpiaron con etanol 70%, quitando cualquier remanente de alcohol ya que puede resultar nocivo para la viabilidad del embrión. Luego se les permitió aclimatarse a temperatura ambiente por 1 hora. Posteriormente, los embriones se ingresaron a un incubador a 38°C, 76% humedad y con agitación periódica cada 30 minutos (GQF Manufacturing Co. Modelo 1502), esto equivale al día 0 de experimentación. Luego de 3 días (E3), se extrajeron 3 ml de albúmina del huevo para permitir que el volumen al interior del huevo disminuyera, de esta forma se impide que el embrión permanezca en contacto directo con la membrana tectácea (membrana subyacente de la cáscara) al momento de abrir el huevo. Para ello a cada huevo se le realizó una punción en su base con un punzón metálico para romper la cáscara. Por el orificio se introdujo una jeringa de 10 ml y se extrajeron 3 ml de albúmina, luego el huevo fue sellado con cinta adhesiva para volver al incubador. Luego de 24 horas (E4), los huevos fueron abiertos para exponer al embrión y su CAM. Para esto se tomaron los huevos y se extrajo un segmento de la cáscara desde la parte superior con una hoja de gillet afilada. Para impedir posibles contaminaciones, se agregaron 250 µL de una mezcla de

penicilina/estreptomicina/fungizona (0.1 %) sobre la CAM y luego se selló con cinta adhesiva para volver a ser incubado, ahora sin agitación. En E8, se prepararon los estímulos usando cubre-objetos redondos estériles (12 mm de diámetro), poniendo 10 μ L de sobrenadante de las condiciones experimentales en el centro de cada cubre-objeto los que se dejaron secar en la campana de flujo laminar por una hora. Se usó como control negativo DMEM sin condicionar y como control positivo FGF2 (50 μ g en 10 μ l). Cuando los cubre-objetos y los estímulos estuvieron secos, se abrió la ventana de cada huevo y se instaló el cubre-objeto con la gota seca contactando a la CAM. Una vez instalado el estímulo, se tomó una fotografía de la red vascular cubierta por el cubre-objeto como tiempo inicial ($t= 0$) para evaluar el cambio transcurrido luego del tratamiento. Posterior a eso el huevo se selló inmediatamente con cinta adhesiva y se incubó en condiciones normales sin agitación. Pasados 4 días (E12, $t= 4$), se abrieron los huevos y se volvió a fotografiar la zona cubierta por el cubre-objeto. Las fotografías fueron tomadas con la cámara HD IC80 (Leica) acoplada a la lupa MZ124 (Leica). Finalmente, se procedió a la cuantificación del efecto angiogénico inducido por los estímulos en la CAM del embrión.

2.25. Cuantificación del ensayo CAM

Usando programas de edición de imágenes (ImageJ y Photoshop), en cada fotografía se estableció una circunferencia de 4 mm de diámetro concéntrico con el centro del cubre-objeto en la fotografía del huevo en $t= 0$ y en la fotografía en $t= 4$. Se cuantificaron los vasos sanguíneos que cruzaron dicha circunferencia y se le adjudicó un puntaje a cada vaso según el ángulo que se forma entre el punto con que cruzan la circunferencia y el centro del estímulo. Si el ángulo fue entre 0° y 25° , se otorgó un puntaje= 2, si el ángulo fue entre 25° y 45° , el puntaje fue de 1 y ángulos mayores a 45° se dio puntaje= 0. Sumando todos los puntajes de todos los vasos, por cada fotografía se obtuvo un puntaje total. Así, se obtuvo

un parámetro de angiogénesis para $t= 0$ y $t= 4$, y para obtener el valor de angiogénesis, se restó (puntaje día 4) – (puntaje día 0) para cada embrión y condición experimental. Estos valores fueron calculados por cada huevo y fueron graficados.

2.26. Ensayo reportero de actividad fosfatasa alcalina (FA)

Se utilizó la línea celular de origen murino C3H10T1/2 ya que se diferencia al linaje osteogénico en respuesta a SHH, por lo cual a través de su diferenciación, reporta la presencia del ligando. En este ensayo se determinó la presencia de SHH en el sobrenadante de las WJ-MSK.

Las C3H10T1/2 fueron sembradas en DMEM 10% SFB en placas de 24 pocillos sobre cobre-objetos redondos de 12 mm de diámetro a una densidad de 10.000 céls/pocillo. Luego de 24 horas, se les disminuyó el suero a 0.5% SFB, condiciones mínimas de suero ya que éste posee componentes que podrían inducir la diferenciación de las células, además, la ausencia de suero deja a las células ávidas por más factores lo que les hace más propensas a responder a los factores agregados durante el ensayo de diferenciación (experimentos previos han demostrado que las C3H10T1/2 entran en apoptosis en carencia de suero, por lo cual se estimó que 0.5% era la mínima cantidad para mantenerlas viables, Tesis Magíster Pablo Lois, VP lab).

En paralelo a la siembra y al crecimiento de las C3H10T1/2, se prepararon los sobrenadantes (MC) de las WJ-MSK, que fueron utilizados frescos y sin congelar. Para ello, se generaron de forma sincronizada los MC en las mismas condiciones, por 48 horas.

Al momento del ensayo, se recuperó el sobrenadante (o MC) de las WJ-MSK y fue centrifugado a 2000 rpm para eliminar restos de debris celular y se mantuvo a 37°C para realizar los estímulos:

- MC
- MC con anticuerpo bloqueante: al MC se le agregó 5E1 o 5E1d (anticuerpo denaturado a 95°C) como control (5 µg/ml), esto se mantuvo a 37°C en agitación suave por 45 minutos. Luego fueron aplicados a las células reporteras.
- MC con Cyc: se agrega Cyc 10 µM a aquellos pocillos de C3H10T1/2 en que se estudiará el efecto de este inhibidor sobre el proceso de diferenciación, se mantuvo a 37°C dentro del incubador por 45 minutos. Y luego de agregó MC más Cyc.

Luego las placas se mantuvieron por 48 horas a 37°C. Transcurridas 48 horas, se eliminó el medio y se lavaron con PBS para ser fijadas con PFA 4% por 20 minutos. Luego se eliminó el PFA y las células se lavaron tampón AP, con el fin de eliminar restos de fosfatos remanente del PFA y del PBS, ya que el fosfato puede inhibir la actividad de la enzima fosfatasa alcalina. Luego se realizaron 3 lavados de 5 minutos cada uno y se agregó una mezcla de NBT/BCIP (3.5 µl/ml y 4.5 µl/ml en tampón AP, respectivamente) y se incubó a temperatura ambiente en oscuridad por 2 horas. La diferenciación se evaluó mediante la aparición de un precipitado púrpura, indicativo de la reacción positiva de la enzima FA. Al observarse el precipitado, se detuvo la reacción eliminando la mezcla NBT/BCIP y agregando PBS y se vuelve a fijar con PFA 4% por 5 minutos.

Para cuantificar el grado de diferenciación, se contabilizaron el número de células FA⁺ (púrpuras) y el número total de células, para esto se realizó una co-tinción nuclear utilizando *Nuclear fast red*, el cual se agregó 20-30 minutos a temperatura ambiente, lo cual tiñe los núcleos de color rosado.

La cuantificación se realizó tomando 5 fotografías por cada cubre-objetos utilizando el microscopio óptico Olympus BX51, con un aumento total de 40X (objetivo de 10X), por lo cual se obtuvieron 15 fotografías por condición. Se contó el número total de células

(*Nuclear fast red*⁺) y las células FA⁺ utilizando la herramienta "Cell counter" del programa ImageJ y se determinó un porcentaje de células diferenciadas por fotografía (células FA⁺/células totales x 100%), luego estos datos fueron graficados utilizando el programa GraphPad Prism.

2.27. Análisis estadístico

Todos los ensayos fueron realizados al menos con 3 muestras de WJ-MSK de donantes distintos, los cuales se mencionan como I, II, III, etc, sin embargo, eso no quiere decir que se usaron las mismas 3 muestras en todos los experimentos. Además, se realizaron al menos 3 experimentos distintos por cada análisis.

Los valores fueron graficados como promedio \pm S.E.M, donde "n" indica en número de cultivos celulares independientes generados de diferentes donantes.

La comparación estadística entre uno o más grupos de datos se realizó mediante test de Student, Anova de una vía o 2 vías, según se indica en cada resultado. Para visualizar los resultados, se utilizó el software Graphpad Prism 5.0b (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). $P < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo.

RESULTADOS

1. Expresión de los componentes de la vía SHH/GLI

1.1. SHH y PTCH1 se expresan en el estroma del cordón umbilical humano

Con el objeto de analizar el papel de la vía SHH/GLI en la angiogénesis en el contexto del estroma, escogimos el cordón umbilical como modelo de estudio. Por ello nuestro análisis comenzó determinando la expresión de los componentes fundamentales de esta vía de señalización en la gelatina de Wharton (WJ) del cordón: SHH, el ligando y PTCH1, su receptor.

Observamos que SHH se expresó en amplias áreas del cordón, mayormente en los vasos y alrededor de ellos, en la WJ (Figura 5A). Para determinar con más detalle en qué regiones del cordón se expresa SHH, realizamos inmunofluorescencia confocal en cortes de cordón, utilizamos colágeno IV para marcar la WJ, rica en este componente, y faloidina-rodamina para demarcar los cuerpos celulares. La tinción se realizó en condiciones permeabilizantes por lo cual la marca observada de SHH es intracelular. Determinamos que SHH se expresó en las WJ-MSC inmersas en el estroma del cordón (WJ) (Figura 5B, C). En concordancia, PTCH1 también se expresó en el cordón y observamos una distribución similar a SHH, ya que encontramos marca en la WJ y alrededor de los vasos umbilicales (Figura 5D).

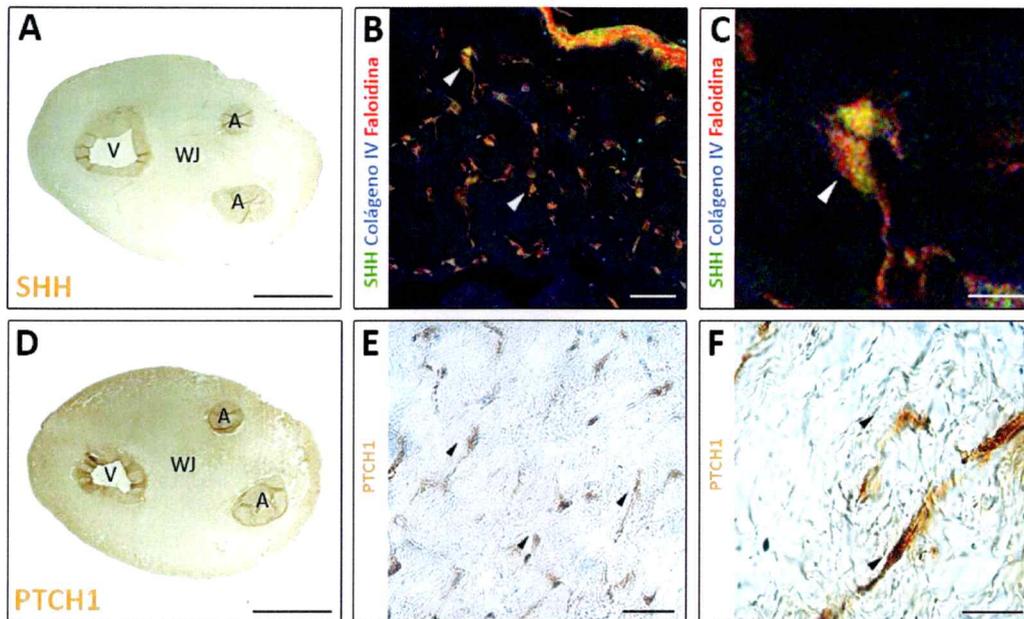


Figura 5. SHH y PTCH1 se expresan en el estroma del cordón umbilical humano.

(A) Inmunohistoquímica en un corte transversal de cordón umbilical muestra la marca de SHH en el estroma y los vasos umbilicales (barra= 50 mm). (B) SHH se expresa en las células de la gelatina de Wharton, WJ-MS (barra: 50 μ m). (C) WJ-MS, en un acercamiento se puede observar la marca de SHH en estas células (barra: 5 μ m). (D) En un corte de cordón, podemos ver la expresión de PTCH1 en la gelatina de Wharton y en los vasos umbilicales. (E) En la región amplificada se muestra que las células inmersas en la gelatina expresan el receptor (40x) (barra: 100 μ m). (F) Fotografía con mayor aumento (100x) muestra células positiva para PTCH1 rodeada de la matriz extracelular (barra: 20 μ m).

En una vista a mayor aumento determinamos que hay células positivas para PTCH1 inmersas en la matriz extracelular del cordón (Figura 5E, F).

Esta observación nos confirma que los componentes de la vía SHH/GLI se expresan en este contexto fisiológico, lo que sugiere una actividad de ésta en el estroma del cordón umbilical.

1.2. WJ-MSC expresan SHH

Los estudios funcionales los realizamos en cultivos primarios de WJ-MSC. Por ello, previo a dichos estudios las células fueron caracterizadas según la ISCT (*International Society of Cellular Therapy*) (Dominici, M. y col. 2006; Tyndall, A. y Uccelli, A. 2009). Las WJ-MSC se adhirieron a la superficie de cultivo y adquirieron una morfología fibroblastoide. Las WJ-MSC se diferenciaron a linajes adipogénico y osteogénico *in vitro*. Adicionalmente se determinó la expresión de marcadores mesenquimales (CD105, CD90, CD73, CD44 y CD29), ausencia de marcadores de linaje hematopoyético (CD45 y CD14, HLA-D) y endotelial (CD31). Asimismo, se determinó que una subpoblación de WJ-MSC expresa STRO-1 y que también expresan *OCT4*, un factor de transcripción que se asocia con poblaciones troncales. Se calculó el tiempo de duplicación poblacional de 21 ± 4 horas (Anexo 1).

Dadas las evidencias de que la vía SHH/GLI puede señalizar de forma autocrina y/o paracrina, investigamos si esta señalización ocurre en las WJ-MSC y bajo qué mecanismos. Para ello evaluamos la expresión de los componentes de la vía, comenzando por el ligando SHH en cultivos primarios.

En primer lugar, determinamos la presencia del RNAm de *SHH* en 3 muestras independientes de WJ-MSC mediante RT-PCR utilizando como controles positivos las líneas celulares humanas Saos-2 y HEK293 (Figura 6A). En extractos de proteínas de WJ-MSC

detectamos la presencia de SHH en 2 tamaños: una banda de 45 kDa correspondiente al ligando inmaduro y una banda de 19-20 kDa, peso que adquiere SHH luego del procesamiento que genera el fragmento N-terminal de la proteína (SHH-N) con actividad biológica. Estas bandas también fueron detectadas en lisados de la línea Saos-2 y de tubo neural de embrión de pollo, utilizados como controles positivos. Se utilizó tejido de embrión de 4 días post-fecundación (E4) ya que en este punto del desarrollo, el tubo neural de pollo está bajo la influencia inductiva de la notocorda, una fuente rica en SHH (Figura 6B). Asimismo, SHH se observó en la toda la superficie celular. La tinción se realizó en condiciones permeabilizantes por lo cual vemos el ligando intracelular (figura 6C).

Estas evidencias indican que las WJ-MSC expresan SHH y además, podrían ser la fuente de ligando.

1.3. WJ-MSC secretan SHH con actividad biológica

Para determinar si las WJ-MSC secretan SHH basalmente y si éste se encuentra biodisponible, realizamos un ensayo reportero que consistió en utilizar el sobrenadante de las WJ-MSC sobre la línea celular mesenquimal murina C3H10T1/2, donde el ligando presente en el sobrenadante induciría la diferenciación a linaje osteogénico y por ende marcación positiva para la enzima fosfatasa alcalina. Nuestros resultados indicaron que las células reporteras se diferenciaron luego de estar expuestas por 48 horas al sobrenadante, como se determinó mediante la tinción que indica la actividad FA, actividad adquirida por las células en diferenciación (Figura 7A, G).

Como el sobrenadante podría contener otros factores secretados por las WJ-MSC, distintos de SHH, capaces de inducir la diferenciación, seguidamente utilizamos 2 inhibidores específicos de la señalización de SHH: Cyc y 5E1 (Figura 7C, E). Cyc es un inhibidor de la vía que actúa a nivel del receptor de SHH, PTCH1. Es por esto, que las células

reporteras fueron pre-tratadas por 45 minutos con Cyc y luego se les expuso al sobrenadante por 48 horas, al cual también se le agregó Cyc para evitar el lavado del inhibidor desde el receptor. El porcentaje de células diferenciadas disminuyó en un 50% a diferencia del control EtOH, vehículo de Cyc (Figura 7D, G), indicativo que el MC de las WJ-MSC contenía SHH funcionalmente activo (Figura 7C, G). Dado que se ha reportado que Cyc podría tener efectos adversos sobre la viabilidad celular en bajo suero, quisimos descartar que los efectos observados fueran debido a muerte celular. Utilizamos el anticuerpo monoclonal 5E1, el cual actúa como bloqueante de la señalización al reconocer un epítipo en SHH, impidiendo su unión al receptor, por lo cual se pre-incubó el sobrenadante con el anticuerpo previo al tratamiento de las células reporteras. El porcentaje de células diferenciadas disminuyó nuevamente en torno a un 50% (Figura 7E, G), indicativo que el MC contenía SHH con actividad biológica. Utilizamos como control la incubación con el anticuerpo denaturado (5E1d), el cual no tuvo efectos sobre el proceso de diferenciación (Figura 7F, G).

El efecto de ambos inhibidores específicos de la señalización de la vía es claramente indicativo de que las WJ-MSC secretan SHH constitutivamente, lo que sugiere la señalización activa de la vía en estas células.

Estos resultados en su conjunto, demuestran que las WJ-MSC son una fuente biológica de SHH, el cual podría ejercer funciones sobre esta misma población, sugiriendo una señalización autocrina, o paracrina actuando sobre otras poblaciones celulares. Por tanto, SHH podría estar cumpliendo distintos roles en su nicho del cordón umbilical, los cuales fueron abordados en esta tesis

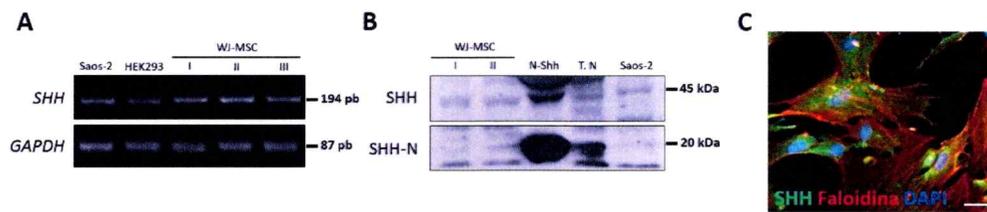


Figura 6. WJ-MSC expresan SHH.

(A) WJ-MSC expresan el RNAm de *SHH*, analizado en 3 muestras independientes (I-III), se utilizó DNAc de las líneas celulares humanas Saos-2 y HEK293 como control positivo. **(B)** Se muestra la abundancia de SHH en WJ-MSC. Se destaca la proteína inmadura de 45 kDa y la forma procesada, con actividad biológica de 20 kDa. Como controles positivos, utilizamos N-Shh: Shh recombinante, T.N: tubo neural de embrión de pollo, Saos-2: células de osteosarcoma humano. **(C)** Imagen representativa revelando la localización celular de SHH en cultivos primarios de WJ-MSC (analizado por inmunofluorescencia indirecta); se utilizó faloidina para marcar el contorno celular y DAPI para marcar el núcleo. Barra de tamaño = 10 μ m.

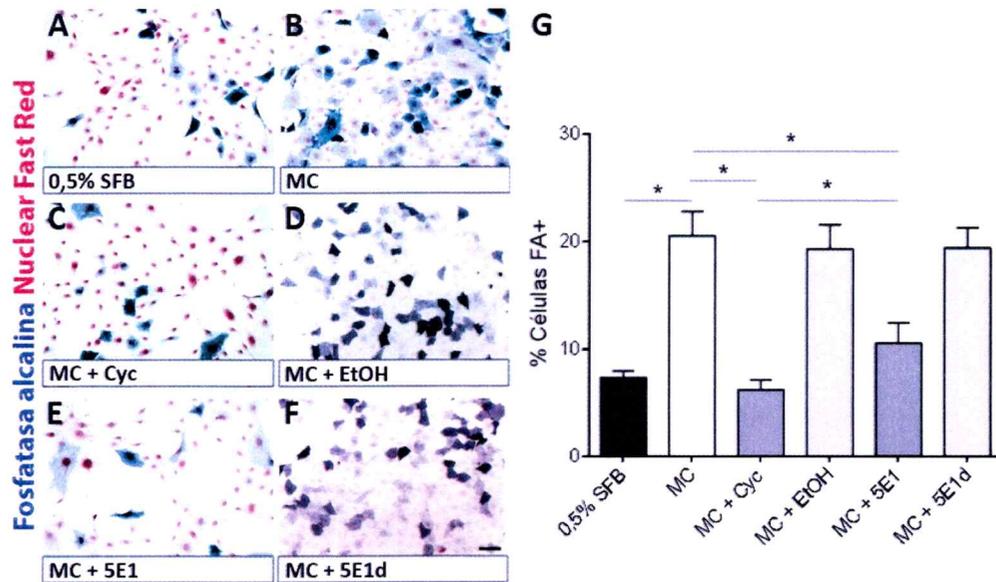


Figura 7. WJ-MSC secretan SHH biológicamente activo.

Células C3H10T1/2 se diferencian a linaje osteogénico en respuesta a SHH. **(A)** Células C3H10T1/2 son sembradas en bajo suero (0,5% SFB) por 24 horas antes de recibir los estímulos. Las células reporteras fueron tratadas con el sobrenadante (o medio condicionado, MC) de las WJ-MSC en las siguientes condiciones: MC, MC + Cyc, MC + EtOH (vehículo de Cyc), MC + 5E1 (anticuerpo bloqueante de SHH) y MC + 5E1d (anticuerpo bloqueante denaturado) por 48 horas. **(B)** Cuantificación de la actividad FA (fosfatasa alcalina) en células C3H10T1/2, expresado como porcentaje de células FA⁺ (células color púrpura) sobre el total de células Nuclear fast red⁺, tinción para núcleos (los núcleos se aprecian en color rosado). Anova de una vía (* P < 0.05). Barra de tamaño = 50 μm.

1.4. Las WJ-MSC expresan PTCH1 y los componentes de la vía SHH/GLI

SHH es secretado por las WJ-MSC, lo que sugiere que las células señalizan a otras poblaciones celulares o bien, responden de forma autocrina. Por ello evaluamos la expresión de PTCH1, receptor de SHH y otros componentes fundamentales para la señalización en WJ-MSC.

PTCH1 se expresa en todas las muestras de WJ-MSC ensayadas, sin embargo, los niveles de transcrito varían entre ellas, lo cual es además influenciado por el suero. La presencia de suero induce una disminución en la expresión del transcrito (Figura 8A). Con el objeto de analizar la expresión de PTCH1 como proteína, se utilizaron lisados celulares de WJ-MSC y se determinó su expresión por Western blot, visualizando una banda de 140 kDa, también presente en los lisados de los controles positivos utilizados: Saos-2, lisado de células endoteliales umbilicales y tubo neural de embrión de pollo (Figura 8B). La distribución celular se observó perinuclear siguiendo un patrón punteado como descrito para otros receptores de superficie. Las células con marca positiva para PTCH1 también lo fueron para SHH, apoyando la idea de una respuesta autocrina/paracrina (Figura 8C).

Asimismo, determinamos la expresión de otros importantes componentes de la vía: *SMO*, *GLI1*, *GLI2* y *GLI3*, analizados mediante RT-PCR. La expresión de *GLI1* es indicativa de la actividad transcripcional de la vía, lo que sugiere que la vía está activa en las WJ-MSC (Figura 8D). Pudimos determinar que las WJ-MSC expresan PTCH1 y otros componentes de la vía SHH/GLI que les permitiría responder al ligando, reforzando la hipótesis de que la vía cumple un papel fisiológico en estas células. Asimismo, demostramos que las WJ-MSC secretan SHH con actividad biológica, por lo cual nace la pregunta si estas células son la fuente del ligando y a la vez responden a él regulando ciertos procesos celulares, como la angiogénesis.

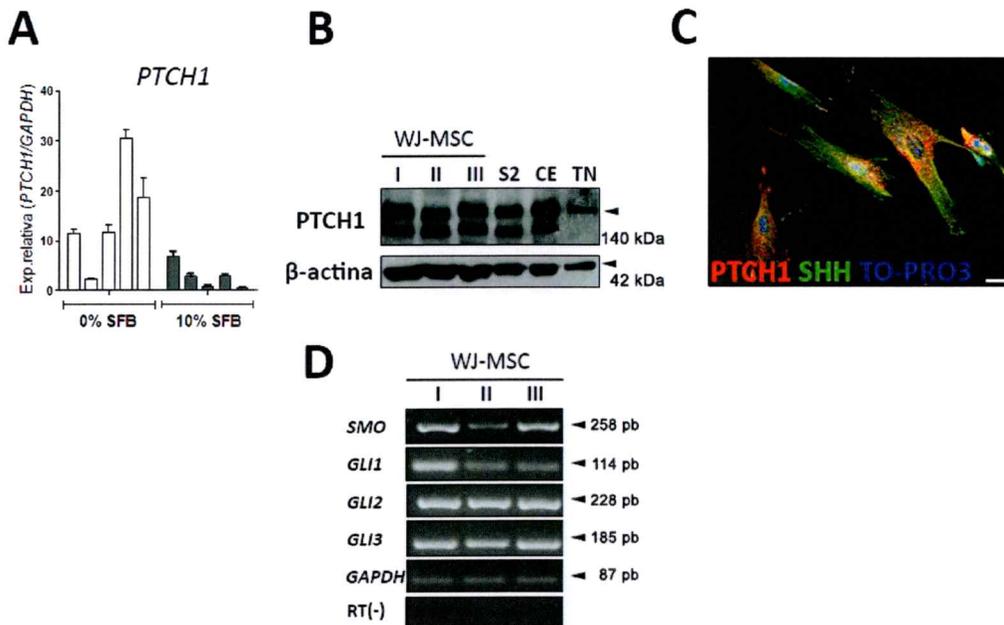


Figura 8. WJ-MSC expresan *PTCH1* y los componentes de la vía SHH/GLI.

(A) Expresión del transcrito *PTCH1* en 5 muestras de WJ-MSC en ausencia y presencia de suero. Se grafican los niveles de *PTCH1* relativos a *GAPDH*. **(B)** Abundancia de la proteína *PTCH1* (140kDa) en WJ-MSC provenientes de 3 donantes distintos (I- III), se utilizaron como controles positivos extractos de la línea celular Saos-2 (S2), células endoteliales (CE) y como control positivo tubo neural de embrión de pollo (T.N). **(C)** Expresión de *PTCH1* y *SHH* en WJ-MSC, evaluado mediante inmunofluorescencia y microscopía confocal. Se utilizó TO-PRO3 para demarcar el núcleo celular. Se observa la co-distribución de ambas proteínas en las mismas células. **(D)** Expresión de *SMO* y los factores de transcripción *GLI1*, *GLI2* y *GLI3* en WJ-MSC. Se amplificó *GAPDH* como control interno de las muestras y del RT (-). Barra de tamaño = 10 μ m.

2. WJ-MSC secretan factores de crecimiento

2.1. WJ-MSC secretan factores angiogénicos y existe variabilidad en los secretomas de muestras provenientes de donantes distintos

Para evaluar la posible modulación de las propiedades angiogénicas de las WJ-MSC por parte de la vía SHH/GLI, en primer lugar quisimos determinar la composición del secretoma angiogénico en condiciones basales con el objeto de poder, posteriormente, evaluar el perfil del secretoma de estas células en respuesta a SHH. Para ello analizamos el sobrenadante de WJ-MSC provenientes de 6 donantes y observamos que poseen un perfil similar de moléculas secretadas, pero no idéntico entre ellos. De hecho, al analizarlas en detalle, hay ciertas moléculas que se secretan en menor o mayor magnitud dependiendo del donante (Figura 9A). Notoriamente, los factores que varían entre los donantes son los mismos: Angiogenina, Factor de coagulación III, HGF, IGFBP-3, IL-8 y ANGPT1, de efecto angiogénico y Endostatina y Pentraxina-3 de efecto anti-angiogénico (Figura 9B). Esta diferencia en los secretomas de distintas muestras provenientes de cordón umbilical fue descrita en un trabajo reciente, avalando nuestro resultado (Choi, M. y col. 2013).

2.2. WJ-MSC secretan factores tróficos relacionados con el proceso de reparación tisular

De las 55 moléculas que pueden ser detectadas mediante este arreglo de proteínas, seleccionamos algunas y las clasificamos según su función dentro del proceso de reparación tisular, ya que es una función fisiológica de las MSC (Roubelakis, M. G. y col. 2013) (Figura 10). Encontramos factores relacionados directamente con el proceso de angiogénesis tales como: Angiogenina, ANGPT1, ANGPT2, EG-VEGF, uPA, Endostatina, Endotelina-1, aFGF, PD-ECGF, PDGF-AA, PDGF-BB/AB, VEGF, VEGF-C. En reparación de tejidos: EGF, TSP-1, FGF2, FGF4, FGF7, Angiostatina, HB-EGC y HGF. Algunos factores de efecto anti-angiogénico: Vasohibina y ADAMST-1. Algunos factores relacionados con los procesos inflamatorios: IL-8,

LAP, Pentraxina-3, MCP-1, MIP-1 α , con migración: CXCL16, DPPIV, TIMP-1, MMP-8, MMP-9 y otros involucrados con la coagulación: Factor plaquetario IV y Factor de coagulación 3 (Figura 10).

Hacemos notar que esta clasificación no resta que varias de estas moléculas tengan efectos más amplios y puedan ser clasificados en más de una categoría, siendo esto una prueba molecular de lo fina que es la regulación de los procesos involucrados en la mantención y regeneración de vasos sanguíneos.

2.3. WJ-MSC secretan factores que inducen la angiogénesis *in vitro*

Para determinar el potencial inductor de angiogénesis de los factores secretados por las WJ-MSC, probamos el secretoma en un ensayo *in vitro*. Para lo cual utilizamos cultivos primarios de células endoteliales de vena de cordón umbilical (HUVEC) en ensayos sobre Matrigel, para observar la formación de estructuras tridimensionales del tipo capilares. Decidimos utilizar cultivos primarios HUVEC, ya que a pesar del extenso uso y caracterización de este tipo de ensayos usando líneas inmortalizadas, nos interesó utilizar un sistema celular que fuese lo más similar al nicho umbilical.

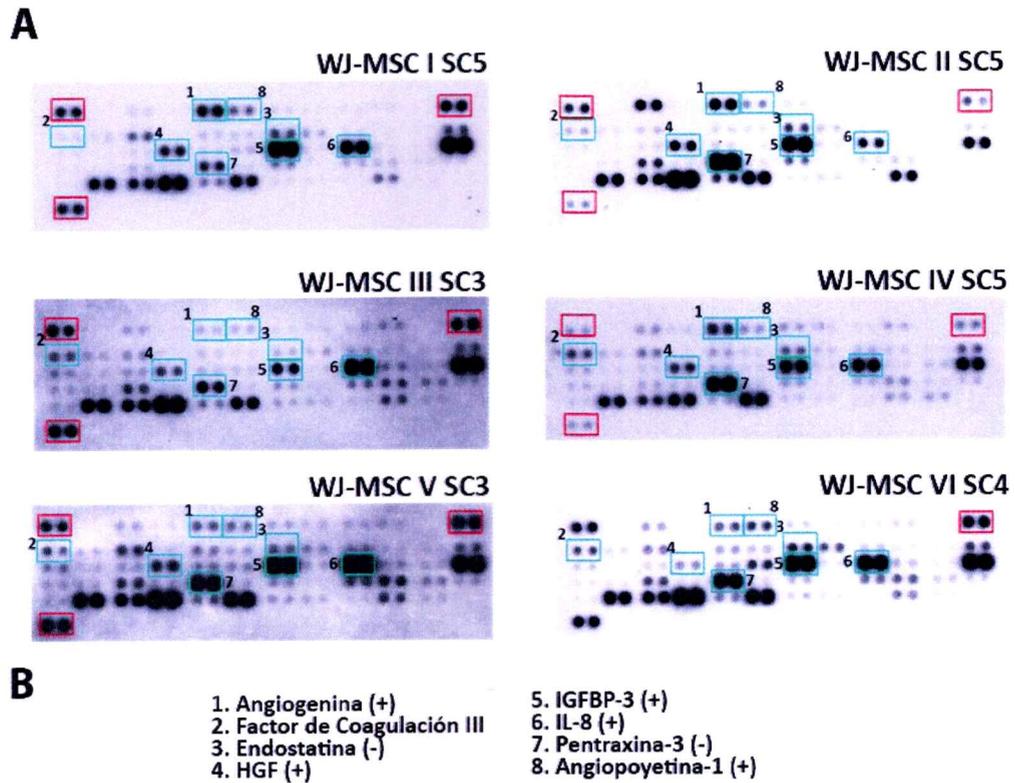


Figura 9. WJ-MSC secretan factores angiogénicos y existe diversidad en los secretomas.

(A) Se analizó el sobrenadante de 6 WJ-MSC en subcultivos (SC) 3-5 y se determinaron las proteínas angiogénicas presentes. Se observaron diferencias en los niveles de algunas de las moléculas de efecto anti (-) y pro-angiogénico (+) (recuadros verdes), los números se corresponden a las moléculas listadas en (B), los recuadros en rojo indican el control interno de cada ensayo y no representan ninguna molécula. El listado completo de factores analizados se encuentra en el Anexo 2.

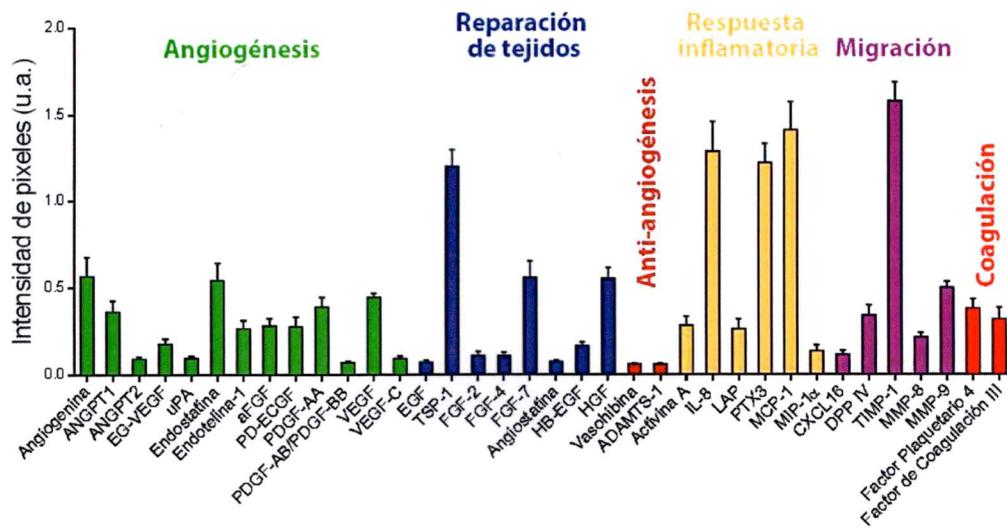


Figura 10. Las WJ-MSC secretan factores de crecimiento relacionados con la angiogénesis y la reparación de tejidos.

Se graficaron los niveles relativos de algunas de las moléculas secretadas por las WJ-MSC y se clasificaron según su función en los procesos de angiogénesis (pro o anti), reparación de tejidos, inflamación, migración celular y coagulación. Se graficaron como promedio \pm SEM (n=6).

En todas las condiciones las células endoteliales se adhirieron al Matrigel. Ante VEGF (40 ng/ml) y FGF2 (20 ng/ml), factores angiogénicos clásicos, las células endoteliales migraron y formaron túbulos (Figura 11A, B). También lo hicieron en respuesta a SHH (3.3 µg/ml), el cual posee un efecto directo sobre la angiogénesis mediante señalización no canónica (Figura 11C). Asimismo, utilizamos EGM-2, medio de crecimiento endotelial rico en factores angiogénicos que, tal como se esperaba, también indujo la formación de ramificaciones y túbulos (figura 11D). Como esta última fue la condición que nos permitió obtener la respuesta angiogénica más robusta y reproducible, utilizamos este medio en futuros experimentos como control positivo. Como control negativo utilizamos DMEM, vehículo del sobrenadante (Figura 11E), el cual no indujo respuesta.

La cuantificación de interacciones del tipo ramificaciones mostraron que los factores pro-angiogénicos VEGF, FGF2, SHH y EGM-2 indujeron positivamente la interacción entre las células endoteliales (Figura 11G). Las ramificaciones se complejizaron y conformaron estructuras poligonales o túbulos, los que se generaron similar a lo observado en los controles positivos. Sin embargo, SHH tuvo un efecto menor ya que sólo alcanzó el 50% del efecto generado por el medio EGM-2 (Figura 11H).

El sobrenadante de las WJ-MSC demostró ser promotor de la angiogénesis en las células endoteliales (Figura 16F) ya que indujo la formación de ramificaciones de forma significativa, respecto de DMEM (Figura 11G). La estimulación de la formación de túbulos se observó en menor medida, independiente del tiempo utilizado en los ensayos (Figura 11H), lo que indica que los factores secretados por las WJ-MSC indujeron el proceso de migración celular (establecimiento de ramificaciones).

No podemos descartar que el ligando SHH presente en el sobrenadante pueda formar parte de los factores angiogénicos secretados por las WJ-MSC que inducen la respuesta

observada. Nuestros resultados indican que las células endoteliales estudiadas expresan el receptor PTCH1, lo que les permitiría responder a SHH de manera no canónica (Anexo 3).

Estas observaciones nos indican que las WJ-MSc secretan un secretoma enriquecido de factores tanto pro- como anti- angiogénicos, que en su conjunto son capaces de modular el comportamiento de las células endoteliales *in vitro*. Considerando esto, nuestro siguiente paso fue determinar si esta propiedad angiogénica que presenta el secretoma de las MSC es modulada por la vía SHH/GLI.

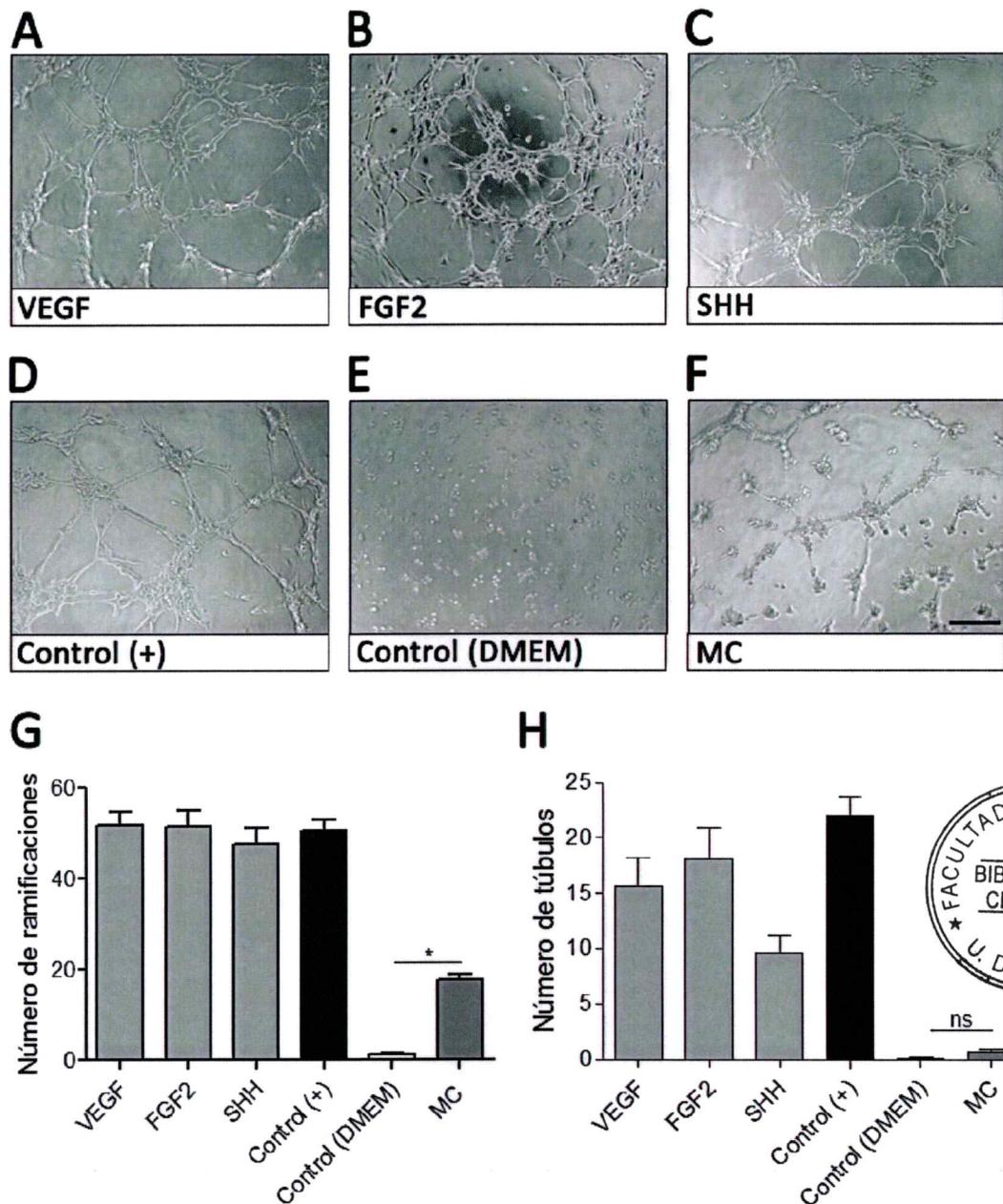


Figura 11. WJ-MSC secretan factores que inducen el proceso angiogénico *in vitro*.

HUVEC fueron tratadas con los estímulos indicados por 3-4 horas. La angiogénesis se cuantificó determinando el número de puntos de ramificación y de túbulos generados. Se evaluaron distintos agentes como controles positivos. **(A)** VEGF **(B)** FGF2 **(C)** SHH **(D)** Control (+), EGM-2 y **(E)** DMEM, control negativo. **(F)** Se utilizó el sobrenadante (MC) generado por las WJ-MSC luego de 48 de condicionamiento **(G)** Cuantificación del número de ramificaciones observadas en cada condición **(H)** Cuantificación del número de túbulos generados en cada condición. Las células fueron fotografiadas con una cámara digital acoplada a un microscopio de contraste de fase. Cada fotografía es representativa de las condiciones descritas. No se observaron diferencias significativas entre los efectos observados con el MC generado luego de 48 horas de condicionamiento versus 24 horas (Anexo 4). (Anova de una vía, * $P < 0.05$, $n=4$). Barra de tamaño: 100 μm .

3. La vía SHH/GLI está activa en las WJ-MSC

3.1. La actividad metabólica de las WJ-MSC no se ve afectada con los tratamientos farmacológicos

Los resultados hasta ahora descritos nos indican que la vía SHH/GLI está activa en las WJ-MSC de forma tal que puede ser modulada mediante intervención farmacológica. Por ello, lo siguiente fue determinar la regulación de la vía sobre factores angiogénicos en ensayos *in vitro* e *in vivo*. Pero previo a este paso quisimos asegurarnos que los tratamientos utilizados no afectaran la viabilidad celular ya que se ha descrito a SHH como un factor de nicho que promueve la sobrevivencia de células troncales progenitoras (Fuccillo, M. y col. 2006).

En presencia de suero las WJ-MSC muestran morfología fibroblastoide (Figura 12A) en tanto en todas las condiciones de privación de suero (0% SFB, Pur y 5E1), observamos que las células adquirieron una forma alargada (Figura 12B, D), similar a lo ya descrito (Pochampally, R. R. y col. 2004). Para determinar si el estado metabólico de las células podría verse alterado por los tratamientos revisamos 2 parámetros: proliferación y actividad metabólica. Las células proliferan en presencia de suero, en 0% SFB se observa un aumento constante del número celular en el tiempo, pero ocurre a una tasa de proliferación menor a la condición 10% SFB. Situación similar a lo observado en presencia de Pur y Cyc, donde el número celular no alcanza a duplicarse en 48 horas (31.000 células en Pur y 28.000 en Cyc, versus las 20.000 sembradas inicialmente), lo que nos indica que estos tratamientos no alteraron significativamente el número celular (Figura 12E). Esta tendencia se mantiene luego de 72 horas. Finalmente, determinamos que las condiciones experimentales descritas no mermaron significativamente la actividad metabólica de las WJ-MSC en los tiempos ensayados (Figura 12F).

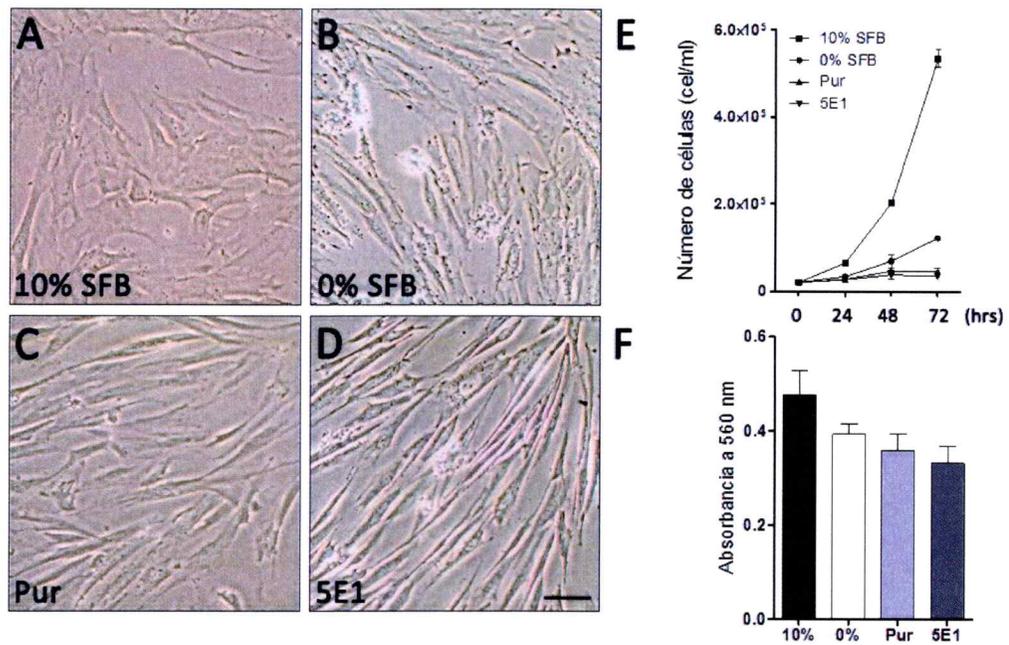


Figura 12. La modulación farmacológica de la vía SHH no afecta la actividad metabólica de las WJ-MSC.

Morfología celular de WJ-MSC en las condiciones experimentales estudiadas: **(A)** 10% SFB, **(B)** 0% SFB, **(C)** Pur y **(D)** 5E1. (Barra de tamaño: 50 μ m). **(E)** Crecimiento celular en las citadas condiciones experimentales hasta 72 horas post-siembr. **(F)** Mediante ensayo MTT se determinó la actividad metabólica de las células luego de 48 horas en presencia de los tratamientos mencionados. (n= 3, Anova de una vía *P < 0.05).

Estos antecedentes nos permiten confirmar que los tratamientos farmacológicos utilizados en esta tesis no alteran la viabilidad celular, asegurando que los posibles efectos sobre la angiogénesis no son por una alteración en el metabolismo celular en sí sino dependen de cambios inducidos por la actividad de vía SHH/GLI.

3.2. La estimulación de la vía modula la expresión de *PTCH1*, *GLI1* y *FGF2*

Para evaluar si la vía SHH/GLI se encuentra activa en las WJ-MSC realizamos tratamientos farmacológicos y medimos su efecto sobre la expresión de genes blanco. Utilizamos el agonista Pur en un rango temporal de 6 hasta 48 horas y determinamos su efecto sobre los niveles de expresión de genes diana.

En una curva de tiempo que cubre el rango temporal de genes de respuesta temprana y tardía (6-48 horas), determinamos que los niveles de *PTCH1* no cambiaron significativamente en condiciones control (Figura 13A). En cambio, cuando las WJ-MSC fueron expuestas al agonista, los niveles de *PTCH1* aumentaron desde las 6-12 horas de tratamiento, con un aumento significativo a las 24 horas, con un máximo a las 48 horas de estimulación (Figura 13B). Asimismo, evaluamos el efecto de la estimulación sobre otro blanco de la vía, *GLI1*, cuya expresión aumentó luego de 48 horas. *PTCH1* y *GLI1* son blancos de los factores GLI y forman parte de mecanismos de retroalimentación, por lo cual, el aumento de ambos transcritos indica que la vía SHH/GLI canónica está activa en las WJ-MSC. Además, el aumento de *GLI1* se correlaciona con la regulación transcripcional de genes de respuesta tardía de la vía, ya que la proteína actúa como un potenciador de la activación de la vía y es activado por GLI2 (Figura 13C).

A continuación, quisimos estudiar el comportamiento de otro gen blanco de la vía relacionado directamente con la angiogénesis, *FGF2*, el cual es modulado de forma negativa por SHH (Pola, R. y col. 2001). Si *FGF2* es regulado en las WJ-MSC podríamos confirmar que

la vía SHH regula procesos angiogénicos en las WJ-MSC. Los niveles de *FGF2* variaron durante el tiempo estudiado en la condición control (Figura 13D). En respuesta a Pur, los niveles de *FGF2* se mantuvieron constantes hasta las 12 horas de tratamiento, sin embargo, a las 24 horas los niveles disminuyeron significativamente manteniéndose así hasta las 48 horas de estimulación (Figura 17E), lo que confirma que *FGF2* es modulado por la vía SHH/GLI en WJ-MSC.

Estos resultados nos permiten afirmar que la vía SHH/GLI está activa en WJ-MSC, ya que al estimularla variaron los niveles de 3 genes blancos: *PTCH1*, *GLI1* y *FGF2*. Estos datos confirman no sólo la sensibilidad de las WJ-MSC a la vía SHH/GLI canónica, sino que también nos entrega una ventana temporal en que los genes blancos de la vía responden de forma significativa a la estimulación: desde las 24 hasta las 48 horas.

3.3. El bloqueo de la señalización de SHH disminuye la expresión de *PTCH1* y aumenta la de *FGF2* en WJ-MSC

A continuación las WJ-MSC fueron tratadas con el anticuerpo 5E1 por 48 horas en ausencia de suero. Este rango temporal fue seleccionado para permitir que el anticuerpo bloqueante se uniera al SHH secretado y así obtener una respuesta acumulativa en el tiempo. A su vez nos permite comparar con una condición experimental similar a la estudiada con el agonista Pur.

Evaluamos el efecto de 5E1 sobre la expresión de *PTCH1* y *FGF2*. Observamos una disminución significativa del transcrito de *PTCH1* (Figura 14A) y un consecuente aumento de *FGF2* (Figura 14B). Ambas respuestas están en concordancia al efecto inducido por Pur (Figura 13), lo que nos indica que 5E1 sí moduló negativamente la actividad de la vía.

Estos resultados nos permiten afirmar que la vía de SHH/GLI presenta actividad canónica constitutiva en las WJ-MSC, que puede ser bloqueada mediante el uso de

inhibidores, lo cual es también indicativo de que la señalización de la vía ocurre de forma autocrina y/o paracrina.

4. La vía SHH/GLI regula las propiedades angiogénicas de WJ-MSC

4.1. La estimulación de la vía SHH/GLI en WJ-MSC potencia el efecto angiogénico de su secretoma

Habiendo determinado que la vía de SHH/GLI está activa en las WJ-MSC, quisimos evaluar si la modulación de la misma podría regular las propiedades pro-angiogénicas de estas células, para lo cual utilizamos los secretomas (MC), generados esta vez en presencia de Pur (MC+Pur) o 5E1 (MC+5E1), en un ensayo de formación de túbulos (Figura 15).

El (MC+Pur), indujo un aumento significativo en el número de ramificaciones (3 veces de aumento) y en el número de túbulos (12 veces de aumento) comparado con el MC control (Figura 15A, C y 15B, D respectivamente), lo que sugiere que la estimulación de la vía SHH/GLI favorece la secreción de factores angiogénicos que actúan a su vez sobre las células endoteliales promoviendo la migración celular (ramificaciones) y la diferenciación tubular, eventos fundamentales durante el proceso angiogénico.

De forma complementaria, el ensayo se realizó utilizando MC generado luego de 24 horas de estimulación con Pur y observamos que sólo el (MC+Pur) de 48 horas estimuló la angiogénesis de forma significativa respecto de los controles (Anexo 4). Esto último respalda que la estimulación de las WJ-MSC con Pur induce la expresión y acumulación de factores angiogénicos luego de las 24 horas, lo que coincide con la activación transcripcional de la vía (Figura 13).

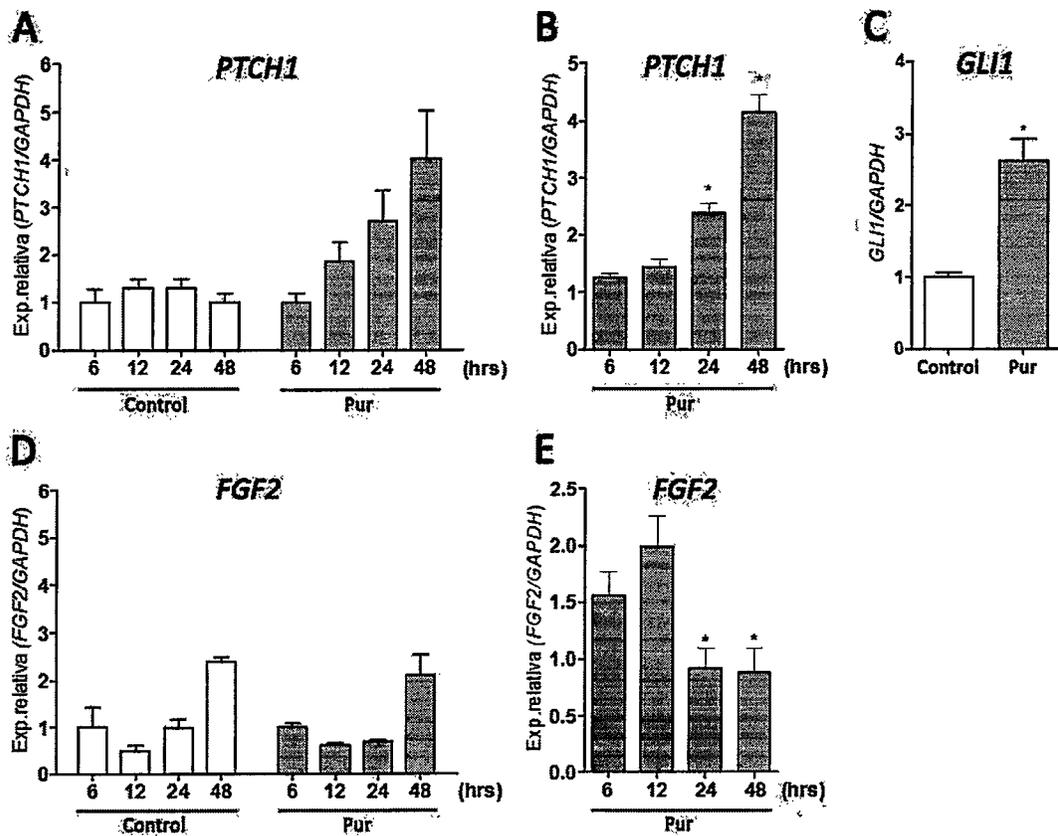


Figura 13. La vía SHH/GLI está activa en WJ-MSC.

(A) Se grafican los valores (Ct *PTCH1*)/ (Ct *GAPDH*) de 3 experimentos distintos para ilustrar los niveles del gen en la condición control y en respuesta al agonista Pur. **(B)** Veces de inducción del transcrito de *PTCH1* respecto de *GAPDH*. Luego de 24 y 48 horas se observó un aumento significativo de los niveles de *PTCH1*. **(C)** Los niveles de *GLI1* aumentaron a las 48 horas en respuesta al tratamiento con el agonista, como fue determinado por RT-PCR. **(D)** Como control de la activación de la vía, analizamos la expresión de *FGF2*, que también es blanco de la vía SHH/GLI, pero éste disminuye en respuesta a la estimulación de la vía con Pur. Se grafican los valores (Ct *FGF2*)/ (Ct *GAPDH*) de 3 experimentos distintos para ilustrar los niveles en la condición control y en respuesta al agonista Pur. **(E)** Veces de inducción de *FGF2* respecto de *GAPDH*, se observa la disminución de los niveles del transcrito luego de 24-48 horas de tratamiento. (n= 3, Anova de una vía **P* < 0.05).

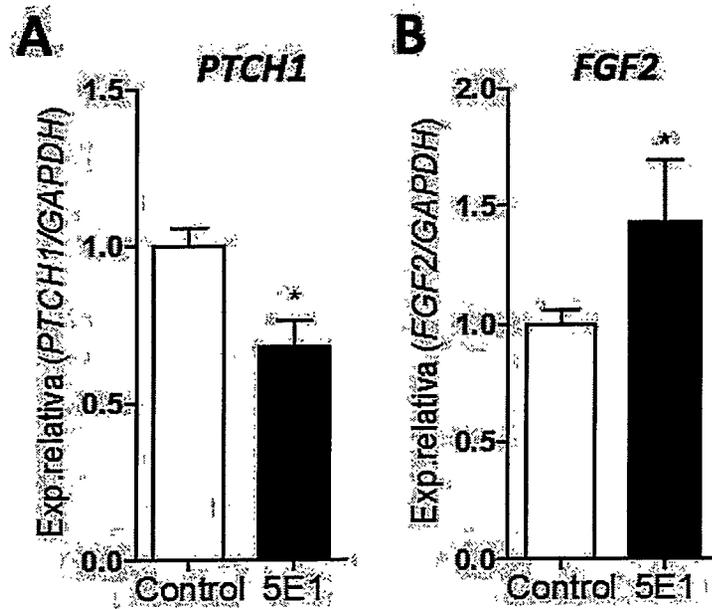


Figura 14. El bloqueo de SHH inhibe la actividad basal de la vía en WJ-MSC.

WJ-MSC fueron tratadas con el anticuerpo bloqueante de SHH 5E1 (5 μ g/ml) por 48 horas en ausencia de suero. **(A)** Se determinó la actividad de la vía según los niveles del transcrito de *PTCH1*. Se observa una disminución significativa en la expresión del mismo. **(B)** La inhibición de la vía con 5E1 indujo un aumento en los niveles de transcrito de *FGF2*. (n= 3, test de Student, *p < 0.05).

4.2. La inhibición de la vía SHH/GLI disminuye las propiedades angiogénicas del secretoma de WJ-MSC

El sobrenadante (MC+5E1) indujo una menor formación de ramificaciones (0,25 veces) y túbulos (0,7 veces menos) comparado con el MC control (Figura 15E, G y 15F, H). La magnitud de la respuesta es considerablemente menor a la obtenida con (MC+Pur) (12 veces más túbulos versus 0,7 veces menos túbulos en (MC+Pur) y (MC+5E1), respectivamente), lo que apoya la idea que existe una baja actividad basal de la vía en WJ-MSC. Sin embargo, ésta es requerida para la secreción de factores angiogénicos ya que al inhibirla, se disminuye la secreción de ellos, o bien, la inhibición de la vía SHH/GLI podría permitir la señalización de vías alternativas que modulan la expresión y secreción de factores anti-angiogénicos, con la consecuente disminución en la respuesta angiogénica observada en este ensayo.

Este ensayo demuestra que las propiedades angiogénicas de las WJ-MSC son reguladas por la vía SHH/GLI y que su señalización permite la secreción de factores promotores del proceso. Sin embargo, este ensayo no nos permite definir qué factores han sido modulados por la vía SHH/GLI.

5. La vía SHH/GLI modula las propiedades angiogénicas de las WJ-MSC mediante la regulación de la expresión de diversos factores tróficos

5.1. VEGF y ANGPT1 son genes regulados por la vía SHH/GLI en WJ-MSC

Las propiedades angiogénicas de las WJ-MSC son reguladas por la vía SHH/GLI, pero desconocemos que moléculas podrían estar involucradas. Es por ello que quisimos investigar si la vía regula la expresión y secreción de 2 factores angiogénicos clásicos: VEGF y ANGPT1.

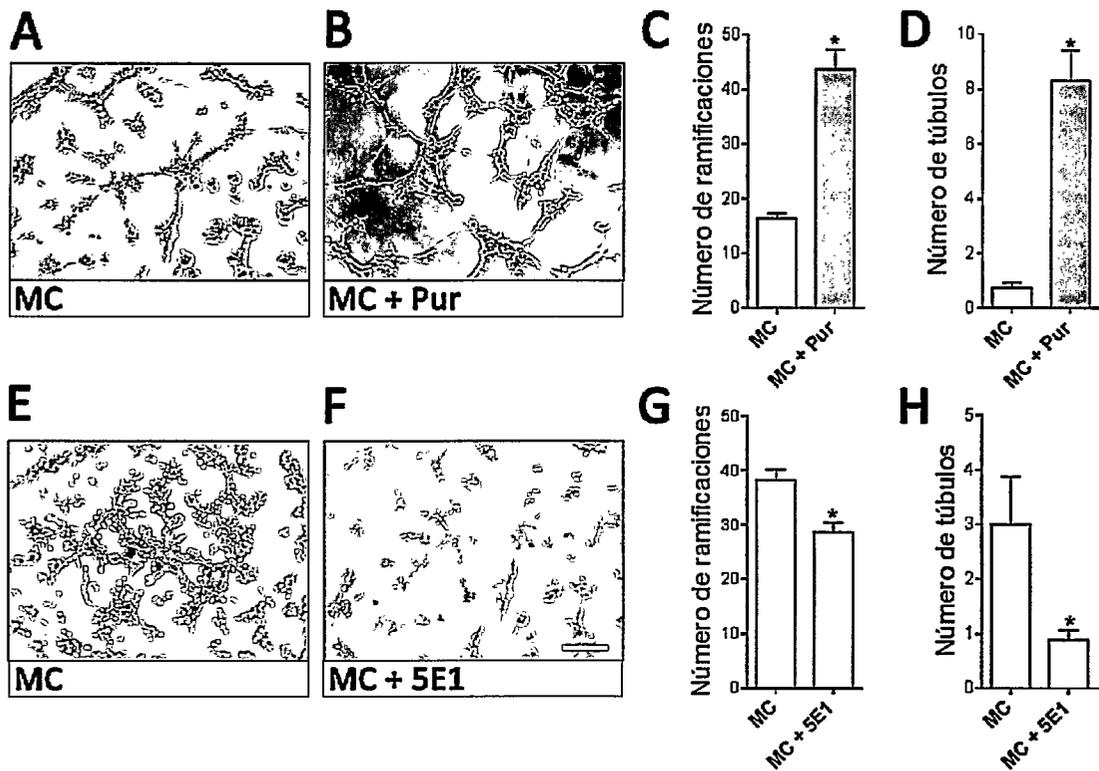


Figura 15. La vía SHH/GLI modula las propiedades angiogénicas de las WJ-MSC *in vitro*.

Se utilizó el sobrenadante (MC) generado en presencia de Pur o 5E1 y se evaluó el potencial angiogénico del MC en ensayo de formación de túbulos. (A) Imagen representativa de la respuesta angiogénica generada en presencia de MC. (B) El MC generado en presencia de Pur, induce una mayor respuesta angiogénica lo cual se sustenta sobre una mayor formación de ramificaciones (C) y de túbulos (D). Por el contrario, al estudiar el efecto del MC generado en presencia de 5E1 versus el control (E), se observa una respuesta angiogénica menor (F), como se puede ver en la cuantificación de la formación de ramificaciones (G) y de túbulos (H). (MC generados a partir de al menos 3 muestras distintas, Test de Student * $p < 0,05$). Barra de tamaño: 100 μm .

5.2. VEGF y ANGPT1 se expresan en WJ-MSC

En primer lugar caracterizamos la expresión de ambos factores en WJ-MSC. Tanto *VEGF* como *ANGPT1* son detectados a nivel del RNAm (Figura 16A, 16B respectivamente). Además, determinamos que ambos factores son secretados, tal como lo indica el análisis del sobrenadante mediante en ensayo *Proteome Profiler Array* (Figura 16C).

Luego realizamos tratamientos farmacológicos de ganancia y pérdida de función de la vía SHH y analizamos el efecto de éstos sobre la expresión y secreción de VEGF (Figura 17) y ANGPT1 (Figura 18).

5.3. SHH regula la expresión del RNAm de VEGF en WJ-MSC

Comenzamos analizando el efecto del agonista Pur sobre *VEGF*. Observamos que los niveles del transcrito se mantuvieron constantes hasta las 24 horas en la condición control. Sin embargo observamos que a las 48 horas los niveles aumentaron 3 veces respecto de los niveles basales sin mediar modulación de la vía (Figura 17A). Cuando la vía fue estimulada, observamos que *VEGF* aumentó a las 12 horas de tratamiento con el agonista. Pero, a las 48 horas, los niveles en respuesta a Pur ya no fueron distintos al control (Figura 17B). En concordancia, 5E1 indujo la disminución del nivel de transcrito de forma significativa, por lo cual queda establecido que *VEGF* es regulado a nivel transcripcional por la señalización de SHH (Figura 17C). Resulta importante destacar que el aumento del transcrito ocurre en paralelo al aumento de *PTCH1*, indicador interno de la activación de la vía HH en las WJ-MSC, por lo que no podemos asegurar que la transcripción de *VEGF* inducida por la vía sea únicamente mediante los factores GLI.

5.4. SHH no estimula el aumento de la expresión de VEGF, pero 5E1 sí fue capaz de disminuir su expresión

Finalmente quisimos determinar si los efectos observados en el transcrito se traducen en cambios en la expresión y secreción de VEGF. Pur no estimuló la secreción de VEGF a las 48 horas de tratamiento, un resultado inesperado dado a lo observado con el transcrito. Sin embargo, 5E1 sí inhibió la secreción de la proteína, lo que nos indica que la vía SHH/GLI regula parcialmente la secreción de VEGF en WJ-MSC (Figura 17C).

5.5. El aumento del transcrito de VEGF no se condice con el aumento de la proteína en WJ-MSC

El aumento en los niveles del transcrito de *VEGF* se determinó a las 12 horas de tratamiento, mientras que los ensayos de sobrenadante se realizaron a las 48 horas. Ante tal situación, especulamos que (1) El aumento en el transcrito se tradujo en una mayor expresión y secreción de la proteína alrededor de las 12 horas y decae antes de las 48 horas, dando cuenta de un gen de respuesta temprana o (2) La traducción del transcrito es dependiente de otras instancias regulatorias y no hay acoplamiento transcripción/traducción. Para probar la primera hipótesis realizamos el tratamiento con Pur en un rango temporal más amplio y determinamos los niveles de la proteína por Western blot y observamos que no hay variación en VEGF en respuesta al tratamiento con el agonista, lo que nos indica que no existe un acoplamiento entre la regulación de la expresión del transcrito de *VEGF* y de la proteína y que la vía sólo regula positivamente la transcripción (Figura 18A), lo que significa que debe haber mecanismos regulatorios actuando a nivel del RNAm y que la vía contribuiría con la mantención de niveles basales de VEGF en WJ-MSC. Por otra parte, podría darse un efecto dosis-dependiente de SHH sobre la expresión de VEGF (Johnson, N. R. y Wang, Y. 2013), por lo cual no podemos descartar que la concentración de agonista utilizada en esta tesis no estimule la expresión de la proteína,

aún cuando hayamos demostrado la activación de la vía a través de *PTCH1*, la cual fue obtenida utilizando 10 μ M del agonista, equivalente a 0.1-0.4 μ g/ml de N-SHH recombinante (Hu, B. Y. y col. 2009; Wang, Y. y col. 2013).

5.6.SHH regula la expresión del RNAm de *ANGPT1* en WJ-MSC

A continuación, realizamos el análisis de *ANGPT1* comenzando por los efectos del agonista sobre el transcrito. Los niveles de *ANGPT1* varían en los tiempos estudiados, aumentando ligeramente entre las 12 y 24 horas en condición control (Figura 19A). La estimulación de la vía indujo el aumento del transcrito de *ANGPT1* a las 48 horas, acorde a la respuesta tardía de un gen blanco de la vía (Figura 19B). En concordancia al efecto observado con el agonista, la inhibición de la actividad de la vía utilizando 5E1 indujo una disminución en el transcrito de *ANGPT1* luego de 48 horas de tratamiento (Figura 19C). Ambas observaciones indican que *ANGPT1* es un blanco transcripcional de la vía SHH/GLI en WJ-MSC.

5.7.La estimulación de la vía estimula la expresión de la proteína *ANGPT1*

Acto seguido quisimos determinar si los efectos observados en el transcrito se traducen en cambios en la secreción de *ANGPT1*. El agonista sí indujo la secreción de *ANGPT1* a las 48 horas de tratamiento, acorde al aumento del transcrito a las 48 horas. Sin embargo, 5E1 no indujo una disminución significativa en la secreción de la proteína, lo cual no se acopla a lo observado con el transcrito posiblemente debido a la alta dispersión que obtuvimos en los resultados con 5E1 y al tiempo ensayado (Figura 19D).

Resumiendo, estos resultados en conjunto nos permiten determinar que *ANGPT1* es blanco de la vía SHH/GLI en WJ-MSC ya que ésta modula la expresión y secreción de la proteína.

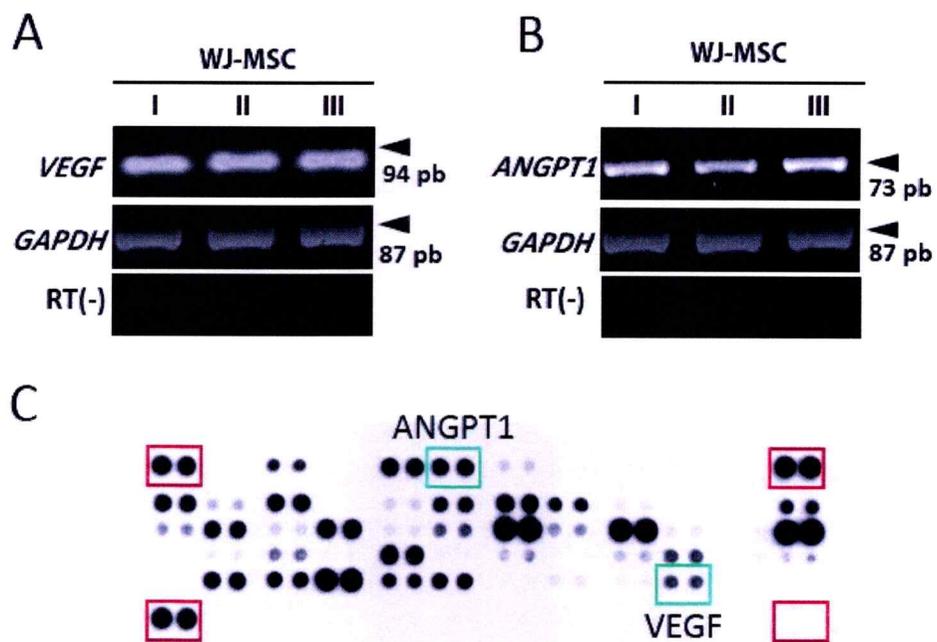


Figura 16. WJ-MSC expresan y secretan VEGF y ANGPT1, factores angiogénicos clásicos.

WJ-MSC expresan el RNAm de *VEGF* (A) y *ANGPT1* (B), analizado en 3 muestras independientes por RT-PCR, se utiliza *GAPDH* como control interno y del RT (-). (C) Determinación de la secreción de ambos factores en un ensayo *Proteome Profiler Array* representativo.

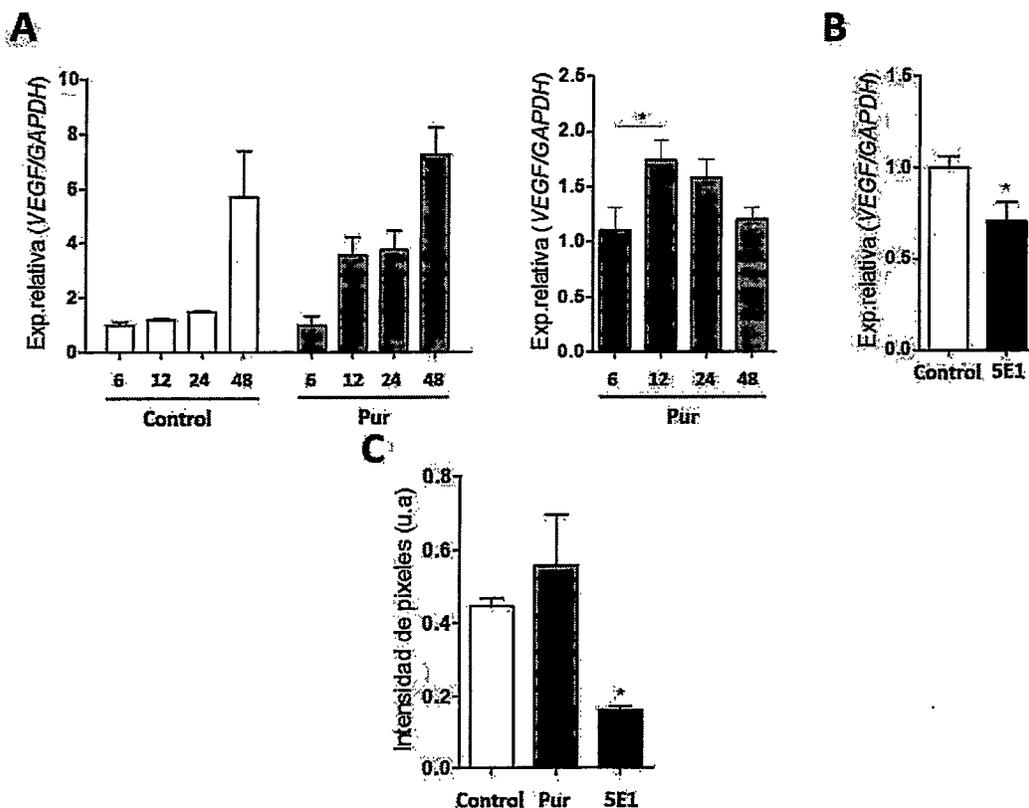


Figura 17. VEGF es regulado por la vía SHH/GLI a nivel de RNAm en WJ-MSC.

(A) Se grafica la expresión relativa de *VEGF* respecto de *GAPDH* para mostrar los niveles en la condición control y en respuesta a Pur. Se observa un aumento en los niveles de transcrito de *VEGF* luego de 48 horas de privación de suero. **(B)** Veces de inducción de *VEGF* respecto de *GAPDH*. Luego de 12 horas se observó un aumento significativo de los niveles de transcrito de *VEGF*, pero dicho aumento no se mantuvo en el tiempo estudiado ($n=3$, test de Student, $*p < 0.05$). **(C)** El bloqueo de la señalización con 5E1 disminuyó significativamente los niveles de *VEGF*. **(D)** Pur no estimula la secreción de VEGF, mientras que 5E1 la inhibe significativamente, según fue determinado en el sobrenadante (MC) mediante *Proteome Profiler Array* ((A) y (C), $n=3$, Anova de una vía, $*P < 0.05$).

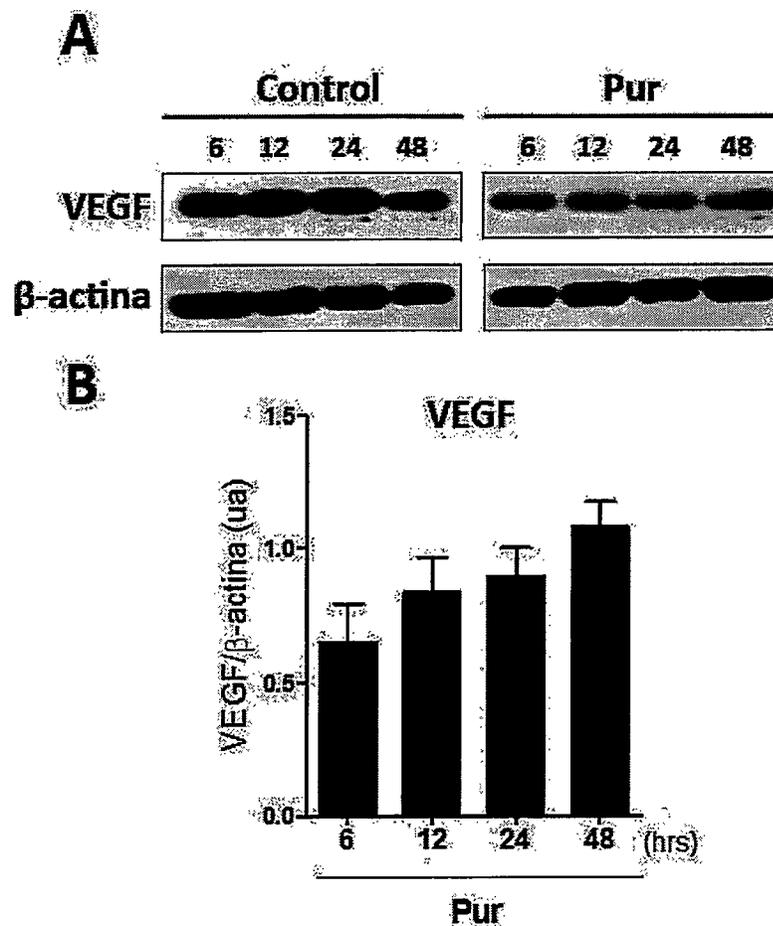


Figura 18. La estimulación de la vía SHH/GLI no induce la expresión de VEGF en WJ-MSC.

(A) Los niveles de VEGF no cambian en respuesta a la estimulación de WJ-MSC con el agonista Pur luego de 6-48 horas de tratamiento, resultado representativo de 4 muestras analizadas. Cuantificación del Western blot, se grafican los niveles de VEGF relativos a β -actina, utilizada como control de carga. (n= 4, Anova de una vía, *P < 0.05). **(B)** Cuantificación (n= 4, Anova de una vía, *P < 0.05).

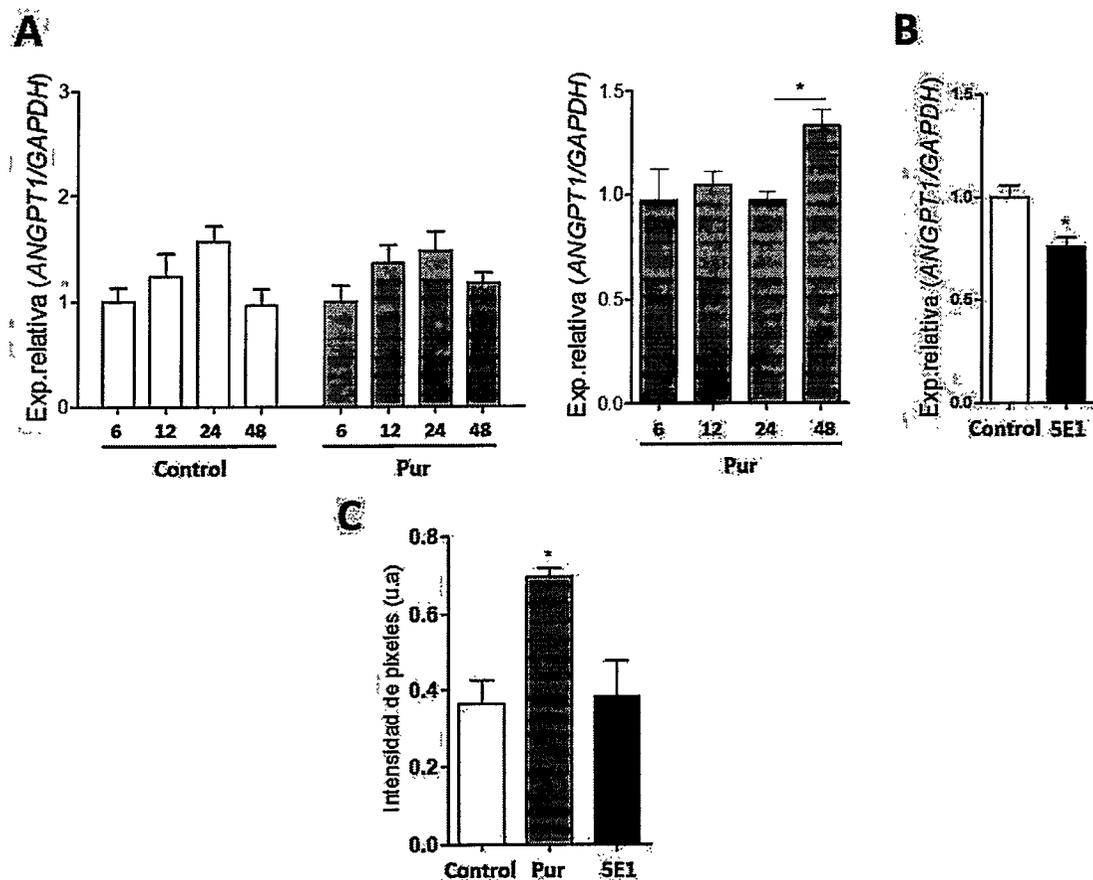


Figura 19. ANGPT1 es regulada por la vía SHH/GLI en WJ-MSC.

(A) Se grafica la expresión relativa de *ANGPT1* respecto de *GAPDH* para mostrar los niveles en la condición control y en respuesta a Pur. Se observa una variación en los niveles de transcrito de *ANGPT1* durante los tiempos estudiados. **(B)** Veces de inducción de *ANGPT1* respecto de *GAPDH*. Luego de 48 horas se observó un aumento significativo de los niveles del transcrito. **(C)** El bloqueo de la señalización con 5E1 disminuyó significativamente los niveles de *ANGPT1* luego de 48 horas de tratamiento ($n=3$, test de Student, $*p < 0.05$). **(D)** Pur estimula la secreción de *ANGPT1*, mientras que 5E1 no la inhibe significativamente, según fue determinado en el sobrenadante (MC) mediante *Proteome Profiler Array* ((A) y (C) $n=3$, Anova de una vía, $*P < 0.05$).

Estas evidencias confirman la modulación que ejerce la vía sobre las propiedades angiogénicas de las WJ-MSC, específicamente actuando sobre ANGPT1. Así, los resultados obtenidos con (MC+Pur) en el ensayo de formación de túbulos podrían explicarse en parte por la secreción aumentada de ANGPT1 y los obtenidos en (MC+5E1), por la disminución de VEGF. Sin embargo, no podemos descartar que la vía regule la expresión y secreción de otros factores relacionados con la angiogénesis que den cuenta del poder inductor del proceso que observamos en los sobrenadantes generados en presencia de Pur y 5E1. Por ello, determinamos los niveles secretados de otros factores con efecto pro- o anti-angiogénico en respuesta a la estimulación e inhibición de la vía y seleccionamos aquellos modulados por los tratamientos.

5.8. La estimulación de la vía SHH/GLI induce la secreción de múltiples agentes angiogénicos

La estimulación de la vía promovió la secreción de: Angiogenina, MMP-9, uPA, Activina A, GM-CSF, PDGF AA/BB, factores promotores de la angiogénesis, mientras que inhibió la secreción de Serpina E1, regulador negativo de uPA. A su vez, 5E1 inhibió la secreción de MMP-9, GM-CSF y HGF (Figura 20). Resultados que en su globalidad muestran que la estimulación de la vía induce la secreción de factores pro-angiogénicos que dan cuenta de la respuesta de las células endoteliales en el ensayo *in vitro* y que la señalización basal de la vía en WJ-MSC permite la expresión de ellos.

El análisis de estos factores angiogénicos nos indica que la función de la vía SHH/GLI sobre el potencial angiogénico de las WJ-MSC es más amplio del inicialmente planteado respecto de VEGF y ANGPT1. SHH jugaría un rol importante en modulación de la expresión y/o secreción de dichos factores de parte de las WJ-MSC, lo que sugiere que la vía sería un componente del nicho vascular *in vivo*, regulando el proceso angiogénico.

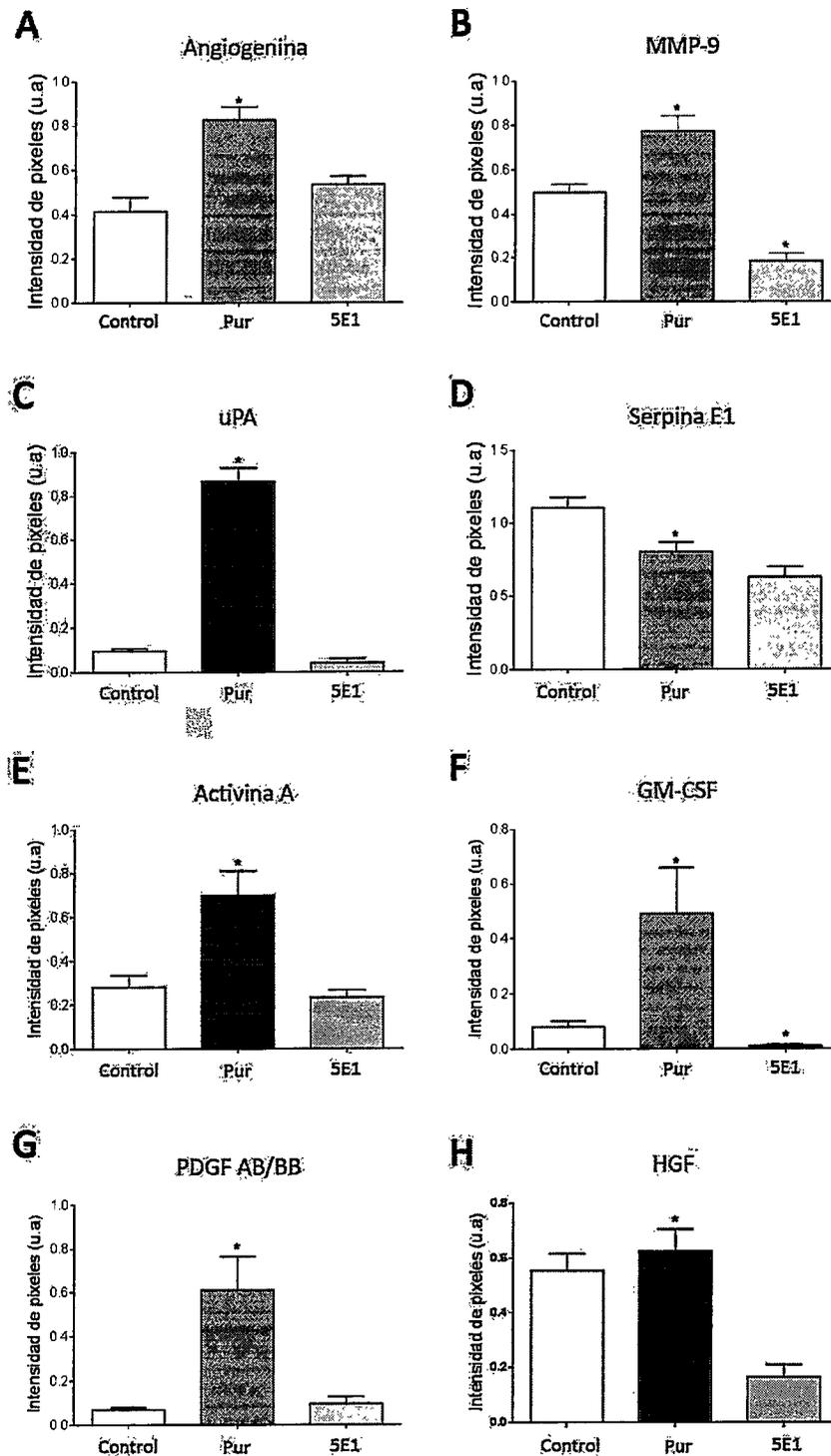


Figura 20. La estimulación de la vía SHH/GLI tiene un efecto global sobre la secreción de factores angiogénicos.

Se estudió el sobrenadante (MC) generado luego de 48 horas de tratamiento con el agonista Pur o el anticuerpo bloqueante de SHH 5E1 mediante el ensayo *Proteome profiler array*. Se determinó el efecto de la modulación de la vía sobre la secreción de (A) Angiogenina (B) MMP-9 (C) uPA (D) Serpina E1 (E) Activina A (F) GM-CSF (G) PDGF AB/BB (H) HGF. MC generados a partir de al menos 4 muestras distintas (n= 3, Anova de una vía, *P < 0.05).

6. La vía SHH/GLI regula el potencial angiogénico de WJ-MSC *in vivo*

La confirmación de que las propiedades angiogénicas de las WJ-MSC son observables *in vivo* se realizó mediante el ensayo de angiogénesis en la membrana corioalantoidea del embrión de pollo o ensayo CAM. Este ensayo es uno de los más ampliamente utilizados para la evaluación de la actividad angiogénica *in vivo* (Ribatti, D. y col. 2006; Deryugina, E. I. y Quigley, J. P. 2008). Para ello, los estímulos se ubicaron sobre la CAM y se observó la remodelación de la red vascular del anexo extraembrionario, utilizando como control positivo FGF2 recombinante y DMEM como control negativo.

La respuesta observada para FGF2 estuvo de acuerdo a lo esperado, ya que indujo la remodelación de la red vascular, donde los vasos preexistentes y aquellos generados por el efecto de FGF2 se tornaron hacia el estímulo. Luego de 4 días de tratamiento ya podemos ver que los vasos se orientan en un patrón del tipo “rayos de bicicleta” como se ha descrito en una respuesta angiogénica robusta, lo cual puede distinguirse en el acercamiento de la imagen (Figura 21A, A', F). Hacemos notar que observamos la generación de un tejido blanquecino en la zona del estímulo que sólo hemos detectado cuando hemos estudiado controles positivos como FGF2 o VEGF (no mostrado).

Por el contrario, la presencia de DMEM sobre la CAM, vehículo del sobrenadante de las WJ-MSC, no moduló la red y lo que observamos son aquellos vasos que cruzan el área de estímulo sin verse afectados en su trayectoria por éste (Figura 21B, B', F). El resultado está en concordancia con lo observado previamente, ya que DMEM carece de componentes que estimulen el proceso angiogénico, como fue indicado en el ensayo de formación de túbulos (Figura 16).

El sobrenadante (MC) indujo una respuesta angiogénica positiva, significativamente mayor a su control (DMEM). Observamos la generación de nuevos vasos de pequeño

calibre que se tornan hacia el estímulo y vasos de mayor calibre que se orientan hacia el mismo (Figura 21C, C', F), indicativo que las WJ-MSC secretan factores angiogénicos que actúan sobre la red vascular *in vivo*, modulando el proceso de forma positiva. El ensayo de formación de túbulos (Figura 16) nos indica que dichos factores podrían estar actuando sobre las células endoteliales de la CAM, sin embargo, no podemos descartar que los factores secretados actúen sobre otras poblaciones celulares presentes, tales como fibroblastos, células musculares, células murales, otras MSC, etc.

El sobrenadante generado en presencia de Pur (MC+Pur) indujo una respuesta angiogénica robusta, ya que observamos la remodelación de la red vascular, el ingreso de vasos hacia el estímulo y la formación de vasos de pequeño calibre. Esta respuesta fue significativamente mayor a lo observado con DMEM, sin embargo no lo fue comparado con MC (Figura 21D, D', F) al contrario de lo observado en el ensayo *in vitro* (Figura 22). Sin embargo, la respuesta angiogénica de (MC+Pur) no fue significativamente distinta a la respuesta inducida por FGF2, indicativo de la alta capacidad inductiva de este sobrenadante *per se*.

El sobrenadante generado en presencia de 5E1 (MC+5E1) indujo una respuesta angiogénica positiva en la red vascular, de similar magnitud a la observado en MC (Figura 21E, E', F). Este resultado no concuerda con lo observado en el ensayo de formación de túbulos (Figura 21), en donde (MC+5E1) sí demostró poseer menor potencial angiogénico que el control. Cabe destacar que obtuvimos una alta dispersión con los sobrenadantes generados en presencia de este agente bloqueante.

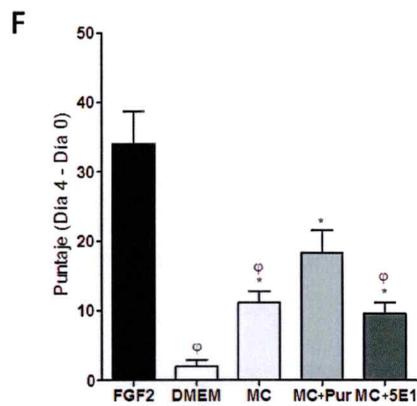
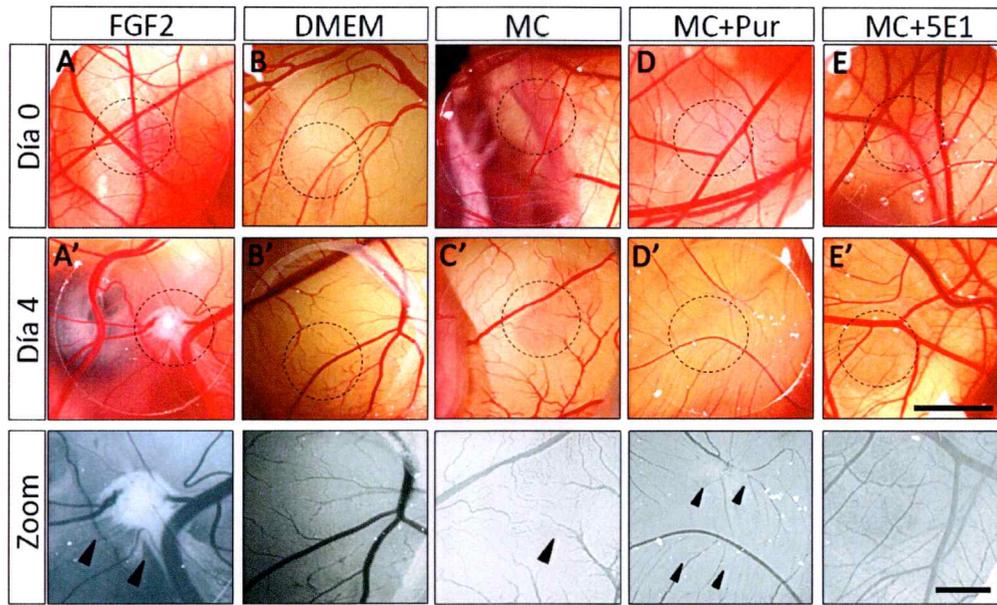


Figura 21. Las WJ-MSC inducen el proceso angiogénico *in vivo*.

(A-E) Imágenes representativas que muestran la CAM al momento del estímulo (Día 0) correspondiente al día embrionario 8 (E8), la línea punteada indica la zona del estímulo (A'-E') Luego de 4 días (E12), se han generado nuevos vasos sanguíneos hacia el estímulo y otros ya formados, se tornan hacia éste indicativo de la respuesta angiogénica. (F) Se determinó un puntaje inicial (E8) y uno final (E12) y la diferencia fue graficada como el efecto angiogénico total de cada estímulo. Se utilizaron los sobrenadantes (MC) de al menos 3 donantes distintos por cada condición (n= 3, Anova de una vía, *P < 0.05).

Los datos obtenidos nos permiten afirmar que las WJ-MSK poseen propiedades angiogénicas ya que secretan factores que modulan la red vascular a nivel de las células endoteliales (Figuras 12) y posiblemente, sobre otras poblaciones celulares (Figura 21). Así, las WJ-MSK formarían parte del nicho vascular como componente fundamental del estroma, actuando como una población celular de soporte de los vasos y también del estroma *per se*. La vía de SHH/GLI señala activamente en las WJ-MSK de forma autocrina y/o paracrina y regula positivamente la expresión y secreción de múltiples factores relacionados con la angiogénesis, supervivencia y migración celular, lo que confirma que la vía juega un papel preponderante en el nicho mesenquimático, en el estroma vascular y en el proceso de angiogénesis.

DISCUSIÓN

El establecimiento de la red vascular a través de la angiogénesis, es un proceso fundamental durante la morfogénesis en vertebrados ya que permite el flujo de sangre y, a través de ella, el transporte de nutrientes, gases, componentes del sistema inmune, desechos, entre otros, por todo el organismo. Aparte del papel decisivo de factores de crecimiento en procesos de proliferación, diferenciación y morfogénesis durante el desarrollo, algunos de éstos han sido recientemente indicados como factores angiogénicos. En este contexto diversos estudios han determinado un rol angiogénico para SHH. Sin embargo, los datos existentes son controversiales en cuanto a establecer una acción directa y/o indirecta para este morfógeno. Los resultados presentados en esta tesis pretenden hacer un aporte respecto del nivel de regulación que ejerce la vía SHH/GLI sobre el proceso angiogénico, actuando específicamente en el nicho vascular. Para abordar esta pregunta escogimos como modelo de estudio el cordón umbilical, ya que en éste encontramos los dos componentes celulares fundamentales en esta conversación: las WJ-MSC, como estroma y HUVEC, como células endoteliales.

Los trabajos de Pepilleci y Rowitch establecieron las primeras evidencias sobre la función de la vía SHH/GLI en el desarrollo vascular. El estudio de mutantes en componentes de la vía indicaron que la pérdida de función de ella interrumpe la correcta conformación de redes vasculares (Pepicelli, C. V. y col. 1998), mientras que la ganancia de función genera

una red vascular hiper-desarrollada y aberrante (Rowitch, D. H. y col. 1999). De ahí en adelante el estudio se ha desarrollado ampliamente, incluyendo a la vía SHH/GLI como un actor fundamental durante la formación del sistema vascular y en la angiogénesis.

La angiogénesis es fundamental en los procesos fisiológicos del adulto, requiriendo una acción coordinada de una variedad de factores de crecimiento, moléculas de adhesión, matriz extracelular, células endoteliales y el estroma. SHH frecuentemente induce la expresión de moléculas secretadas adicionales, creando así redes de señalización río debajo de la propia señalización de SHH. En esta tesis se abordó una de las funciones que ejerce la señalización de la vía en el proceso de angiogénesis, la cual es cómo la vía SHH/GLI modula la expresión y secreción de factores angiogénicos en el estroma vascular, los que a su vez actuarían sobre los vasos sanguíneos, específicamente sobre las células endoteliales, mediante señalización paracrina.

1. Relevancia de la señalización de SHH en el estroma vascular y tumoral

Las observaciones generadas en esta tesis doctoral hacen un aporte en el estudio de la angiogénesis no patológica, un área poco estudiada en cuanto a la participación de la vía de SHH. Respecto de las WJ-MSc, éstas conforman una población celular en la que a la fecha no se había descrito que ocurre señalización autocrina de SHH, asimismo, son pocos los reportes acerca de la expresión y actividad de SHH en MSC. Nosotros demostramos que las WJ-MSc no sólo expresan el ligando, sino que también lo secretan, demostrando que estas células son una fuente biológica de SHH. Nuestros datos se ven apoyados por otros autores (Li, F. y col. 2010) que plantean que la vía SHH se mantiene activa en un escenario fisiológico post-natal en el nicho vascular.

Nuestros resultados hacen un importante aporte dado que sabemos que la vía SHH está activa o desregulada en la isquemia y cáncer, respectivamente (Pola, R. y col. 2001; Chen,

W. y col. 2011) y ha sido pobremente estudiada en modelos no patológicos. En el contexto del cáncer, siempre ha existido la pregunta acerca de cuál es el origen del ligando que mantiene y potencia el crecimiento tumoral. Algunos autores creen que el estroma es un mero espectador siendo el tumor el que secreta el ligando, el cual actúa en el estroma promoviendo la expresión de factores que promoverán la mantención del crecimiento tumoral y su vascularización, tales como VEGF y MMP-9, entre muchos otros (Cao, X. y col. 2012). Asimismo, existen otros modelos en que el mismo estroma secreta SHH y de forma autocrina/paracrina es capaz de inducir la expresión de dichos factores promoviendo el mismo efecto potenciador del cáncer, como ocurre en algunos tipos de leucemias, mieloma múltiple y en la leucemia linfoblástica aguda (Dierks, C. y col. 2007; Hegde, G. V. y col. 2008; Lindemann, R. K. 2008), cáncer al pulmón (Bermudez, O. y col. 2013) y carcinoma colangiocelular, que afecta a los conductos hepatobiliares (El Khatib, M. y col. 2013).

Estos planteamientos cobran relevancia cuando analizamos nuestros datos. El estroma es un componente muchas veces considerado como poco definido debido a su complejidad estructural y celular, pero no debemos dejar de considerarlo ya que al parecer muchos de los procesos que estamos estudiando, tanto en angiogénesis en el contexto homeostático como en cáncer, están ocurriendo precisamente en este tejido.

2. SHH, un factor de nicho en el estroma

En esta tesis doctoral demostramos la señalización autocrina comandada por las WJ- MSC. Sin embargo, la señalización de SHH se ha estudiado mayormente en su papel de morfógeno en que la comunicación entre la fuente del ligando y la célula receptora es paracrina o juxtacrina, como ocurre durante en el desarrollo de estructuras dorsales del cerebro en mamíferos (Ruiz i Altaba, A. y col. 2002), en la estructuración del tubo neural (*patterning*) y en la formación de los miembros (Ingham, P. W. y McMahon, A. P. 2001; Hui,

C. C. y Angers, S. 2011). En comparación, se han descrito menos sistemas celulares en que la señalización de esta vía ocurre de forma autocrina, los que incluyen las HPLSC (*human periodontal ligament stem cell*) (Martinez, C. y col. 2011), NSC (*neural stem cell*) (Martinez, C. y col. 2013), DC (*thymic dendritic cells*) (Varas, A. y col. 2008) y en células murales vasculares componentes del estroma (pericitos y células musculares lisas) (Yao, Q. y col. 2014), lo que ha llevado a plantear la hipótesis de que SHH sería un factor de nicho fundamental para la mantención y proliferación de células troncales y progenitoras, y respecto de las WJ-MSC, sería un factor del nicho vascular.

En esta línea, se describió recientemente que SHH participa en el reclutamiento de las células murales hacia vasos en proceso de maduración, las que son atraídas por quimiotaxis por el PDGF-BB secretado por el endotelio. El avance celular es potenciado por SHH que es secretado por las células murales al cual responden de forma autocrina, activando la vía de PI3K γ y la fosforilación de AKT y ERK-1/2. De igual forma no se descarta que el ligando pueda provenir de otras fuentes celulares y que favorezcan la señalización paracrina (Yao, Q. y col. 2014). Además, SHH regula la proliferación de estas células (Li, F. y col. 2010), lo que remarca la relevancia de la vía y la señalización autocrina en el nicho vascular en una etapa post-natal.

La regulación transcripcional de *PTCH1* es indicativa de la actividad de la vía en WJ-MSC, algo que a la fecha no se ha descrito para otras poblaciones de MSC. Asimismo, observamos la regulación de *GLI1*, cuyo aumento se considera como indicativo *sine qua non* de que la vía está activa ya que la proteína representa al principal activador transcripcional de la vía. Estas evidencias indican que la estimulación de la vía genera una retroalimentación que la regula de forma positiva (*GLI1*) o negativa (*PTCH1*), sugiriendo un fino control de la señalización. La regulación de *GLI1* trae consigo además otras

conclusiones, ya que recientemente se ha indicado inclusive que este factor podría considerarse un marcador de las MSC perivasculares, como fue descrito para las MSC del nicho neurovascular del diente, en ratones (Zhao, H. y col. 2014).

3. La vía SHH modula el perfil de expresión de los factores angiogénicos VEGF y ANGPT1

3.1. SHH y la regulación de VEGF

El establecimiento de una señalización de la vía SHH/GLI en el nicho de las WJ-MSC nos llevó a analizar la regulación que esta vía ejercería sobre las propiedades angiogénicas de las WJ-MSC. En esta tesis analizamos en detalle los efectos de la modulación de la vía sobre la expresión de 2 factores angiogénicos clásicos: VEGF y ANGPT1.

VEGF es un factor relacionado clásicamente con la vía SHH/GLI, pero hay controversia en la literatura acerca de si la regulación es mediada directamente por los factores GLI.

Estudiamos los niveles de *VEGF*, e interesantemente, a las 48 horas de observación, los niveles fueron altos en la condición control, por lo cual existirían múltiples mecanismos que regulan la expresión de VEGF, incluyendo a la privación de suero, inductora de la expresión de factores angiogénicos (Oskowitz, A. y col. 2011), y fue el marco experimental utilizado en esa tesis.

El aumento del transcrito *VEGF* en respuesta a la actividad de la vía SHH, respecto de la activación transcripcional del gen reportero *PTCH1*, ocurre de forma paralela en el tiempo pero no se mantiene, esto, al ensayar en una ventana temporal similar a la descrita por Pola y col. en su trabajo original del 2001. Este grupo observó un patrón de expresión temporal similar, en que *Vegf* se expresa de forma temprana o paralela a *Ptch1*. Esta contemporaneidad indicaría la regulación equivalente de ambos genes, como genes de respuesta temprana en que GLI2 actúa como el activador transcripcional de la vía. Para

PTCH1 existiría una retroalimentación positiva a través de la expresión y activación por GLI1, mientras que este reforzamiento de la transcripción por GLI1 no ocurriría para *VEGF*. Asimismo, se han descrito otros factores río debajo de SHH que controlan la expresión de *VEGF*, como ocurre con COUPTF-II, como aclararemos a continuación.

Si *VEGF* es un gen regulado por la vía canónica debiésemos encontrar sitios de unión de los factores GLI (GBS) en las regiones regulatorias. En los primeros trabajos no se encontraron GBS en las regiones regulatorias de *VEGF*, pero la búsqueda se hizo utilizando las secuencias GBS canónicas. Actualmente se sabe que los GBS pueden diferir de las secuencias consenso clásicamente descritas en algunas posiciones (Winkimayr, M. y col. 2010) y eso fue lo que determinamos en nuestra búsqueda (datos no mostrados). Nuestro análisis arrojó la presencia de 8 GBS putativos no consenso: 2 en el intrón 1 y 6 en la región promotora. Por supuesto que la sola existencia de dichas secuencias no implica señalización canónica y la unión de GLI. Si éste no fuere el caso, *VEGF* podría ser regulado por la vía pero de forma independiente de GLI, como la que se describió para COUPTF-II (Krishnan, V. y col. 1997; Krishnan, V. y col. 1997). O bien, los sitios de unión a GLI se hacen disponibles en ciertas circunstancias específicas y dichos sitios, por alejarse del consenso presentan poca afinidad por GLI1 y por ello tGLI1, la forma truncada cancerígena, sí puede unirse a las regiones regulatorias y activar la transcripción. Sin embargo, tGLI1 sólo ha sido descrito en cáncer y no en tejidos sanos, quedando por definir si tGLI1 puede jugar un papel en homeostasis.

Nosotros no observamos un acoplamiento entre el aumento en el transcrito y la expresión de la proteína, por lo cual la pregunta que nos hicimos fue: ¿por qué ocurre este fenómeno?

La regulación de VEGF es compleja, tanto a nivel transcripcional como traduccional. En primer lugar, *VEGF* es un gen que es regulado por múltiples vías y en sus regiones regulatorias hay sitios de unión a varios factores de transcripción (Ortega, N. y col. 1999). A nivel de mensajero, su estabilidad depende de varios factores celulares, tales como la hipoxia y además, posee 2 secuencias IRES que permiten la traducción de VEGF sin necesidad de mecanismos CAP-dependientes (Arcondeguy, T. y col. 2013). Se ha reportado que los niveles de proteína pueden aumentar sin que esto vaya acompañado de un aumento en el RNAm, en condiciones de hiperoxia (Ekekezie, II y col. 2003) o hiperglicemia (Day, R. T. y col. 2010), lo que destaca que la regulación de la expresión de VEGF no sólo es compleja a nivel transcripcional sino que también traduccional y la estabilidad del RNAm parece ser relevante. La regulación del RNAm también ocurre a través de microRNAs. miRNA 16-1 inhibe la expresión de la proteína de VEGF en una línea de carcinoma humano (Karaa, Z. S. y col. 2009) y mirRNA15-a inhibe la expresión tanto de VEGF y FGF2 en células endoteliales (Yin, K. J. y col. 2012), por lo cual no podemos descartar que el aumento del transcrito de VEGF esté regulado por estos miRNAs y que por dicha razón no veamos aparejado un aumento de la proteína. Lo contrario ocurre con la baja en la expresión de VEGF, donde vemos una correlación entre la disminución en la expresión del RNAm y en la expresión de la proteína, que disminuye su secreción.

Nuestras observaciones indicarían que la vía SHH contribuiría a los niveles basales de VEGF en WJ-MSC, de ahí que no haya un aumento de VEGF en respuesta a la estimulación de la vía pero sí una disminución de VEGF en respuesta a la inhibición de la vía. Lo que refuerza el concepto de la compleja regulación de este factor y se ve apoyado con datos que demuestran que SHH estimula la expresión de VEGF en condiciones patológicas, como cáncer (Chen, W. y col. 2011; Cao, X. y col. 2012) e isquemia (He, Q. W. y col. 2013; Li, Y. y col. 2013), pero no la estimula en modelos no inmortalizados como las WJ-MSC.

Los rangos temporales indicarían que VEGF es un gen regulado por SHH/GLI cuando se inhibe su expresión. Entonces la represión de la expresión podría estar dada por la unión de GLI3R (represor) a los GBS descritos por nosotros mientras que la activación podría estar dada por GLI2 o COUPTF-II, como ocurre en la activación que ejerce SHH sobre la expresión de dicho factor en astrocitos, donde se demuestra que la expresión de Vegf depende de Couptf-ii y no de Gli1 río abajo de Shh (Li, Y. y col. 2013). Para comprobar o descartar esta hipótesis, hubiese sido necesario utilizar RNAi para *GLI1* o *GLI3* y *COUPTF-II* en WJ-MSc tratadas con farmacológicamente, lo que hubiese podido indicar de qué factor depende la modulación de VEGF por SHH.

3.2. SHH y la regulación de ANGPT1

Por su parte, la regulación de ANGPT1 corresponde a la de un gen regulado por la vía SHH canónica a través de efectores GLI. Tanto la estimulación como la inhibición de la vía terminan con el aumento y la disminución del transcrito luego de 48 horas de tratamiento, respectivamente. Asimismo, la proteína sí aumenta en respuesta a la vía y se secreta en mayor magnitud que el control. Sin embargo, no observamos una respuesta robusta en la inhibición en la expresión de la proteína, posiblemente debido a la alta dispersión obtuvimos con el inhibidor utilizado.

ANGPT1 tampoco ha sido ampliamente estudiado como blanco de la vía, se ha asumido como blanco de GLI por las antecedentes ya descritos, tanto en condiciones normales (Pola, R. y col. 2001; Lee, S. W. y col. 2007; Fujii, T. y Kuwano, H. 2010) como patológicas (Nakamura, K. y col. 2010). Nuestro análisis *in silico* muestra la existencia de 13 sitios de unión a GLI de las cuales 3 de ellas son secuencias consenso (datos no mostrados). Aunque esta información no asegura que ANGPT1 es un blanco de los factores GLI, los antecedentes de la literatura más nuestros resultados indican que ANGPT1 es un blanco directo de la vía

SHH/GLI. Será necesario realizar el análisis bioquímico y molecular para indicar la dependencia de GLI. Pero similar a lo que ocurre con VEGF, no podemos descartar que la modulación de este factor en respuesta a SHH sea también dependiente de COUPTF-II, como fue descrito en astrocitos (Li, Y. y col. 2013).

4. La vía de SHH/GLI regula las propiedades angiogénicas de las WJ-MSc

La estimulación que ejerce la vía sobre ANGPT1 da cuenta, en parte, que el potencial angiogénico de las WJ-MSc es regulado por SHH, pero dado que éste es un factor de nicho, no es raro que la vía regule la expresión de otras vías relacionadas con la homeostasis tisular, lo cual queda demostrado en los ensayos de angiogénesis *in vitro*.

El sobrenadante generado en condiciones de activación de la vía induce un aumento en la capacidad angiogénica de éste, explicado por el aumento en la expresión de factores relacionados con el proceso. Dichos factores actúan sobre las células endoteliales estimulando las propiedades de migración e interacción célula-célula, lo cual es novedoso ya que esta propiedad sólo había sido mostrada para líneas tumorales que, estimuladas con SHH, son capaces de secretar factores que promueven la angiogénesis tumoral y la migración de células endoteliales y cancerígenas (Teglund, S. y Toftgard, R. 2010; Nakamura, K. y col. 2010; Cao, X. y col. 2012). Lo cual está en concordancia con los sobrenadantes generados en condiciones de pérdida de función, ya que esta inhibición disminuyó significativamente la acción pro-angiogénica del medio, reafirmando el concepto que la vía regula la capacidad angiogénica de las WJ-MSc.

Dentro de los factores estimulados por la vía SHH nos parece importante destacar:

Angiogenina, es una ribonucleasa que promueve la angiogénesis actuando sobre las células endoteliales, promoviendo migración celular, proliferación y formación de

estructuras tubulares (Gao, X. y Xu, Z. 2008) y a la fecha no se ha reportado como regulada por SHH. Al igual que Activina A, otro blanco identificado en esta tesis, juega un papel positivo o negativo en la angiogénesis, según sea una condición normal o patológica. Además se ha reportado que la vía de la Activina A participa de la regulación del ciclo celular de las MSC derivadas de tejido adiposo (Plaisant, M. y col. 2011), lo cual a la fecha sin embargo no ha sido determinado para las aisladas desde la gelatina de Wharton, lo que podría significar otro nivel de regulación de la vía SHH en MSC a través del control del ciclo celular.

Por otra parte, MMP-9 (*Matrix Metalloproteinase 9*), sí ha sido descrita como blanco de SHH, pero sólo en condiciones patológicas (Bailey, J. M. y col. 2009; Yoo, Y. A. y col. 2011). Esta enzima metalopeptidasa que degrada varias proteínas de la membrana basal (Egeblad, M. y Werb, Z. 2002), de acuerdo a nuestros resultados, también promovería la angiogénesis en condiciones no patológicas al ser blanco de la vía en WJ-MSC.

uPA (*urokinase Plasminogen Activator*), es una proteasa cuyo principal sustrato es el plasminógeno, forma inactiva de la plasmina. Nuestros resultados indican que la vía podría regular la actividad de plasmina a través de uPA y Serpina E1. La plasmina actúa favoreciendo la angiogénesis directamente al participar en la degradación de la matriz extracelular. Sobre la regulación de plasmina por la vía de SHH sólo se sabe que la estimulación de células endoteliales cerebrales murinas (BMEC, *mouse brain endothelial cell*) induce el aumento en la expresión y secreción de tPA (*tissue plasminogen activator*) otro activador del plasminógeno, de similar actividad de uPA, y en concordancia, disminuye la expresión y actividad de PAI-1 (*plasminogen activator inhibitor*), sin modificar la expresión y actividad de uPA (Teng, H. y col. 2012). Estos resultados no sólo sugieren que la vía SHH regula la activación del plasminógeno y los eventos que se desencadenan río debajo de la

generación de plasmina, sino que también muestra que según el contexto celular la vía se vale de distintos activadores/inhibidores para realizar esta regulación.

GM-CSF (*granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*) es una citoquina importante en el linaje hematopoyético y también es un modulador de la inmunidad. Pero además puede participar del proceso angiogénico induciendo la formación de estructuras tubulares en células endoteliales mediante la señalización de PI3K (Dhar-Mascareno, M. y col. 2005). Nuestros resultados indican que es un gen regulado por la vía SHH/Gli ya que tanto la estimulación como la inhibición de la vía regulan la secreción de esta citoquina, lo que nos hace reconocerlo como un nuevo factor regulado por la vía no descrito hasta esta tesis doctoral.

PDGF-AB/BB es un factor angiogénico que es estimulado por la vía y promueve la proliferación de células endoteliales, promoviendo la angiogénesis pero el papel más destacado que posee en el proceso, es permitir la atracción de células murales para dar estabilidad a vasos recientemente generados. Los reportes indican que hay una estrecha interacción entre la señalización de los factores PDGF y la de SHH en la maduración de vasos sanguíneos, ya que SHH participa en la migración de células murales inducida por PDGF-BB al aumentar la motilidad de ellas, mientras que PDGF-BB determina la dirección del movimiento. Asimismo, PDGF-BB puede inducir la expresión de SHH en las células murales (Yao, Q. y col. 2014).

HGF (*Hepatocyte Growth Factor*) estimula la proliferación y migración de células endoteliales, y 5E1 disminuye sus niveles, por lo tanto, la vía SHH/Gli puede estimular la angiogénesis activando algunas vías específicas, pero no todas. Este factor ha sido descrito como posible blanco de la vía en cáncer, en donde el SHH secretado por el tumor estimula la expresión de HGF (junto a otros factores) en las células estromales perivasculares, a

diferencia de nuestros resultados en que la estimulación no generó un aumento. Sin embargo, la inhibición de la vía sí promovió la disminución de la secreción, indicando que este factor podría ser un factor preponderante en la angiogénesis inducida por SHH en el contexto tumoral (Chen, W. y col. 2011).

Estos resultados en su globalidad nos indican que SHH es un factor de nicho, ya que estaría modulando la secreción de factores variados, promoviendo la angiogénesis y otros procesos relacionados con reparación tisular a través de la activación de distintas vías de señalización río debajo de SHH.

5. Interacción entre SHH y FGF2

Las vías de SHH y FGF2 parecen encontrarse y cruzarse en algunos eventos celulares relacionados con la angiogénesis. Pola y col. demostraron que la activación de la vía y el aumento en la expresión de *Ptch1* ocurrió en paralelo con la baja en la expresión de *Fgf2* en fibroblastos (Pola, R. y col. 2001). Por otra parte, el aumento en la expresión de *ANGPT1* inducida por SHH en células MRC5 fue abolida cuando las células fueron estimuladas a la misma vez con FGF2 (Fujii, T. y Kuwano, H. 2010). Evidencias concordantes con nuestros resultados, donde el aumento del transcrito de *PTCH1* se acompaña de una disminución de *FGF2*.

La interacción entre FGF2 y SHH no se remite al estroma, ya que ambas vías coinciden en otros contextos fisiológicos. En progenitores neurales granulares (GNPs) y meduloblastoma, FGF2 inhibe la señal proliferativa de SHH (Fogarty, M. P. y col. 2007) y la señal de SHH se ve bloqueada por FGFR2 en el folículo piloso en desarrollo (Mukhopadhyay, A. y col. 2013). Estas evidencias sugieren SHH y FGF2 actuarían de forma excluyente, mientras que existiría cooperación entre SHH y otros miembros de la familia FGF, como ocurre con FGF8, ya que ambas vías actuarían sinérgicamente en la formación

de cartílago en el desarrollo craneal (Abzhanov, A. y Tabin, C. J. 2004) y en la determinación de neuronas dopaminérgicas y serotoninérgicas en la placa neural anterior (Ye, W. y col. 1998).

La regulación negativa de *FGF2* en circunstancias de estimulación de la vía SHH puede parecer paradójica ya que la activación transcripcional por lo general implica la inducción y no la represión génica. Los mecanismos detrás de la regulación negativa por parte de la vía SHH/GLI aún no han sido descritos, pero la relación temporal similar entre las respuestas de *PTCH1* y *FGF2* sugiere que ambos genes son regulados por los factores GLI. Este tipo de regulación ha sido descrita en el contexto de los co-receptores de SHH, ya que *Cdo*, *Boc* y *Gas1* son genes regulados negativamente por la vía SHH, con la coincidencia que los 3 son moduladores positivos de la señalización de SHH/GLI. De ahí que el paradigma es que en células que pueden responder a la vía, tanto *PTCH1* como *Cdo* y *Boc* (McGlinn, E. y col. 2005; Tenzen, T. y col. 2006) y *Gas1* (Allen, B. L. y col. 2007) se expresan y facilitan la unión del ligando. Una vez está activa, se promueve la expresión de reguladores negativos como *PTCH1* y *HHIP* y se reprime la expresión de los reguladores positivos *Cdo*, *Boc* y *Gas1*, de forma tal que se modula finamente la respuesta al ligando (Allen, B. L. y col. 2007; Bergeron, S. A. y col. 2011). Sin embargo, de estos trabajos no es posible evaluar la temporalidad ni el mecanismo de esta regulación ya que las evidencias fueron obtenidas comparando la expresión de los co-receptores entre animales silvestres versus mutantes (*Ptch1*^{-/-} y *Smo*^{-/-}), donde la activación constitutiva de la vía abolió la expresión de dichos factores. Asimismo, aún no contamos con los antecedentes suficientes para explicar cómo la activación de la vía en WJ-MSD conlleva a la disminución en la expresión de *FGF2*.

6. Las WJ-MSc secretan factores angiogénicos

Las MSC secretan factores relacionados con la reparación tisular (Sobolewski, K. y col. 2005; Wu, Y. y col. 2007) y las WJ-MSc presentan un secretoma más enriquecido en factores angiogénicos que otras MSC (Hsieh, J. Y. y col. 2010; Hsieh, J. Y. y col. 2013). Cuando analizamos en detalle los perfiles secretados de cada muestra, nos llamó de inmediato la atención que éstos fueron distintos en algunas moléculas, que además, coinciden con las descritas recientemente en otro trabajo (Choi, M. y col. 2013). El enriquecimiento diferencial de factores de cada muestra nos indicó que los sobrenadantes podrían ser angiogénicos en distintas magnitudes. Con independencia que las muestras humanas suelen ser heterogéneas y distintas entre sí, creemos que en el caso del cordón umbilical hay factores fisiológicos que podrían explicar dichas diferencias.

Una explicación es que sutiles diferencias temporales en el momento del parto (en embarazos de término) influyan en la señalización de algunas vías, como SHH/GLI. O bien, algún evento fisiológico determinó cambios en cada cordón, como podría ocurrir con eventos hipóxicos o relacionados con cambios de presión durante el embarazo y/o el parto.

En embarazadas con preeclampsia existe una alteración en la secreción de algunos factores, tales como sVEGFR1 (Mutter, W. P. y Karumanchi, S. A. 2008) y TGF β (Copland, I. B. y col. 2002) por parte de los anexos embrionarios, lo que se puede determinar en la sangre de las madres (Mutter, W. P. y Karumanchi, S. A. 2008). A pesar que las muestras estudiadas en esta tesis provinieron de madres sanas (validado por su ficha médica), estos antecedentes nos permiten plantear que alteraciones durante el embarazo pueden modificar el perfil de expresión de factores angiogénicos.

Respecto de los factores en que detectamos diferencias entre muestras, todos ellos son regulados por hipoxia: Angiogenina (Hartmann, A. y col. 1999), HGF (Chu, S. H. y col. 2009),

IGFBP-3 (Natsuizaka, M. y col. 2012), IL-8 (Karakurum, M. y col. 1994), Factor de Coagulación III (Rong, Y. y col. 2005), Pentraxina-3 (Osorio-Conles, O. y col. 2011) de forma positiva y Endostatina (Wu, P. y col. 2001) y ANGPT1 (Enholm, B. y col. 1997) de forma negativa, éste último también disminuye en respuesta a hipoxia en WJ-MSC (dato no mostrado). Por ello, estos datos apoyan la hipótesis de que la disminución en los niveles de O_2 en el cordón umbilical es la causa de esta expresión diferencial.

La mentada diversidad entre muestras de MSC de distintos donantes se ha hecho patente a nivel terapéutico mediante los estudios realizados por el “MSC Consortium” de la FDA de EEUU (*U.S Food and Drug Administration*) (Mendicino, M. y col. 2014). Esta agencia norteamericana, en vista del potencial uso de las MSC en terapia celular, ha conformado un grupo de investigación que busca unificar los protocolos de obtención, expansión y uso en clínica, y en sus estudios han descrito diferencias en MSC obtenidas desde médula ósea respecto del potencial de diferenciación y proliferación de distintas muestras (Lo Surdo, J. y Bauer, S. R. 2012), expresión de proteínas, factores de crecimiento (Mindaye, S. T. y col. 2013) y moléculas de superficie (Mindaye, S. T. y col. 2013), con estudios adicionales en desarrollo en este momento, lo cual demuestra de forma empírica la heterogeneidad de las muestras humanas.

6.1. Rol de la hipoxia en la expresión de factores angiogénicos

La hipoxia se define como la exposición a bajos niveles de O_2 , mientras que la normoxia corresponde a las condiciones atmosféricas ambientales. La presión de O_2 en los anexos embrionarios es de 1.5-8% (Lavrentieva, A. y col. 2010), mucho menor que el nivel que las células detectan en el cultivo *in vitro*, un 21%. La hipoxia en sí, es el mayor inductor fisiológico de angiogénesis, por lo cual ¿es posible que las células en el cordón, al detectar

bajos niveles de O₂, estén secretando altos niveles de los factores citados? y ¿por qué estos niveles de secreción siguen viéndose en cultivo?

Es posible que los bajos niveles de O₂ a los que se ven expuestos los anexos embrionarios durante el embarazo o eventos puntuales durante el trabajo de parto generen periodos hipóxicos, debido a las contracciones uterinas y la disminución en el flujo en la placenta (Armstrong, L. y Stenson, B. J. 2007; Martin, C. B., Jr. 2008) los cuales podrían inducir cambios en las WJ-MSK y por ello, algunas muestras secretan más factores angiogénicos que otros. Pero para ello, la hipoxia debiese generar cambios permanentes o de largo plazo en los promotores de estos genes para poder observar estas diferencias más allá de los primeros subcultivos. Esta situación sí ocurre en algunas circunstancias, como en el cáncer, donde la hipoxia juega un papel preponderante en el desarrollo temprano de los tumores. La hipoxia induce cambios epigenéticos en los promotores de algunos genes gracias a la modificación de histonas (Lu, Y. y col. 2011; Perez-Perri, J. I. y col. 2011).

Estos cambios epigenéticos inducidos por hipoxia no han sido descritos para componentes celulares de los anexos embrionarios, pero sí se ha indicado que otras alteraciones en el embarazo pueden generar cambios en el feto que serán mantenidos en su desarrollo post-natal, como ocurre en madres con obesidad que dan a luz bebés con alto riesgo de desarrollar síndromes metabólicos o daño cardiovascular (Sookoian, S. y col. 2013). También se ha observado en la unidad feto-placentaria, donde se han descrito modificaciones diferenciales de las histonas entre distintas muestras, como ha sido estudiado en el endotelio del cordón umbilical (Casanello, P. y col. 2014).

No hay reportes que indiquen que la hipoxia puede generar efectos a largo plazo en las MSK, sin embargo, la teoría indica que podría ser así ya que en el ámbito de la medicina regenerativa, la inducción de hipoxia *in vitro* ha sido una estrategia utilizada para potenciar

las propiedades terapéuticas de las MSC cuando son utilizadas *in vivo* (Muscari, C. y col. 2013; Park, I. H. y col. 2013).

La baja tensión de O₂ en el cordón también podría explicar por qué las WJ-MSC secretan mayor riqueza de factores angiogénicos que otras MSC, ya que las MSC adultas están expuestas a mayores niveles de O₂ (1-7% en las BM-MSC y 10-15% en AT-MSC) (Edwards, S. S. y col. 2014; Lavrentieva, A. y col. 2010). Esta característica ya fue demostrada en modelos *in vivo* por nuestro grupo (Edwards, S. S. y col. 2014), donde las WJ-MSC demostraron no sólo poseer un perfil de factores secretados más angiogénico que MSC derivadas de tejido adiposo, sino que también promueven el proceso de vascularización *in vivo* con mayor eficacia que otras MSC.

7. Actividad de la vía SHH/GLI en el cordón

Si la vía SHH/GLI ha sido poco abordada en las MSC, también es el caso de su estudio en el cordón umbilical. Algunos trabajos destacan la expresión de los componentes de la vía pero poco se sabe de su localización o su función (Weiss, M. L. y col. 2006; Stunkel, W. y col. 2012). Sin embargo, hay evidencias que muestran la expresión de los transcritos de *Shh* y *Ptch1* durante estadíos tempranos del desarrollo embrionario en ratón (E13.5) (Sagai, T. y col. 2009).

En uno de los estudios mencionados, se analizó la expresión de los genes más abundantes en el cordón umbilical humano e incluyó a *SHH* como uno de ellos, junto a *PTCH1* (Weiss, M. L. y col. 2006). Sin embargo, no ha sido abordado aún cual es el papel de la señalización de esta vía en el crecimiento y/o funcionamiento del cordón umbilical.

En un caso de holoprosencefalia (HPE) causada por haploinsuficiencia de SHH, se reportaron las alteraciones clásicas (separación incompleta de los hemisferios cerebrales)

junto con alteraciones en la estructura del cordón umbilical, ya que en lugar de generarse 3 vasos sanguíneos, sólo se desarrollaron 2 (Nanni, L. y col. 1999). Sumado a esto, otro trabajo indica que en la región posterior de la gástrula de ratón hay señalización de la vía, lo que sugirió a los autores que SHH podría participar del correcto desarrollo de los vasos y de la morfogénesis del cordón en mamíferos (Daane, J. M. y Downs, K. M. 2011).

Asimismo, un estudio comparó la expresión génica de los componentes de la vía SHH en cordones umbilicales provenientes de embarazos en 2 momentos del desarrollo (temprano: 35-37 semanas versus tardío: 38-40 semanas) y mostró que dentro de los genes más representados estaban los componentes de la vía SHH: *SMO*, *GLI2* y *GLI3*. No sólo eso, sino que la expresión de estos genes disminuyó en el grupo de embarazo más avanzado, indicativo que existiría una correlación entre el desarrollo del embarazo y una disminución en la expresión de los componentes de la vía, y por ende, con una disminución de su actividad. La baja en la actividad se demostró experimentalmente por la disminución en la expresión de genes blanco de la vía, participantes del proceso de osteogénesis, tales como *RUNX2*, *PITX1* y *MATN3* (Stunkel, W. y col. 2012).

Ambas evidencias implican que la vía SHH participaría del desarrollo del cordón umbilical y sus vasos, pero la actividad disminuye acorde acontece el desarrollo intrauterino, lo que sugiere que la actividad de la vía puede ser desigual en distintos cordones aunque hayan diferencias mínimas en las semanas en que ocurrió el parto. Ya que aunque nuestras muestras provengan de embarazos de término, algunos días o semanas de diferencia entre el momento del parto, podrían hacer la diferencia con respecto a la expresión de los componentes de la vía y al grado de señalización de ella.

Por tanto, planteamos que los componentes de la vía SHH/GLI están presentes en el cordón y posiblemente, la misma se encuentre activa, pero el nivel de actividad dependería

del estadio del desarrollo de cada embarazo. Esta hipótesis se ve apoyada por los estudios de Schroeder y col. que establecieron distintos patrones de metilación según la edad gestacional en sangre de cordón umbilical, considerando muestras provenientes de embarazos de término temprano y tardío (32-43 semanas). En esta estrecha ventana temporal fueron capaces de determinar abundantes cambios en los promotores de genes relacionados con el embarazo (*TGFB3*, *CRHBP*, *OXT*), respuesta a hormonas (*ESR1*, *OXT*, *CASP8*), coagulación sanguínea (*TGFB3*, *GP1BB*, *GP9*) y desarrollo embrionario (*TGFB3*, *GLI3*, *MBNL1*) entre muchos otros. En el caso específico de *GLI3*, se observó una disminución en la metilación del promotor, lo que sugiere una mayor actividad transcripcional de este gen. No olvidemos que *GLI3* es un clásico represor de la vía SHH/GLI, por lo que esta observación apoya la idea de un apagamiento en la señalización de la vía a medida que acontece el embarazo.

Sumado a ello, se ha descrito un dominio de señalización de la vía SHH/GLI en la adventicia de los vasos sanguíneos, en etapas embrionarias tardías y postnatales, pero ausente en la adultez en mamíferos (Majesky, M. W. y col. 2011). La adventicia es la capa más externa de un vaso sanguíneo, y contiene diversas poblaciones celulares: fibroblastos, macrófagos, células dendríticas y células madre y/o progenitoras. La mantención de las células progenitoras vasculares Sca-1 (*Stem cell antigen-1*) en este nicho depende de la señalización de SHH (Passman, J. N. y col. 2008). Estas evidencias demuestran que SHH es un componente fundamental en el nicho vascular. Si llevamos este modelo al cordón umbilical, donde no hay adventicia, es la gelatina de Wharton la que ejerce esta función ya que sostiene físicamente a los 3 vasos (Takechi, K. y col. 1993). Haciendo el símil, las WJ-MSK habitan en esa adventicia, secretan SHH y responden de forma autocrina. Si bien hay evidencias de que las MSC podrían ser o diferenciarse hacia células murales (pericitos) (Kolf, C. M. y col. 2007), el símil no es completo, ya que la función de la vía sí podría ser de

mantener a las WJ-MSC, de lo cual no hay evidencias. Los antecedentes indican las WJ-MSC secretan y responden a factores involucrados en la mantención de la matriz extracelular (Sobolewski, K. y col. 2005) mediante la secreción de colágeno, glicosaminoglicanos, entre otros y que esos factores también podrían actuar de forma juxtacrina sobre las poblaciones celulares de los vasos umbilicales a lo cual sumamos la secreción de SHH que podría cooperar en dichas funciones.

En síntesis, las observaciones generadas en esta tesis doctoral nos permiten proponer el siguiente modelo de trabajo:

En la red vascular del cordón (y así también en otros vasos), la integridad depende de una coordinada conversación entre el endotelio y al tejido estromal circundante. Dicha conversación está mediada mediante factores solubles que ejercen efectos pro o anti-angiogénicos. Esta conversación estaría modulada por una vía de señalización río arriba de tales factores, la vía de SHH. Este ligando es secretado por las WJ-MSC (no se descarta que también lo sea por otros tipos celulares) y éstas responden de manera autocrina/paracrina a él, modulando a su vez la expresión de moléculas relacionadas con la angiogénesis.

Esta conversación podría estar ocurriendo en el cordón umbilical, en donde la vía podría participar de la formación y mantención de la integridad vascular de las arterias y la vena durante todo el proceso de desarrollo embrionario/fetal. Esta observación podría ser extrapolada a otros vasos del cuerpo, haciendo del cordón umbilical un modelo idóneo para el estudio de la comunicación entre el endotelio y el tejido estromal.

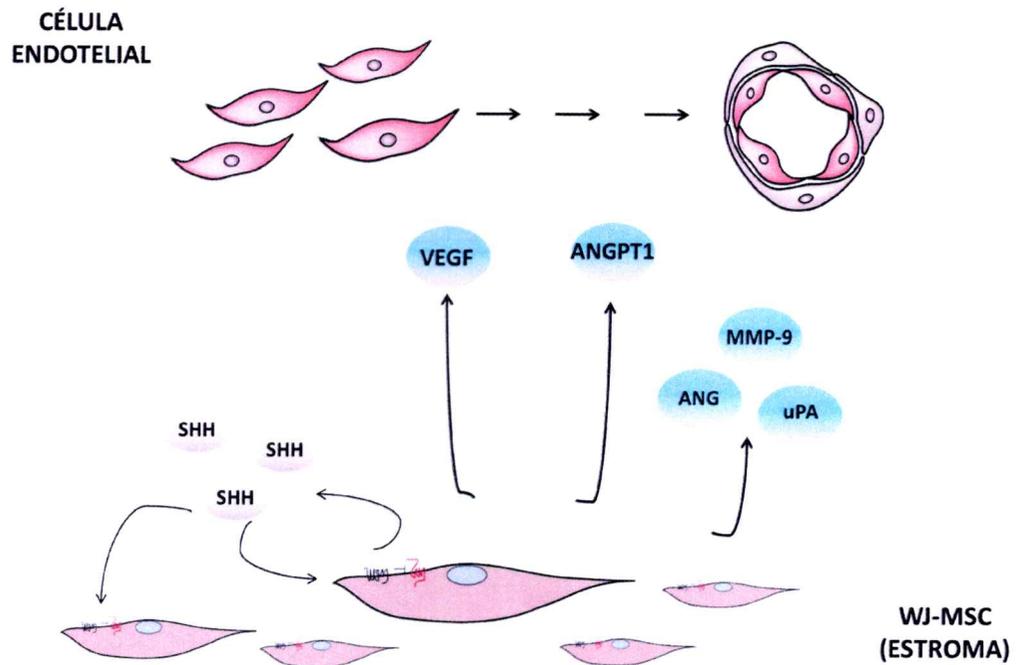


Figura 22. Modelo de trabajo.

En la angiogénesis ocurre una conversación coordinada entre el endotelio y el estroma que le rodea. Esta comunicación, mediada por factores solubles es modulada por la vía SHH, activa en el estroma. Las WJ-MSC secretan SHH y responden a él, de forma autocrina y/o paracrina y en respuesta al ligando se modula la secreción de factores tales como ANGPT1, ANG, MMP-8, uPA, los que se suman a otro rico conjunto de factores que secretan las WJ-MSC, como VEGF. Los factores secretados actúan sobre las células endoteliales y los vasos sanguíneos promoviendo la angiogénesis y la mantención de la red vascular.

CONCLUSIONES

Las WJ-MSc corresponden a una población celular heterogénea aislada desde el estroma del cordón umbilical, donde forman parte del estroma vascular. SHH es un factor de nicho y modula las propiedades angiogénicas de las WJ-MSc.

Las WJ-MSc son una fuente de este ligando y responden a él de forma autocrina, regulando procesos relacionados con la angiogénesis a través de la modulación de la expresión de diversos factores de crecimiento con propiedades angiogénicas. Los resultados obtenidos en esta tesis demuestran la existencia de la actividad de esta vía de señalización en el estroma celular no patológico, aportando a la comprensión de la regulación de factores preponderantes en el proceso, como son VEGF y ANGPT1, entre otros. Resultados que pueden entenderse en el contexto de la biología del nicho vascular, así como también pueden ser aprovechados en el campo de la medicina regenerativa, ya que la activación de esta vía en las WJ-MSc puede modificar y aumentar sus propiedades terapéuticas.

Nuestros resultados destacan la relevancia de la señalización de SHH en el estroma, reafirmando la cualidad de agente angiogénico indirecto de este morfógeno en condiciones no patológicas. Sin embargo, aún se requiere seguir avanzando en el estudio para definir si estos procesos son mediados por los factores GLI u otros y si esta señalización se mantiene en el nicho vascular del adulto, con las aplicaciones terapéuticas que podrían desarrollarse.

BIBLIOGRAFÍA

- Abzhanov, A. and C. J. Tabin (2004). "Shh and Fgf8 act synergistically to drive cartilage outgrowth during cranial development." *Dev Biol* **273**(1): 134-148.
- Allen, B. L., T. Tenzen, et al. (2007). "The Hedgehog-binding proteins Gas1 and Cdo cooperate to positively regulate Shh signaling during mouse development." *Genes Dev* **21**(10): 1244-1257.
- Arcondeguy, T., E. Lacazette, et al. (2013). "VEGF-A mRNA processing, stability and translation: a paradigm for intricate regulation of gene expression at the post-transcriptional level." *Nucleic Acids Res* **41**(17): 7997-8010.
- Armstrong, L. and B. J. Stenson (2007). "Use of umbilical cord blood gas analysis in the assessment of the newborn." *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* **92**(6): F430-434.
- Arno, A. I., S. Amini-Nik, et al. (2014). "Human Wharton's jelly-mesenchymal stem cells promote skin wound healing through paracrine signaling." *Stem Cell Res Ther* **5**(1): 28.
- Bailey, J. M., A. M. Mohr, et al. (2009). "Sonic hedgehog paracrine signaling regulates metastasis and lymphangiogenesis in pancreatic cancer." *Oncogene* **28**(40): 3513-3525.
- Bergeron, S. A., O. V. Tyurina, et al. (2011). "Brother of cdo (umleitung) is cell-autonomously required for Hedgehog-mediated ventral CNS patterning in the zebrafish." *Development* **138**(1): 75-85.
- Bermudez, O., E. Hennen, et al. (2013). "Gli1 mediates lung cancer cell proliferation and Sonic Hedgehog-dependent mesenchymal cell activation." *PLoS One* **8**(5): e63226.
- Bijlsma, M. F., K. S. Borensztajn, et al. (2007). "Sonic hedgehog induces transcription-independent cytoskeletal rearrangement and migration regulated by arachidonate metabolites." *Cell Signal* **19**(12): 2596-2604.
- Briscoe, J. and P. P. Therond (2013). "The mechanisms of Hedgehog signalling and its roles in development and disease." *Nat Rev Mol Cell Biol* **14**(7): 416-429.
- Bustin, S. A., V. Benes, et al. (2005). "Quantitative real-time RT-PCR--a perspective." *J Mol Endocrinol* **34**(3): 597-601.
- Cao, X., J. Geradts, et al. (2012). "Upregulation of VEGF-A and CD24 gene expression by the tGLI1 transcription factor contributes to the aggressive behavior of breast cancer cells." *Oncogene* **31**(1): 104-115.
- Carmeliet, P. (2005). "Angiogenesis in life, disease and medicine." *Nature* **438**(7070): 932-936.
- Carmeliet, P. and D. Collen (1998). "Vascular development and disorders: molecular analysis and pathogenic insights." *Kidney Int* **53**(6): 1519-1549.
- Carmeliet, P., V. Ferreira, et al. (1996). "Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele." *Nature* **380**(6573): 435-439.
- Carmeliet, P., N. Mackman, et al. (1996). "Role of tissue factor in embryonic blood vessel development." *Nature* **383**(6595): 73-75.
- Carney, T. J. and P. W. Ingham (2013). "Drugging Hedgehog: signaling the pathway to translation." *BMC Biol* **11**: 37.
- Casanello, P., D. Schneider, et al. (2014). "Endothelial heterogeneity in the umbilico-placental unit: DNA methylation as an innuendo of epigenetic diversity." *Front Pharmacol* **5**: 49.
- Clapp, C., S. Thebault, et al. (2009). "Peptide hormone regulation of angiogenesis." *Physiol Rev* **89**(4): 1177-1215.
- Copland, I. B., S. L. Adamson, et al. (2002). "TGF-beta 3 expression during umbilical cord development and its alteration in pre-eclampsia." *Placenta* **23**(4): 311-321.

- Crivellato, E. (2011). "The role of angiogenic growth factors in organogenesis." Int J Dev Biol **55**(4-5): 365-375.
- Chen, W., T. Tang, et al. (2011). "Canonical hedgehog signaling augments tumor angiogenesis by induction of VEGF-A in stromal perivascular cells." Proc Natl Acad Sci U S A **108**(23): 9589-9594.
- Chinchilla, P., L. Xiao, et al. (2010). "Hedgehog proteins activate pro-angiogenic responses in endothelial cells through non-canonical signaling pathways." Cell Cycle **9**(3): 570-579.
- Choi, M., H. S. Lee, et al. (2013). "Proangiogenic features of Wharton's jelly-derived mesenchymal stromal/stem cells and their ability to form functional vessels." Int J Biochem Cell Biol **45**(3): 560-570.
- Chu, S. H., D. F. Feng, et al. (2009). "Stabilization of hepatocyte growth factor mRNA by hypoxia-inducible factor 1." Mol Biol Rep **36**(7): 1967-1975.
- Daane, J. M. and K. M. Downs (2011). "Hedgehog signaling in the posterior region of the mouse gastrula suggests manifold roles in the fetal-umbilical connection and posterior morphogenesis." Dev Dyn **240**(9): 2175-2193.
- Dahmane, N. and A. Ruiz i Altaba (1999). "Sonic hedgehog regulates the growth and patterning of the cerebellum." Development **126**(14): 3089-3100.
- Davis, S., T. H. Aldrich, et al. (1996). "Isolation of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, by secretion-trap expression cloning." Cell **87**(7): 1161-1169.
- Day, R. T., C. Cavaglieri Rde, et al. (2010). "Acute hyperglycemia rapidly stimulates VEGF mRNA translation in the kidney. Role of angiotensin type 2 receptor (AT2)." Cell Signal **22**(12): 1849-1857.
- Deryugina, E. I. and J. P. Quigley (2008). "Chapter 2. Chick embryo chorioallantoic membrane models to quantify angiogenesis induced by inflammatory and tumor cells or purified effector molecules." Methods Enzymol **444**: 21-41.
- Dhar-Masareno, M., A. Pedraza, et al. (2005). "PI3-kinase activation by GM-CSF in endothelium is upstream of Jak/Stat pathway: role of alphaGMR." Biochem Biophys Res Commun **337**(2): 551-556.
- Dierks, C., J. Grbic, et al. (2007). "Essential role of stromally induced hedgehog signaling in B-cell malignancies." Nat Med **13**(8): 944-951.
- Dominici, M., K. Le Blanc, et al. (2006). "Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement." Cytotherapy **8**(4): 315-317.
- Edwards, S. S., G. Zavala, et al. (2014). "Functional analysis reveals angiogenic potential of human mesenchymal stem cells from Wharton's jelly in dermal regeneration." Angiogenesis.
- Egeblad, M. and Z. Werb (2002). "New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression." Nat Rev Cancer **2**(3): 161-174.
- Ekekezie, II, D. W. Thibeault, et al. (2003). "Endostatin and vascular endothelial cell growth factor (VEGF) in piglet lungs: effect of inhaled nitric oxide and hyperoxia." Pediatr Res **53**(3): 440-446.
- El Khatib, M., A. Kalnytska, et al. (2013). "Inhibition of hedgehog signaling attenuates carcinogenesis in vitro and increases necrosis of cholangiocellular carcinoma." Hepatology **57**(3): 1035-1045.
- Enholm, B., K. Paavonen, et al. (1997). "Comparison of VEGF, VEGF-B, VEGF-C and Ang-1 mRNA regulation by serum, growth factors, oncoproteins and hypoxia." Oncogene **14**(20): 2475-2483.
- Ferrara, N. and S. Bunting (1996). "Vascular endothelial growth factor, a specific regulator of angiogenesis." Curr Opin Nephrol Hypertens **5**(1): 35-44.

- Ferrara, N., K. Carver-Moore, et al. (1996). "Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene." Nature **380**(6573): 439-442.
- Fischer, A., N. Schumacher, et al. (2004). "The Notch target genes Hey1 and Hey2 are required for embryonic vascular development." Genes Dev **18**(8): 901-911.
- Fogarty, M. P., B. A. Emmenegger, et al. (2007). "Fibroblast growth factor blocks Sonic hedgehog signaling in neuronal precursors and tumor cells." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(8): 2973-2978.
- Fuccillo, M., A. L. Joyner, et al. (2006). "Morphogen to mitogen: the multiple roles of hedgehog signalling in vertebrate neural development." Nat Rev Neurosci **7**(10): 772-783.
- Fujii, T. and H. Kuwano (2010). "Regulation of the expression balance of angiopoietin-1 and angiopoietin-2 by Shh and FGF-2." In Vitro Cell Dev Biol Anim **46**(6): 487-491.
- Fukuhara, S., K. Sako, et al. (2010). "Angiopoietin-1/Tie2 receptor signaling in vascular quiescence and angiogenesis." Histol Histopathol **25**(3): 387-396.
- Gaengel, K., G. Genove, et al. (2009). "Endothelial-mural cell signaling in vascular development and angiogenesis." Arterioscler Thromb Vasc Biol **29**(5): 630-638.
- Gale, N. W. and G. D. Yancopoulos (1999). "Growth factors acting via endothelial cell-specific receptor tyrosine kinases: VEGFs, angiopoietins, and ephrins in vascular development." Genes Dev **13**(9): 1055-1066.
- Gao, X. and Z. Xu (2008). "Mechanisms of action of angiogenin." Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai) **40**(7): 619-624.
- Hartmann, A., M. Kunz, et al. (1999). "Hypoxia-induced up-regulation of angiogenin in human malignant melanoma." Cancer Res **59**(7): 1578-1583.
- He, Q. W., Y. P. Xia, et al. (2013). "Astrocyte-derived sonic hedgehog contributes to angiogenesis in brain microvascular endothelial cells via RhoA/ROCK pathway after oxygen-glucose deprivation." Mol Neurobiol **47**(3): 976-987.
- Hegde, G. V., K. J. Peterson, et al. (2008). "Hedgehog-induced survival of B-cell chronic lymphocytic leukemia cells in a stromal cell microenvironment: a potential new therapeutic target." Mol Cancer Res **6**(12): 1928-1936.
- Herbert, S. P. and D. Y. Stainier (2011). "Molecular control of endothelial cell behaviour during blood vessel morphogenesis." Nat Rev Mol Cell Biol **12**(9): 551-564.
- Hoeben, A., B. Landuyt, et al. (2004). "Vascular endothelial growth factor and angiogenesis." Pharmacol Rev **56**(4): 549-580.
- Holtz, A. M., K. A. Peterson, et al. (2013). "Essential role for ligand-dependent feedback antagonism of vertebrate hedgehog signaling by PTCH1, PTCH2 and HHIP1 during neural patterning." Development **140**(16): 3423-3434.
- Hsieh, J. Y., Y. S. Fu, et al. (2010). "Functional module analysis reveals differential osteogenic and stemness potentials in human mesenchymal stem cells from bone marrow and Wharton's jelly of umbilical cord." Stem Cells Dev **19**(12): 1895-1910.
- Hsieh, J. Y., H. W. Wang, et al. (2013). "Mesenchymal stem cells from human umbilical cord express preferentially secreted factors related to neuroprotection, neurogenesis, and angiogenesis." PLoS One **8**(8): e72604.
- Hu, B. Y., Z. W. Du, et al. (2009). "Human oligodendrocytes from embryonic stem cells: conserved SHH signaling networks and divergent FGF effects." Development **136**(9): 1443-1452.
- Hui, C. C. and S. Angers (2011). "Gli proteins in development and disease." Annu Rev Cell Dev Biol **27**: 513-537.
- Ingham, P. W. and A. P. McMahon (2001). "Hedgehog signaling in animal development: paradigms and principles." Genes Dev **15**(23): 3059-3087.
- Jain, R. K. (2003). "Molecular regulation of vessel maturation." Nat Med **9**(6): 685-693.

- Jeong, J. and A. P. McMahon (2005). "Growth and pattern of the mammalian neural tube are governed by partially overlapping feedback activities of the hedgehog antagonists patched 1 and Hhip1." *Development* **132**(1): 143-154.
- Johnson, N. R. and Y. Wang (2013). "Controlled delivery of sonic hedgehog morphogen and its potential for cardiac repair." *PLoS One* **8**(5): e63075.
- Kanda, S., Y. Mochizuki, et al. (2003). "Sonic hedgehog induces capillary morphogenesis by endothelial cells through phosphoinositide 3-kinase." *J Biol Chem* **278**(10): 8244-8249.
- Karaa, Z. S., J. S. Iacovoni, et al. (2009). "The VEGF IRESes are differentially susceptible to translation inhibition by miR-16." *RNA* **15**(2): 249-254.
- Karakurum, M., R. Shreeniwas, et al. (1994). "Hypoxic induction of interleukin-8 gene expression in human endothelial cells." *J Clin Invest* **93**(4): 1564-1570.
- Koebernick, K. and T. Pieler (2002). "Gli-type zinc finger proteins as bipotential transducers of Hedgehog signaling." *Differentiation* **70**(2-3): 69-76.
- Kolf, C. M., E. Cho, et al. (2007). "Mesenchymal stromal cells. Biology of adult mesenchymal stem cells: regulation of niche, self-renewal and differentiation." *Arthritis Res Ther* **9**(1): 204.
- Krishnan, V., G. Elberg, et al. (1997). "Identification of a novel sonic hedgehog response element in the chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factor II promoter." *Mol Endocrinol* **11**(10): 1458-1466.
- Krishnan, V., F. A. Pereira, et al. (1997). "Mediation of Sonic hedgehog-induced expression of COUP-TFII by a protein phosphatase." *Science* **278**(5345): 1947-1950.
- Kucerova, R., N. Dora, et al. (2012). "Interaction between hedgehog signalling and PAX6 dosage mediates maintenance and regeneration of the corneal epithelium." *Mol Vis* **18**: 139-150.
- Lavrentieva, A., I. Majore, et al. (2010). "Effects of hypoxic culture conditions on umbilical cord-derived human mesenchymal stem cells." *Cell Commun Signal* **8**: 18.
- Lee, S. W., M. A. Moskowitz, et al. (2007). "Sonic hedgehog inversely regulates the expression of angiopoietin-1 and angiopoietin-2 in fibroblasts." *Int J Mol Med* **19**(3): 445-451.
- Li, F., M. Duman-Scheel, et al. (2010). "Sonic hedgehog signaling induces vascular smooth muscle cell proliferation via induction of the G1 cyclin-retinoblastoma axis." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **30**(9): 1787-1794.
- Li, Y., Y. Xia, et al. (2013). "Sonic hedgehog (Shh) regulates the expression of angiogenic growth factors in oxygen-glucose-deprived astrocytes by mediating the nuclear receptor NR2F2." *Mol Neurobiol* **47**(3): 967-975.
- Lindemann, R. K. (2008). "Stroma-initiated hedgehog signaling takes center stage in B-cell lymphoma." *Cancer Res* **68**(4): 961-964.
- Lo Surdo, J. and S. R. Bauer (2012). "Quantitative approaches to detect donor and passage differences in adipogenic potential and clonogenicity in human bone marrow-derived mesenchymal stem cells." *Tissue Eng Part C Methods* **18**(11): 877-889.
- Lu, Y., A. Chu, et al. (2011). "Hypoxia-induced epigenetic regulation and silencing of the BRCA1 promoter." *Mol Cell Biol* **31**(16): 3339-3350.
- Majesky, M. W., X. R. Dong, et al. (2011). "The adventitia: a dynamic interface containing resident progenitor cells." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **31**(7): 1530-1539.
- Martin, C. B., Jr. (2008). "Normal fetal physiology and behavior, and adaptive responses with hypoxemia." *Semin Perinatol* **32**(4): 239-242.
- Martinez, C., V. H. Cornejo, et al. (2013). "Proliferation of murine midbrain neural stem cells depends upon an endogenous sonic hedgehog (Shh) source." *PLoS One* **8**(6): e65818.

- Martinez, C., P. C. Smith, et al. (2011). "Sonic hedgehog stimulates proliferation of human periodontal ligament stem cells." *J Dent Res* **90**(4): 483-488.
- McGlinn, E., K. L. van Bueren, et al. (2005). "Pax9 and Jagged1 act downstream of Gli3 in vertebrate limb development." *Mech Dev* **122**(11): 1218-1233.
- Mendicino, M., A. M. Bailey, et al. (2014). "MSC-based product characterization for clinical trials: an FDA perspective." *Cell Stem Cell* **14**(2): 141-145.
- Mindaye, S. T., M. Ra, et al. (2013). "Improved proteomic profiling of the cell surface of culture-expanded human bone marrow multipotent stromal cells." *J Proteomics* **78**: 1-14.
- Mindaye, S. T., M. Ra, et al. (2013). "Global proteomic signature of undifferentiated human bone marrow stromal cells: evidence for donor-to-donor proteome heterogeneity." *Stem Cell Res* **11**(2): 793-805.
- Mukhopadhyay, A., S. R. Krishnaswami, et al. (2013). "Negative regulation of Shh levels by Kras and Fgfr2 during hair follicle development." *Dev Biol* **373**(2): 373-382.
- Muscari, C., E. Giordano, et al. (2013). "Priming adult stem cells by hypoxic pretreatments for applications in regenerative medicine." *J Biomed Sci* **20**: 63.
- Mutter, W. P. and S. A. Karumanchi (2008). "Molecular mechanisms of preeclampsia." *Microvasc Res* **75**(1): 1-8.
- Nakamura, K., J. Sasajima, et al. (2010). "Hedgehog promotes neovascularization in pancreatic cancers by regulating Ang-1 and IGF-1 expression in bone-marrow derived pro-angiogenic cells." *PLoS One* **5**(1): e8824.
- Nanaev, A. K., G. Kohnen, et al. (1997). "Stromal differentiation and architecture of the human umbilical cord." *Placenta* **18**(1): 53-64.
- Nanni, L., J. E. Ming, et al. (1999). "The mutational spectrum of the sonic hedgehog gene in holoprosencephaly: SHH mutations cause a significant proportion of autosomal dominant holoprosencephaly." *Hum Mol Genet* **8**(13): 2479-2488.
- Natsuzaka, M., S. Naganuma, et al. (2012). "Hypoxia induces IGFBP3 in esophageal squamous cancer cells through HIF-1 α -mediated mRNA transcription and continuous protein synthesis." *FASEB J* **26**(6): 2620-2630.
- Neufeld, G., T. Cohen, et al. (1999). "Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors." *FASEB J* **13**(1): 9-22.
- Olsson, A. K., A. Dimberg, et al. (2006). "VEGF receptor signalling - in control of vascular function." *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**(5): 359-371.
- Ortega, N., H. Hutchings, et al. (1999). "Signal relays in the VEGF system." *Front Biosci* **4**: D141-152.
- Oskowitz, A., H. McFerrin, et al. (2011). "Serum-deprived human multipotent mesenchymal stromal cells (MSCs) are highly angiogenic." *Stem Cell Res* **6**(3): 215-225.
- Osorio-Conles, O., M. Guitart, et al. (2011). "Plasma PTX3 protein levels inversely correlate with insulin secretion and obesity, whereas visceral adipose tissue PTX3 gene expression is increased in obesity." *Am J Physiol Endocrinol Metab* **301**(6): E1254-1261.
- Palma, V., D. A. Lim, et al. (2005). "Sonic hedgehog controls stem cell behavior in the postnatal and adult brain." *Development* **132**(2): 335-344.
- Palma, V. and A. Ruiz i Altaba (2004). "Hedgehog-Gli signaling regulates the behavior of cells with stem cell properties in the developing neocortex." *Development* **131**(2): 337-345.
- Parekkadan, B. and J. M. Milwid (2010). "Mesenchymal stem cells as therapeutics." *Annu Rev Biomed Eng* **12**: 87-117.
- Park, I. H., K. H. Kim, et al. (2013). "Constitutive stabilization of hypoxia-inducible factor alpha selectively promotes the self-renewal of mesenchymal progenitors and

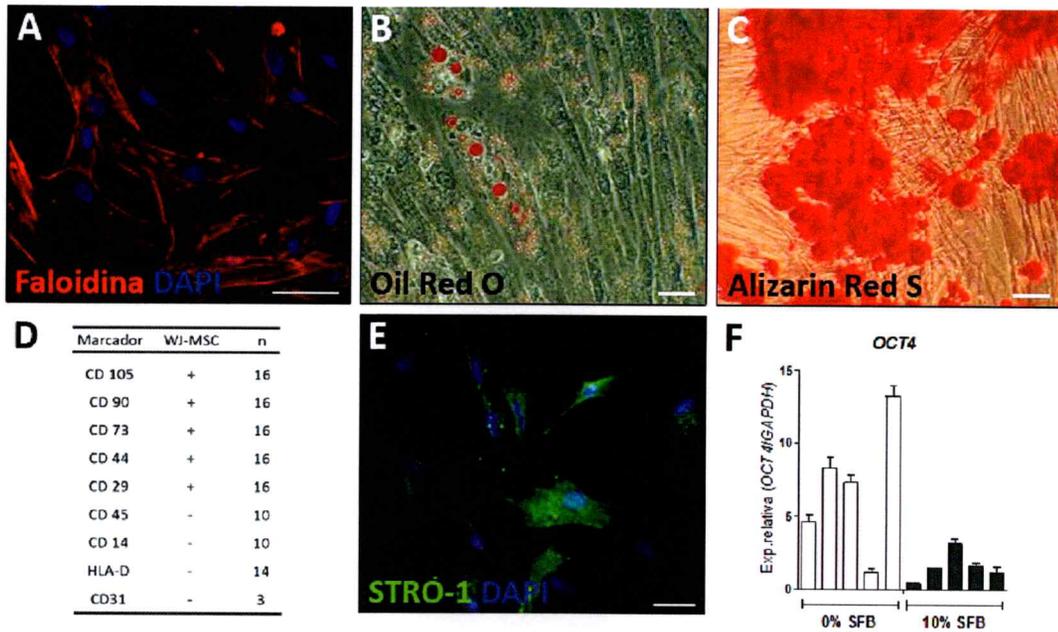
- maintains mesenchymal stromal cells in an undifferentiated state." Exp Mol Med **45**: e44.
- Passman, J. N., X. R. Dong, et al. (2008). "A sonic hedgehog signaling domain in the arterial adventitia supports resident Sca1+ smooth muscle progenitor cells." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(27): 9349-9354.
- Pepicelli, C. V., P. M. Lewis, et al. (1998). "Sonic hedgehog regulates branching morphogenesis in the mammalian lung." Curr Biol **8**(19): 1083-1086.
- Perez-Perri, J. I., J. M. Acevedo, et al. (2011). "Epigenetics: new questions on the response to hypoxia." Int J Mol Sci **12**(7): 4705-4721.
- Pfaffl, M. W. (2010). "The ongoing evolution of qPCR." Methods **50**(4): 215-216.
- Plaisant, M., S. Giorgetti-Peraldi, et al. (2011). "Inhibition of hedgehog signaling decreases proliferation and clonogenicity of human mesenchymal stem cells." PLoS One **6**(2): e16798.
- Pochampally, R. R., J. R. Smith, et al. (2004). "Serum deprivation of human marrow stromal cells (hMSCs) selects for a subpopulation of early progenitor cells with enhanced expression of OCT-4 and other embryonic genes." Blood **103**(5): 1647-1652.
- Pola, R., L. E. Ling, et al. (2001). "The morphogen Sonic hedgehog is an indirect angiogenic agent upregulating two families of angiogenic growth factors." Nat Med **7**(6): 706-711.
- Polizio, A. H., P. Chinchilla, et al. (2011). "Heterotrimeric Gi proteins link Hedgehog signaling to activation of Rho small GTPases to promote fibroblast migration." J Biol Chem **286**(22): 19589-19596.
- Polizio, A. H., P. Chinchilla, et al. (2011). "Sonic Hedgehog activates the GTPases Rac1 and RhoA in a Gli-independent manner through coupling of smoothed to Gi proteins." Sci Signal **4**(200): pt7.
- Poltorak, Z., T. Cohen, et al. (1997). "VEGF145, a secreted vascular endothelial growth factor isoform that binds to extracellular matrix." J Biol Chem **272**(11): 7151-7158.
- Renault, M. A., J. Roncalli, et al. (2010). "Sonic hedgehog induces angiogenesis via Rho kinase-dependent signaling in endothelial cells." J Mol Cell Cardiol **49**(3): 490-498.
- Ribatti, D., B. Nico, et al. (2006). "The gelatin sponge-chorioallantoic membrane assay." Nat Protoc **1**(1): 85-91.
- Riobo, N. A., G. M. Haines, et al. (2006). "Protein kinase C-delta and mitogen-activated protein/extracellular signal-regulated kinase-1 control GLI activation in hedgehog signaling." Cancer Res **66**(2): 839-845.
- Riobo, N. A., B. Saucy, et al. (2006). "Activation of heterotrimeric G proteins by Smoothed." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(33): 12607-12612.
- Rocha, S. F. and R. H. Adams (2009). "Molecular differentiation and specialization of vascular beds." Angiogenesis **12**(2): 139-147.
- Rong, Y., D. E. Post, et al. (2005). "PTEN and hypoxia regulate tissue factor expression and plasma coagulation by glioblastoma." Cancer Res **65**(4): 1406-1413.
- Roubelakis, M. G., G. Tsaknakis, et al. (2013). "Spindle shaped human mesenchymal stem/stromal cells from amniotic fluid promote neovascularization." PLoS One **8**(1): e54747.
- Rowitch, D. H., S. J. B, et al. (1999). "Sonic hedgehog regulates proliferation and inhibits differentiation of CNS precursor cells." J Neurosci **19**(20): 8954-8965.
- Ruiz i Altaba, A., V. Palma, et al. (2002). "Hedgehog-Gli signalling and the growth of the brain." Nat Rev Neurosci **3**(1): 24-33.
- Ruiz i Altaba, A., P. Sanchez, et al. (2002). "Gli and hedgehog in cancer: tumours, embryos and stem cells." Nat Rev Cancer **2**(5): 361-372.

- Sabapathy, V., B. Sundaram, et al. (2014). "Human Wharton's Jelly Mesenchymal Stem Cells plasticity augments scar-free skin wound healing with hair growth." PLoS One **9**(4): e93726.
- Sagai, T., T. Amano, et al. (2009). "A cluster of three long-range enhancers directs regional Shh expression in the epithelial linings." Development **136**(10): 1665-1674.
- Sanchez-Camacho, C. and P. Bovolenta (2009). "Emerging mechanisms in morphogen-mediated axon guidance." Bioessays **31**(10): 1013-1025.
- Senger, D. R. and G. E. Davis (2011). "Angiogenesis." Cold Spring Harb Perspect Biol **3**(8): a005090.
- Sheng, T., S. Chi, et al. (2006). "Regulation of Gli1 localization by the cAMP/protein kinase A signaling axis through a site near the nuclear localization signal." J Biol Chem **281**(1): 9-12.
- Shohara, R., A. Yamamoto, et al. (2012). "Mesenchymal stromal cells of human umbilical cord Wharton's jelly accelerate wound healing by paracrine mechanisms." Cytotherapy **14**(10): 1171-1181.
- Sobolewski, K., A. Malkowski, et al. (2005). "Wharton's jelly as a reservoir of peptide growth factors." Placenta **26**(10): 747-752.
- Sookoian, S., T. F. Gianotti, et al. (2013). "Fetal metabolic programming and epigenetic modifications: a systems biology approach." Pediatr Res **73**(4 Pt 2): 531-542.
- Stanton, B. Z. and L. F. Peng (2010). "Small-molecule modulators of the Sonic Hedgehog signaling pathway." Mol Biosyst **6**(1): 44-54.
- Stappenbeck, T. S. and H. Miyoshi (2009). "The role of stromal stem cells in tissue regeneration and wound repair." Science **324**(5935): 1666-1669.
- Stunkel, W., H. Pan, et al. (2012). "Transcriptome changes affecting Hedgehog and cytokine signalling in the umbilical cord: implications for disease risk." PLoS One **7**(7): e39744.
- Suri, C., P. F. Jones, et al. (1996). "Requisite role of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, during embryonic angiogenesis." Cell **87**(7): 1171-1180.
- Takechi, K., Y. Kuwabara, et al. (1993). "Ultrastructural and immunohistochemical studies of Wharton's jelly umbilical cord cells." Placenta **14**(2): 235-245.
- Teglund, S. and R. Toftgard (2010). "Hedgehog beyond medulloblastoma and basal cell carcinoma." Biochim Biophys Acta **1805**(2): 181-208.
- Teng, H., M. Chopp, et al. (2012). "Tissue plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor 1 contribute to sonic hedgehog-induced in vitro cerebral angiogenesis." PLoS One **7**(3): e33444.
- Tenzen, T., B. L. Allen, et al. (2006). "The cell surface membrane proteins Cdo and Boc are components and targets of the Hedgehog signaling pathway and feedback network in mice." Dev Cell **10**(5): 647-656.
- Troyer, D. L. and M. L. Weiss (2008). "Wharton's jelly-derived cells are a primitive stromal cell population." Stem Cells **26**(3): 591-599.
- Tyndall, A. and A. Uccelli (2009). "Multipotent mesenchymal stromal cells for autoimmune diseases: teaching new dogs old tricks." Bone Marrow Transplant **43**(11): 821-828.
- Varas, A., C. Hernandez-Lopez, et al. (2008). "Survival and function of human thymic dendritic cells are dependent on autocrine Hedgehog signaling." J Leukoc Biol **83**(6): 1476-1483.
- Varjosalo, M. and J. Taipale (2008). "Hedgehog: functions and mechanisms." Genes Dev **22**(18): 2454-2472.
- Wang, Y., C. Han, et al. (2013). "Hedgehog signaling pathway regulates autophagy in human hepatocellular carcinoma cells." Hepatology **58**(3): 995-1010.

- Weiss, M. L., S. Medicetty, et al. (2006). "Human umbilical cord matrix stem cells: preliminary characterization and effect of transplantation in a rodent model of Parkinson's disease." Stem Cells **24**(3): 781-792.
- Winklmayr, M., C. Schmid, et al. (2010). "Non-consensus GLI binding sites in Hedgehog target gene regulation." BMC Mol Biol **11**: 2.
- Wu, P., H. Yonekura, et al. (2001). "Hypoxia down-regulates endostatin production by human microvascular endothelial cells and pericytes." Biochem Biophys Res Commun **288**(5): 1149-1154.
- Wu, Y., L. Chen, et al. (2007). "Mesenchymal stem cells enhance wound healing through differentiation and angiogenesis." Stem Cells **25**(10): 2648-2659.
- Yancopoulos, G. D., S. Davis, et al. (2000). "Vascular-specific growth factors and blood vessel formation." Nature **407**(6801): 242-248.
- Yao, Q., M. A. Renault, et al. (2014). "Sonic hedgehog mediates a novel pathway of PDGF-BB-dependent vessel maturation." Blood **123**(15): 2429-2437.
- Ye, W., K. Shimamura, et al. (1998). "FGF and Shh signals control dopaminergic and serotonergic cell fate in the anterior neural plate." Cell **93**(5): 755-766.
- Yin, K. J., K. Olsen, et al. (2012). "Vascular endothelial cell-specific microRNA-15a inhibits angiogenesis in hindlimb ischemia." J Biol Chem **287**(32): 27055-27064.
- Yoo, Y. A., M. H. Kang, et al. (2011). "Sonic hedgehog pathway promotes metastasis and lymphangiogenesis via activation of Akt, EMT, and MMP-9 pathway in gastric cancer." Cancer Res **71**(22): 7061-7070.
- You, L. R., F. J. Lin, et al. (2005). "Suppression of Notch signalling by the COUP-TFII transcription factor regulates vein identity." Nature **435**(7038): 98-104.
- Zhao, H., J. Feng, et al. (2014). "Secretion of shh by a neurovascular bundle niche supports mesenchymal stem cell homeostasis in the adult mouse incisor." Cell Stem Cell **14**(2): 160-173.
- Zhong, T. P., S. Childs, et al. (2001). "Gridlock signalling pathway fashions the first embryonic artery." Nature **414**(6860): 216-220.

ANEXOS

Anexo 1. WJ-MSC poseen las características de MSC



(A) Fotografía que representa la morfología fibroblastoide de cultivos primarios de WJ-MSC, visualizada mediante tinción de filamentos de actina con faloidina. El núcleo es marcado con DAPI.

(B) Las WJ-MSC se diferencian en respuesta a medios específicos a linaje adipogénico y acumulan gotas de lípidos, las que pueden ser visualizadas mediante la tinción Oil Red O (rojo).

(C) Cuando las WJ-MSC se diferencian a linaje osteogénico secretan matriz extracelular que es mineralizada, la cual se detecta usando la tinción Alizarin Red S (rojo).

(D) WJ-MSC expresan CD105, CD90, CD73, CD44 y CD29, marcadores clásicos de MSC, asimismo no expresan los marcadores del linaje hematopoyético CD45 y CD14, ni HLA-D. Los cultivos de WJ-MSC no expresan el marcador endotelial CD31. Marcadores analizados mediante citometría de flujo en el marco de Seminario de Título de Samuel Martínez.

(E) Imagen representativa que ilustra que una subpoblación de WJ-MSC expresa Stro-1 (verde), marcador característico de una célula troncal mesenquimática (barra de tamaño= 25 μ m).

(F) Las WJ-MSC expresan *OCT4*, factor de transcripción indicativo de la presencia de células troncales en los cultivos. Se indican diferentes niveles de *OCT4* para 5 muestras distintas, en ausencia y presencia de suero. Los niveles de transcrito fueron determinados por qPCR, usando *GAPDH* como control y fueron normalizados respecto a los niveles de *OCT4* expresados por AT-MSC, para destacar la variabilidad entre distintos cultivos de WJ-MSC y entre distintas MSC. Barras de tamaño= 25 μ m en (A) y 10 μ m en (B) y (C).