



UNIVERSITAT^{DE}
BARCELONA

Caracterització de les malformacions vasculars causades per mutacions al gen PIK3CA

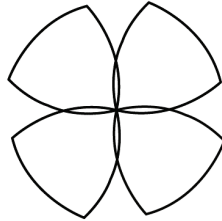
Helena Sabata Perez



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement- NoComercial – SenseObraDerivada 4.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento - NoComercial – SinObraDerivada 4.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs 4.0. Spain License.**



Caracterització de les malformacions
vasculars causades per mutacions activadores al gen
PIK3CA



UNIVERSITAT DE
BARCELONA



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

**Caracterització de les malformacions
vasculars causades per mutacions activadores al gen
*PIK3CA***

Memòria presentada per **Helena Sabata Perez**
per optar al títol acadèmic de Doctora per la Universitat de Barcelona

Aquesta tesi ha estat realitzada sota la direcció de
Mariona Graupera Garcia-Milà i Sandra Castillo Díez
al laboratori de Patobiologia Endotelial i Microambient a
l'Institut de Recerca Contra la Leucèmia Josep Carreras (IJC).

Programa de Doctorat en Biomedicina
Facultat de Medicina
Universitat de Barcelona

Tutor: **Francesc Vinyals i Canals**

Badalona, Octubre 2023

Mariona Graupera,
PhD

Directora de tesi

Sandra Castillo,
PhD

Directora de tesi

Francesc Vinyals,
PhD

Tutor

Helena Sabata
Perez

Candidata

Affidavit

La tesi titulada “Caracterització de les malformacions vasculars causades per mutacions activadores al gen *PIK3CA*” ha estat realitzada per Helena Sabata Perez al laboratori de Patobiologia Endotelial i Microambient, en primer lloc a l’Institut d’Investigació Biomèdica de Bellvitge (IDIBELL), i finalment, a l’Institut de Recerca Contra la Leucèmia Josep Carreras (IJC), sempre sota la supervisió de la Dra. Mariona Graupera i la Dra. Sandra Castillo. L’elaboració i escriptura de la memòria ha estat realitzada íntegrament per l’autora. Tota aquella informació obtinguda d’altres fonts de la literatura ha estat citada al text i referenciada al final del present treball.

Suport financer

Aquesta tesi doctoral ha rebut suport financer de:

- Beca predoctoral FPI (Formación de Personal Investigador) (PRE2018-084283) subvencionada per el Ministerio de Ciencia, Innovación i Universidades, Gobierno de España, amb el suport institucional del programa CERCA de la Generalitat de Catalunya.
- Beca d’investigació “la Caixa” *Banking Foundation, Health and Research* 2018 (HR18-00120)
- Les institucions en les que s’ha portat a terme el projecte: Institut d’Investigació Biomèdica de Bellvitge (IDIBELL) i Institut de Recerca Contra la Leucèmia Josep Carreras (IJC)
- Durant el present treball, Helena Sabata Perez va realitzar una estada (del 27 de setembre de 2022 al 23 de desembre de 2022) al laboratori de la Dra. Maria Alcolea al *Wellcome-MRC Cambridge Stem Cell Institute*, Cambridge (Regne Unit), gràcies al suport econòmic d’EMBO (*EMBO Scientific Exchange Grants*).



Institut de Recerca
CONTRA LA LEUCÈMIA
Josep Carreras



Fundació "la Caixa"



ÍNDEX

RESUM	13
ABSTRACT	15
GLOSSARI I ABREVIACIONS	17
ÍNDEX DE FIGURES.....	23
ÍNDEX DE TAULES	27
INTRODUCCIÓ	29
1. El sistema circulatori.....	29
2. Tipus i composició dels vasos sanguinis	29
3. Desenvolupament vascular	31
3.1. Origen dels vasos sanguinis	31
3.2. Fonaments i regulació de l'angiogènesi	32
3.2.1. VEGF/VEGFR	32
3.2.2. La via de senyalització de Notch	33
3.3. <i>Sprouting angiogenesis</i> : regulació i senyalització.....	34
3.3.1. Iniciació i elongació.....	34
3.3.2. Anastomosis i formació del lumen	36
3.3.3. Maduració, estabilització i quiescència	37
3.3.3.1. Unions cel·lulars	37
3.3.3.2. Cèl·lules murals	38
3.3.3.3. Matriu extracel·lular	39
3.3.3.4. Remodelació i quiescència	39
4. Diferenciació i especialització de la cèl·lula endotelial	40
4.1. Desenvolupament dels progenitors endotelials	40
4.2. L'arterialització venosa	41
4.3. Regulació transcripcional de la diferenciació arteriovenosa.....	42
4.3.1. VEGF-A i VEGFR2	43
4.3.2. Ephrin-B2 i EPHB4	43
4.3.3. COUP-TFII	44
4.3.4. CXCR4 i CXCL12	45
4.4. Regulació transcripcional de la diferenciació limfàtica	45
4.5. El cicle cel·lular i el destí de la cèl·lula endotelial	46
4.6. PI3K/MAPK com a coordinadors de la diferenciació arteriovenosa.....	47
4.7. Implicacions clíniques de la desregulació de la diferenciació endotelial	47
5. El metabolisme endotelial	48
5.1. Glicòlisis i respiració mitocondrial	48
5.2. Branques circumdants a la glicòlisis: via de la pentosa fosfat i síntesis d'hexosamines	50
5.3. Oxidació d'àcids grassos	50

5.4.	Metabolisme dels aminoàcids	51
5.4.1.	Metabolisme de la glutamina i el glutamat.....	51
5.4.2.	Metabolisme de l'arginina i el cicle de la urea	51
5.6.	Pertorbacions del metabolisme endotelial en malalties vasculars	53
6.	Models animals per a l'estudi de l'angiogènesi	54
6.1.	La retina postnatal de ratolí com a model angiogènic	54
6.2.	Manipulació genètica de l'angiogènesi a la retina postnatal	56
6.3.	Estratègies genètiques per a la visualització i seguiment de la cèl·lula recombinant	58
7.	La via de senyalització de PI3K.....	58
7.1.	La família PI3K	58
7.2.	PI3K de classe I	60
7.2.1.	AKT	61
7.2.2.	PTEN	63
7.2.3.	Mutacions patogèniques de la via PI3K de classe I	64
8.	La senyalització de PI3K a la cèl·lula endotelial.....	65
8.1.	PI3K de classe I a l'endoteli	65
8.2.	Activació de la via PI3K a l'endoteli (<i>inputs</i>).....	66
8.3.	Efectors de la via PI3K a l'endoteli (<i>outputs</i>).....	67
9.	Anomalies vasculars	69
9.1.	Classificació i caracterització de les anomalies vasculars	70
9.1.1.	Tumors vasculars	71
9.1.2.	Malformacions vasculars	71
9.1.2.1.	Malformacions vasculars d'alt flux: lesions arteriovenoses.....	73
9.1.2.2.	Malformacions vasculars de baix flux: lesions capil·lars, venoses o limfàtiques	74
9.2.	Perspectives de futur en el diagnòstic i el tractament de les malformacions vasculars	77
HIPÒTESI I OBJECTIUS		81
MATERIALS I MÈTODES.....		83
1.	Animals i estabulació.....	83
1.1.	Manteniment de la colònia animal	83
1.2.	Models murins transgènics.....	83
1.2.1.	<i>Pik3ca</i> ^{H1047R}	84
1.2.2.	Línies endotelials Cre	84
1.2.3.	Línia reportera mTmG	84
1.2.4.	iSuRe-Cre	85
1.2.5.	iFlu-Mosaic- <i>Pik3ca</i> ^{H1047R}	85
1.2.6.	Model COUP-TFII <i>knockout</i> : <i>Nr2f2</i> ^{flox/flox}	86
1.3.	Deslletament i genotipatge	88
1.3.1.	Biòpsia i digestió de la cua.....	88

1.3.2.	Determinació del genotip mitjançant PCR	88
2.	Experiments <i>in vivo</i>	90
2.1.	Inducció de l'activitat recombinasa Cre <i>in vivo</i>	90
2.2.	Tractaments farmacològics <i>in vivo</i> : inhibidor CIA1	90
2.3.	Modelatge de l'angiogènesi a la retina postnatal	90
2.3.1.	Extracció de l'ull i aïllament de la retina postnatal	90
2.3.2.	Tinció de les retines per immunofluorescència	91
2.4.	Assaig de proliferació <i>in vivo</i> : incorporació i detecció d'EdU	92
2.5.	Microscòpia confocal	92
2.6.	Anàlisi i quantificació de les imatges	93
2.6.1.	Localització i quantificació de les lesions vasculars	93
2.6.2.	Àrea vascular: IB4	93
2.6.3.	Localització i expansió de les cèl·lules recombinants GFP ⁺	93
2.6.4.	Quantificació i localització de cèl·lules iFlu-Mosaic-Pik3ca ^{H1047R}	94
2.6.5.	Amplitud del vas	94
2.6.6.	Número de nuclis endotelials: ERG	94
2.6.7.	Proliferació de cèl·lules endotelials: EdU o Ki67	94
2.6.8.	Activació de la via PI3K: p-S6	94
2.6.9.	Cobertura dels vasos per pericits: NG2	96
3.	Experiments <i>in vitro</i>	96
3.1.	Aïllament i cultiu de cèl·lules endotelials murines de pulmó (mLECs)	96
3.1.1.	Dissecció del pulmó	96
3.1.2.	Digestió del teixit i selecció de les cèl·lules endotelials	96
3.1.3.	Purificació del cultiu endotelial	97
3.1.4.	Manteniment i expansió del cultiu endotelial	97
3.1.5.	Criopreservació del cultiu endotelial	97
3.2.	Inducció de l'activitat Cre <i>in vitro</i>	98
3.3.	Tractaments farmacològics <i>in vitro</i>	98
3.3.1.	Inhibició de p110α: BYL719 (Alpelisib)	98
3.3.2.	Inhibició de la síntesi de glutatí: BSO	98
3.4.	Assaig de viabilitat cel·lular MTS	98
3.5.	Anàlisi de l'expressió gènica: PCR quantitativa	99
3.5.1.	Extracció d'ARN	99
3.5.2.	Síntesi de cADN	99
3.5.3.	PCR quantitativa (qPCR)	99
3.6.	Estudi de la senyalització cel·lular: immunodetecció proteica	100
3.6.1.	Extracció i quantificació proteica	100
3.6.2.	Separació de proteïnes i immunodetecció	100
3.7.	Estudi del metabolisme cel·lular: anàlisi metabòlic	100
3.7.1.	Extracció dels metabòlits	100
3.7.2.	Anàlisi metabòlic	101

3.8. Anàlisi del cicle cel·lular per citometria de flux	101
4. Anàlisi estadístic.....	101
5. Taules de reactius.....	102
RESULTATS.....	107
1. Objectiu 1: Generar un model de malformacions vasculars mitjançant l'expressió postnatal de <i>Pik3ca</i> ^{H1047R} en la vasculatura de la retina de ratolí, considerant el moment d'expressió de la mutació com a element catalitzador.	107
1.1. Els factors de creixement potencien la sobreactivació de PI3K i la proliferació de les ECs <i>Pik3ca</i> ^{H1047R}	107
1.2. L'estimulació angiogènica és necessària per al desenvolupament de malformacions vasculars derivades de <i>Pik3ca</i> ^{H1047R}	109
1.3. L'expressió endotelial mosaica de <i>Pik3ca</i> ^{H1047R} permet la configuració d'un model per a l'estudi de les malformacions vasculars venoses.	112
1.4. El model mosaic EC- <i>Pik3ca</i> ^{H1047R} recapitula els trets característics de les malformacions venoses.	114
1.5. La caracterització de retines <i>Pik3ca</i> ^{H1047R} a P4 mostra l'inici del desenvolupament dels trets patològics.	118
2. Objectiu 2: Caracteritzar la patogenicitat de <i>Pik3ca</i> ^{H1047R} en les malformacions vasculars prenent com a eix central d'estudi el llinatge endotelial on s'expressa la mutació.....	121
2.1. <i>Pik3ca</i> ^{H1047R} provoca el sobrecreixement de venes i capil·lars, però no afecta a les artèries.....	121
2.2. L'expressió de <i>Pik3ca</i> ^{H1047R} a cèl·lules arterials diferenciades no és patogènica. ..	124
2.3. La sobreactivació de PI3K determina la identitat de la EC, afavorint la diferenciació venosa i capil·lar i evitant l'especificació arterial.	128
2.4. Un nou i precís model per al traçat de ECs <i>Pik3ca</i> ^{H1047R} corrobora la incompatibilitat de la mutació amb el procés de diferenciació arterial.	135
3. Objectiu 3: Desxifrar els mecanismes moleculars implicats en les diferències fenotípiques durant l'origen i especificació molecular dels mutants <i>Pik3ca</i> ^{H1047R}	139
3.1. L'expressió de COUP-TFII és regulada per l'activitat de PI3Kα	139
3.2. Identificació del perfil transcripcional responsable de la regulació transcripcional de COUP-TFII mediada per PI3Kα.	141
3.3. La inhibició farmacològica de COUP-TFII podria limitar l'expansió patogènica de les cèl·lules <i>Pik3ca</i> ^{H1047R}	143
3.4. Constitució del model per al rescat fenotípic de <i>Pik3ca</i> ^{H1047R} mitjançant la deleció genètica de de COUP-TFII.....	145
4. Objectiu 4: Determinar el perfil metabòlic implicat en la patogènesi de les malformacions vasculars causades per <i>Pik3ca</i> ^{H1047R} mitjançant l'anàlisi metabolòmic de les cèl·lules endotelials mutants.	147
4.1. Estudi metabolòmic de les ECs <i>Pik3ca</i> ^{H1047R}	147
4.2. Les ECs <i>Pik3ca</i> ^{H1047R} presenten un augment del metabolisme del glutatió, un mecanisme essencial per al control de l'estrès oxidatiu.	147
4.3. L'augment de la glicòlisi com a força conductora de l'expansió de les cèl·lules <i>Pik3ca</i> -mutants.	152
DISCUSSIÓ.....	157
1. Modelatge i caracterització del context espai-temporal de les malformacions vasculars causades per mutacions <i>Pik3ca</i> ^{H1047R}	158

1.1.	L'expressió mosaica de <i>Pik3ca</i> ^{H1047R} constitueix un model únic per a l'estudi de l'origen i el creixement de les malformacions vasculars.	158
1.2.	Les mutacions activadores a <i>Pik3ca</i> no són patogèniques a la cèl·lula arterial.....	161
1.3.	L'activació de PI3K determina el destí endotelial i la patogènesi vascular	162
1.4.	<i>Pik3ca</i> ^{H1047R} indueix la sobreexpressió de COUP-TFII	165
2.	Estudi metabolòmic de les ECs <i>Pik3ca</i> ^{H1047R}	167
2.1.	L'expressió endotelial de <i>Pik3ca</i> ^{H1047R} desencadena una reprogramació metabòlica que sustenta l'augment proliferatiu i l'estrès oxidatiu	167
3.	Observacions finals	169
CONCLUSIONS		171
REFERÈNCIES		173

RESUM

Les malformacions vasculars (VMs) representen un ampli espectre de lesions relacionades amb trastorns del desenvolupament vascular, les quals poden donar lloc a un gran ventall de característiques clíniques en funció de l'abast de la lesió i el teixit afectat. Sovint aquestes lesions es manifesten de manera congènita i creixen proporcionalment amb el pacient, afectant principalment nadons, nens i adults joves. Les VMs es classifiquen en malformacions d'alt flux (arteriovenoses) i baix flux (venoses, capil·lars i limfàtiques). Gran part de les lesions de baix flux són causades per mutacions somàtiques activadores al gen *PIK3CA*, que condueixen a la sobreactivació de la via de senyalització PI3K i la proliferació patològica de les cèl·lules endotelials. Tot i la naturalesa estocàstica d'aquest tipus de mutacions, no hi ha evidències de la seva presència en malformacions arteriovenoses, un fet que fa evident la segregació mutacional entre les malformacions d'alt i baix flux.

Aquesta tesi s'ha centrat en la caracterització dels elements espai-temporals que determinen la patogènesi de les malformacions *Pik3ca*^{H1047R} i l'estudi dels mecanismes moleculars subjacents al creixement de les mateixes. Mitjançant l'ús de models murins genètics induïbles amb tamoxifè hem demostrat que l'expressió mosaica de *Pik3ca*^{H1047R} dona lloc a lesions vasculars hiperplàstiques exclusivament a venes i capil·lars de manera proporcional a l'activitat angiogènica del teixit. D'altra banda, el llinatge endotelial on té lloc la mutació determina de manera directa el desenvolupament patològic dels vasos; mentre *Pik3ca*^{H1047R} és completament innocu en un context arterial, la seva expressió en cèl·lules en transició a l'artèria (ECs *tip*, pre-arterials) resulta en l'expansió patològica de les cèl·lules mutants en venes i capil·lars. Així doncs, la sobreactivació de PI3K desencadena l'augment de la proliferació i l'expressió d'un perfil transcriptòmic venós (liderat pel factor de transcripció COUP-TFII), condicionant de manera directa la diferenciació endotelial de les cèl·lules mutants, afavorint la seva expansió patològica en venes i capil·lars i evitant l'especialització arterial. Finalment, l'estudi metabolòmic de les ECs *Pik3ca*^{H1047R} ha mostrat un notori augment en la capacitat anabòlica i bioenergètica de les cèl·lules mutants. Més concretament, l'increment del potencial glicolític ha demostrat ser crucial per a l'expansió patològica de les cèl·lules mutants *in vivo*, un tret que podria esdevenir un atractiu objectiu terapèutic.

ABSTRACT

Vascular malformations (VMs) represent a broad spectrum of lesions related to disorders in vascular development, which can give rise to a wide range of clinical features depending on the extent of the lesion and the affected tissue. These lesions are often congenital and grow over the time, mainly affecting infants, children and young adults. VMs are classified in high-flow (arteriovenous) and low-flow (venous, capillary and lymphatic) malformations. Specifically, a large proportion of low-flow lesions are caused by activating somatic mutations in *PIK3CA* gene, leading to the overactivation of the PI3K signalling pathway and the pathogenic endothelial cell proliferation. Despite the stochastic nature of this type of mutations, there is no evidence of their presence in arteriovenous malformations, which suggests the existence of mutational segregation between high and low flow malformations.

This thesis has been focused on the characterization of the spatiotemporal elements that determine the pathogenesis of *Pik3ca*^{H1047R} malformations and the study of the molecular mechanisms underlying their growth. By the use of tamoxifen inducible genetic murine models, we have modelled the mosaic endothelial expression of *Pik3ca*^{H1047R}, which gives rise to hyperplastic vascular lesions exclusively in veins and capillaries in proportion to the angiogenic activity in the affected tissue. On the other hand, the endothelial lineage where the mutation takes place determines the pathological development of the vessels; while *Pik3ca*^{H1047R} is completely harmless in arterial ECs, its expression in cells in transition into the artery (pre-arterial, tip ECs) results in the pathological expansion of the mutant cells in veins and capillaries. Thus, overactivation of PI3K triggers endothelial hyperproliferation and the expression of a venous transcriptomic profile (driven by COUP-TFII transcription factor), both conditioning the endothelial differentiation and favouring their pathological expansion in veins and capillaries, while avoiding arterial specialization. Finally, the metabolomic study of *Pik3ca*^{H1047R} ECs has shown a notable increase their anabolic and bioenergetic capacity. More specifically, the increase in the glycolytic potential has demonstrated an important impact on the mutant cell expansion, becoming a possible attractive therapeutic target.

GLOSSARI I ABREVIACIONS

Glossari de termes en anglès

<i>Adherent junctions</i>	Unions adherents
<i>Cèl·lules phalanx</i>	Cèl·lules endotelials quiescents
<i>Cèl·lules stalk</i>	Cèl·lules endotelials de tija
<i>Cèl·lules tip</i>	Cèl·lules endotelials de punta
<i>Enhancer</i>	Potenciador
<i>Inputs</i>	Estímul
<i>Knock-down, KD</i>	Generació d'una al·lel no funcional
<i>Knock-in, KI</i>	Inserció d'una seqüència genètica
<i>Knock-out, KO</i>	Escissió genètica d'un al·lel
<i>Outputs</i>	Producte o conseqüència
<i>Primer</i>	Encebador
<i>Pruning</i>	Procés de regressió dels vasos
<i>Shear stress</i>	Estrès a causa de la pressió i la fricció del fluid
<i>Single-cell RNA sequencing (scRNA-seq)</i>	Seqüenciació de cèl·lules individuals
<i>Sprouting angiogenesis</i>	Angiogènesi germinativa
<i>Sprouts</i>	Brots angiogènics
<i>Tight junctions</i>	Unions estretes
<i>Goat</i>	Cabra
<i>Mouse</i>	Ratolí
<i>Rabbit</i>	Conill
<i>Rat</i>	Rata
<i>Threshold</i>	Llindar
<i>Stock</i>	Solució inicial

Abreviacions

(e)NOS	Òxid nítric sintasa endotelial
4-OHT	4-OH-tamoxifè (metabòlit actiu del tamoxifè)
ADN	Àcid desoxiribonucleic
AECs	Cèl·lules endotelials arterials
AJs	Unions Adherents (<i>adherent junctions</i>)
AKT o PKB	Proteïna quinasa B
ANG1/2	Angiopietina 1/2
ARN	Àcid ribonucleic
ATP	Adenosina trifosfat
AVFs	Fístules arteriovenoses
AVMs	Malformacions arteriovenoses
BSA	Albumina de sèrum boví (<i>Bovin Serum Albumin</i>)
cADN	ADN complementari
cicle TCA	cicle dels àcids tricarboxílics
CMs	Malformacions capil·lars
COUP-TFII	Factor de transcripció COUP 2 (<i>Chicken Ovalbumin Upstream Promoter Transcription Factor 2</i>)
CX37	Conexina 36
CX40	Conexina 40
DII4	<i>Delta-like protein 4</i>
DMEM	<i>Dubelcco Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimetil sulfòxid
dNTPs	Desoxirribonucleòtids trifosfat
DTT	Ditiotreitol
ECM	Matriu extracel·lular (<i>Extracellular Matrix</i>)
ECs	Cèl·lules endotelials (<i>Endothelial Cells</i>)
EDTA	Àcid Ethane-1,2-diylidinitriloTetraAcetic
EdU	5-etinil-2'-deoxiuridina
EPHB4	Receptor EPH B4
ERG	<i>ETS-related gene</i>
ERK	Quinasa regulada extracel·lularment
FAO	Oxidació d'àcids grassos (<i>Fatty Acid Oxidation</i>)
FBS	Sèrum fetal boví (<i>Foetal Bovine Serum</i>)

FOXOs	<i>Forkhead box O transcription factors</i>
GFP	Proteïna fluorescent verda (<i>Green Fluorescent Protein</i>)
GPCRs	Receptors acoblats a proteïnes G
GSH	Glutatió reduït
GSK3	Glicògen sintasa quinasa 3
GSSG	Glutatió oxidat
GTPasa	Guanosina trifosfatasa (<i>Guanosine Tri-Phosphatase</i>)
HBP	Via metabòlica de biosíntesi d'hexosamines
HES	<i>Hairy Enhancer of Split</i>
HEY	<i>Hairy and Enhancer-of-split related with YRPW motif protein</i>
HHT	Telangièctasi Hemorràgica Hereditària o síndrome d'Osler-Weber-Rendu (<i>Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia</i>)
HIF	Factor induïble per hipòxia (<i>Hypoxia-Inducible Factor</i>)
HK2	Hexoquinasa-2
HUAECs	Cèl·lules endotelials arterials humanes de cordó umbilical (<i>Human Umbilical Vein Endothelial Cells</i>)
HUVECs	Cèl·lules endotelials venoses humanes de cordó umbilical (<i>Human Umbilical Vein Endothelial Cells</i>)
IB4	Isolectina B4
IF	Immunofluorescència
kDa	Kilodalton
KLF2/4	<i>Krueppel-like factor 2/4</i>
KTS	Síndrome de Klippel-Trenaunay
LC-MS	Cromatografia líquida- Espectrometria de masses (<i>Liquid chromatography tandem mass spectrometry</i>)
LECs	Cèl·lules endotelials limfàtiques
LMs	Malformacions limfàtiques
LYVE-1	<i>Lymphatic Vessel Endothelial Hyaluronic Acid Receptor 1</i>
MAPK	Proteïnes quinases activades per mitògens
mLECs	Cèl·lules endotelials pulmonars de ratolí
MMP	Metal·loproteïnases
mTmG	<i>Membrane-Tomato membrane-GFP</i>
mTORC1	<i>Mammalian target of rapamycin complex 1</i>
mTORC2	<i>Mammalian target of rapamycin complex 2</i>
NADPH	Nicotinamida Adenina Dinucleòtid Fosfat
NG2	Neural glial 2
NICD	Domini Intracel·lular de Notch

NO	Òxid Nítric
NRARP	<i>NOTCH Regulated Ankyrin Repeat Protein</i>
NRP-1/2	<i>Neuropilin 1/2</i>
PAGE	Electroforesi en gel de poliacrilamida
PBS	Tampó salí amb fosfat (<i>Phosphate-buffered Saline</i>)
PBS-T	Tampó salí amb fosfat amb Tween-20
PCR	Reacció en cadena de la polimerasa (<i>Polimerase Chain Reaction</i>)
PCs	Pericits
PDGFB	Factor de creixement derivat de plaquetes (<i>Platelet-Derived Growth Factor</i>)
PDGFRβ	Receptor del factor de creixement derivat de plaquetes Beta (<i>Platelet-Derived Growth Factor Receptor</i>)
PDK1	<i>Phosphoinositide-Dependent Kinase 1</i>
PFA	Paraformaldehid
PFKFB3	Fosfofructoquinasa-2/fructosa-2,6-bisfosfatasa 3
PHTS	Síndrome de tumor hamartoma PTEN (<i>PTEN hamartoma tumor syndrome</i>)
PI o PtdIns	Fosfatidilinositol
PI3K	Fosfoinositol 3 quinasa
PIK3CA	Subunitat catalítica alfa de fosfatidilinositol-4,5-Bisfosfat 3-Quinasa; p110 α
PIP	fosfatidilinositol 3-fosfat; PtdIns(3)P
PIP2	PtdIns 4,5-bisfosfat; PtdIns(4,5)P2
PIP3	PtdIns 3,4,5-bisfosfat; PtdIns(3,4,5)P3
PPP	Via metabòlica de les pentoses fosfat
PROS	Síndrome de sobrecreixement associat a PIK3CA (<i>PIK3CA-Related Overgrowth Spectrum</i>)
PROX1	<i>Prospero Homeobox protein 1</i>
p-S6	S6 proteïna ribosomal fosforilada
PTEN	Fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfat 3-fosfatasa (<i>Phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10</i>)
qPCR	Reacció en cadena de la polimerasa quantitativa (<i>Quantitative Polymerase Chain Reaction</i>)
ROS	Espècies reactives d'oxigen (<i>Reactive Oxygen Species</i>)
RTKs	Receptors Tirosina Quinasa
SDS	Dodecilsulfat sòdic
SWS	Síndrome de Struge-Weber
TBS	Tampó salí Tris
TBST	Tampó salí Tris amb Tween-20
TEMED	Tetrametiletildiamina

TGFβ	Factor de Creixement Transformant Beta
TJs	Unions estretes (<i>tight junctions</i>)
VE-Cadherin	Caderina de l'endoteli vascular (<i>Vascular Endothelial Cadherin</i>)
VECs	Cèl·lules endotelials venoses
VEGF	Factor de creixement endotelial vascular (<i>Vascular endothelial growth factor</i>)
VEGFR	Receptor del factor de creixement endotelial vascular (<i>Vascular endothelial growth factor receptor</i>)
VMs	Malformacions venoses
WT	Genotip salvatge (<i>Wild type</i>)
αSMA	Actina alfa del múscul llis (<i>αSmooth Muscle Actin</i>)

ÍNDIX DE FIGURES

INTRODUCCIÓ

Figura 1.1. Composició dels principals tipus de vasos sanguinis.	30
Figura 1.2. Il·lustració esquemàtica del sistema VEGF/VEGFR.	30
Figura 1.3. Especificació de les cèl·lules <i>tip/stalk</i> durant l'angiogènesi germinativa.	35
Figura 1.4. Model esquemàtic del desenvolupament vascular embrionari i la diferenciació endotelial.	41
Figura 1.5. Representació esquemàtica de l'expressió diferencial dels marcadors endotelials.	46
Figura 1.6. Representació general de les principals vies metabòliques a les cèl·lules endotelials.	52
Figura 1.7. Formació de la xarxa vascular durant el desenvolupament de la retina del postnatal ratolí.	55
Figura 1.8. Classificació esquemàtica de les diferents subunitats enzimàtiques PI3K.	59
Figura 1.9. Representació esquemàtica de l'activació d'AKT i l'efecte fisiològic d'alguns dels seus efectors.	62
Figura 1.10. Senyalització de PI3K a l'endoteli.	69
Figura 1.11. Classificació de les anomalies vasculars segons les directrius ISSVA 2018.	70
Figura 1.12. Teràpies moleculars dirigides a la inhibició de la via PI3.	77

MATERIALS I MÈTODES

Figura 3.1. Representació gràfica de les estratègies genètiques emprades en els models de ratolí transgènics utilitzats al llarg d'aquesta tesi.	87
Figura 3.2. Injecció de 4-OHT i dissecció de l'ull i la retina postnatal.	91
Figura 3.3. Representació dels procediments per a la quantificació de les imatges de la vasculatura de la retina.	95

RESULTATS

Figura 4.1. Model EC- <i>Pik3ca</i> ^{H1047R/WT}	108
Figura 4.2. La sobreactivació de PI3K derivada de l'expressió <i>Pik3ca</i> ^{H1047R} és potenciada en presència de factors de creixement extracel·lulars	108
Figura 4.3. L'estimulació amb FBS induïx un augment del nombre de cèl·lules <i>Pik3ca</i> ^{H1047R} en proliferació.	109
Figura 4.4. Esquema del procediment experimental per a l'estudi de <i>Pik3ca</i> ^{H1047R} en les diferents etapes del desenvolupament angiogènic de la retina postnatal	110
Figura 4.5. L'estimulació mitogènica és necessària per al desenvolupament de les malformacions vasculars <i>Pik3ca</i> ^{H1047R} <i>in vivo</i>	111
Figura 4.6. El percentatge de cèl·lules recombinants és equiparable entre en les diferents etapes angiogèniques	112

Figura 4.7. La disminució de la dosi de 4-OHT permet configurar un nou model de malformacions vasculars mitjançant l'expressió mosaica de <i>Pik3ca</i> ^{H1047R}	113
Figura 4.8. El model EC-mTmG mostra la proporcionalitat entre el nombre de cèl·lules recombinants per mTmG i la dosi de 4-OHT	114
Figura 4.9. L'expressió endotelial de <i>Pik3ca</i> ^{H1047R} causa l'aparició de malformacions vasculars a venes i capil·lars, però no afecta a les artèries	115
Figura 4.10. Les lesions <i>Pik3ca</i> ^{H1047R} mostren una sobreactivació de la via PI3K/AKT/mTOR... ..	115
Figura 4.11. Les retines <i>Pik3ca</i> ^{H1047R} mostren defectes en la cobertura mural dels vasos.....	116
Figura 4.12. Les lesions causades per <i>Pik3ca</i> ^{H1047R} són hiperproliferatives	116
Figura 4.13. L'administració d'EdU 24 h abans de l'anàlisi confirma l'acumulació de ECs proliferatives en retines <i>Pik3ca</i> ^{H1047R}	117
Figura 4.14. Esquema del procediment experimental per a l'estudi de l'inici del desenvolupament de les malformacions vasculars	118
Figura 4.15. L'anàlisi de les retines <i>Pik3ca</i> ^{H1047R} a P4 permet caracteritzar l'etapa inicial de les malformacions vasculars	118
Figura 4.16. La caracterització de les retines <i>Pik3ca</i> ^{H1047R} a P4 mostra l'inici del fenotip descrit a P6	119
Figura 4.17. Model EC- <i>Pik3ca</i> ^{H1047R/WT} -mTmG.....	121
Figura 4.18. L'absència de lesions a artèries fa evident un biaix de la manifestació fenotípica de <i>Pik3ca</i> ^{H1047R} a venes i capil·lars	122
Figura 4.19. Les ECs <i>Pik3ca</i> ^{H1047R} s'expandeixen preferentment a venes i capil·lars.....	122
Figura 4.20. <i>Pik3ca</i> ^{H1047R} induïx l'activació de PI3K a venes i capil·lars, però no a artèries.....	123
Figura 4.21. Model EC-mTmG	124
Figura 4.22. Caracterització de l'expressió de la línia <i>Bmx-CreER</i> ^{T2} durant el desenvolupament postnatal de la retina	125
Figura 4.23. Model AEC- <i>Pik3ca</i> ^{H1047R/WT} -mTmG	125
Figura 4.24. L'expressió de <i>Pik3ca</i> ^{H1047R} específicament al compartiment arterial no causa anomalies vasculars	126
Figura 4.25. La mutació activadora <i>Pik3ca</i> ^{H1047R} en cèl·lules arterials desencadena un mecanisme refractari de la via PI3K	127
Figura 4.26. Model AEC- <i>Pik3ca</i> ^{H1047R/WT} -iSuRe-Cre.....	127
Figura 4.27. El model AEC- <i>Pik3ca</i> ^{H1047R/WT} -iSuRe-Cre garanteix la recombinació de la mutació a AECs i confirma l'absència de patogenicitat a les artèries	128
Figura 4.28. Model Tip EC- <i>Pik3ca</i> ^{H1047R/WT} -mTmG	129
Figura 4.29. Esquema del procediment experimental per a l'estudi de la dinàmica de les ECs tip <i>Pik3ca</i> ^{H1047R}	129
Figura 4.30. El seguiment de les cèl·lules tip EC- <i>Pik3ca</i> ^{H1047R/WT} -mTmG revela la disrupció del procés d'especificació arterial	130
Figura 4.31. El model Tip EC- <i>Pik3ca</i> ^{H1047R/WT} -mTmG s'expressa en ECs tip al front angiogènic i dona lloc a l'expansió clonal de les cèl·lules mutants.....	131

Figura 4.32. Les ECs <i>tip Pik3ca</i> ^{H1047R} s'expandeixen patològicament a venes i capil·lars, però eviten la diferenciació a artèries	132
Figura 4.33. Les retines <i>Tip EC-Pik3ca</i> ^{H1047R/WT} -mTmG mostren un augment en l'activació de PI3K als capil·lars	133
Figura 4.34. La formació de les artèries no es veu afectada per els canvis en el destí cel·lular de les ECs <i>tip Pik3ca</i> ^{H1047R}	134
Figura 4.35. La sobreactivació de PI3K a ECs <i>tip</i> dona lloc a un augment de la proliferació, responsable de l'aparició de les posteriors malformacions vasculars	134
Figura 4.36. Model <i>Tip EC-iFlu-Mosaic-Pik3ca</i> ^{H1047R/WT}	136
Figura 4.37. El model <i>Tip EC-iFlu-Mosaic-Pik3ca</i> ^{H1047R/WT} desenvolupa nombroses malformacions al llarg del plexe vascular.....	137
Figura 4.38. Les lesions vasculars de les retines <i>tip EC-iFlu-Mosaic-Pik3ca</i> ^{H1047R/WT} són més petites i contingudes i es localitzen majoritàriament a capil·lars i al voltant de les artèries.	137
Figura 4.39. Només les EC <i>tip Pik3ca</i> ^{WT} són capaces d'adquirir identitats arterials i contribuir a la formació de les artèries.....	138
Figura 4.40. Les ECs portadores de la mutació <i>Pik3ca</i> ^{H1047R} queden excloses de l'artèria i s'expandeixen patològicament en venes i capil·lars	138
Figura 4.41. <i>Pik3ca</i> ^{H1047R} indueix l'increment de COUP-TFII	139
Figura 4.42. La inhibició de PI3Kα reverteix la sobreexpressió de COUP-TFII a les cèl·lules <i>Pik3ca</i> ^{H1047R}	140
Figura 4.43. Representació gràfica de l'anàlisi transcripcional comparatiu per a l'obtenció de la signatura comú entre la senyalització de PI3K, COUP-TFII i la identitat endotelial venosa	141
Figura 4.44. L'anàlisi transcripcional de la senyalització de PI3K, COUP-TFII i la identitat endotelial venosa dona lloc a una signatura comú	142
Figura 4.45. EPHB4 i CXCR4, dues proteïnes implicades en la identitat endotelial, formen part de la signatura de PI3K/COUP-TFII.....	143
Figura 4.46. Esquema del procediment experimental per al rescat farmacològic de les lesions vasculars <i>Pik3ca</i> ^{H1047R} mitjançant l'ús de l'inhibidor de COUP-TFII CIA1	144
Figura 4.47. La inhibició farmacològica de COUP-TFII no és suficient per revertir el fenotip de <i>Pik3ca</i> ^{H1047R}	144
Figura 4.48. Models per a l'estudi de la deleció genètica de COUP-TFII durant el desenvolupament de malformacions vasculars <i>Pik3ca</i> ^{H1047R}	145
Figura 4.49. Perfil metabolòmic de les cèl·lules <i>Pik3ca</i> ^{H1047R}	148
Figura 4.50. L'expressió de <i>Pik3ca</i> ^{H1047R} provoca l'increment de nombrosos metabòlits de la via del glutatió.....	148
Figura 4.51. Representació gràfica de la via del glutatió i els metabòlits i enzims implicats en el fenotip de <i>Pik3ca</i> ^{H1047R}	149
Figura 4.52. Enzims involucrats en la biosíntesi i oxidació del glutatió presenten desregulacions transcripcionals en cèl·lules <i>Pik3ca</i> ^{H1047R}	150
Figura 4.53. Les cèl·lules <i>Pik3ca</i> ^{H1047R} no mostren major sensibilitat a la inhibició de la síntesi de glutatió.....	151

Figura 4.54. L'expressió de <i>Pik3ca</i> ^{H1047R} provoca l'increment de nombrosos intermediaris de la glicòlisi i el cicle TCA.....	152
Figura 4.55. Representació gràfica dels canvis metabòlics sobre els intermediaris de la glicòlisi i el cicle TCA a causa de l'expressió de <i>Pik3ca</i> ^{H1047R}	153
Figura 4.56. La repressió de la glicòlisi limita la capacitat d'expansió dels clons cel·lulars <i>Pik3ca</i> ^{H1047R}	154

ÍNDEX DE TAULES

INTRODUCCIÓ

Taula 1.1. Resum de les línies Cre endotelials més utilitzades per a l'estudi de l'angiogènesi i la biologia vascular	55
Taula 1.2. Classificació de les malformacions vasculars en vers a les característiques hemodinàmiques de la lesió i les mutacions genètiques associades.....	76

MATERIALS I MÈTODES

Taula 3.1. Resum de les característiques del models murins transgènics utilitzats.	86
Taula 3.2. <i>Primers</i> i condicions de les reaccions PCRs per al genotipatge animal.	89
Taula 3.3. Reactius i <i>kits</i> comuns.....	102
Taula 3.4. Inhibidors	103
Taula 3.5. Medis i reactius per al cultiu cel·lular	103
Taula 3.6. Anticossos primaris	103
Taula 3.7. Anticossos secundaris per a la immunodetecció proteica.....	104
Taula 3.8. Anticossos secundaris per a la tinció per immunofluorescència	104
Taula 3.9. Materials i altres equips	105
Taula 3.10. <i>Primers</i> per a l'anàlisi de l'expressió gènica per qPCR	105

RESULTATS

Taula 4.1. Principals enzims implicats en la via metabòlica del glutatió.	150
--	-----

INTRODUCCIÓ

1. El sistema circulatori

La funció principal del sistema circulatori en mamífers és el transport i la distribució d'oxigen i nutrients a totes les cèl·lules del cos i la recuperació i eliminació del diòxid de carboni i altres substàncies residuals. A més a més, el sistema circulatori és essencial per la distribució d'aigua, electrolits i hormones al llarg de l'organisme i té una contribució molt important com a infraestructura per al funcionament del sistema immunològic i la termoregulació dels teixits. Es tracta doncs d'un sistema complex conformat pel sistema cardiovascular i el sistema limfàtic.

El sistema cardiovascular està constituït per un motor, el cor, una complexa xarxa de conductes format per artèries, venes i capil·lars, i el fluid que condueixen, la sang. El cor és considerat el centre del sistema circulatori i actua com una bomba muscular que bateja de forma arrítmica amb l'objectiu d'impulsar la sang a través dels vasos i distribuir-la per tot l'organisme. S'anomena circulació menor o pulmonar al circuit que s'estableix entre el cor i els pulmons amb l'objectiu de captar l'oxigen als alvèols pulmonars i portar el diòxid de carboni als pulmons, on és expulsat. D'altra banda, la circulació major o circuit sistèmic, és aquell que s'estableix entre el cor i els diferents òrgans del cos. En aquest cas, la sang viatja des del cor a les artèries, distribuint la sang oxigenada i els nutrients a tots i cada un dels teixits de l'organisme, per seguidament, ser retornada al cor mitjançant el sistema venós.

En paral·lel, el sistema limfàtic consta d'una xarxa d'òrgans, teixits i vasos, la funció dels quals és transportar la limfa, un fluid blanquinós amb alt contingut de cèl·lules immunitàries, proteïnes i productes de rebuig cel·lular. Així doncs, els vasos limfàtics drenen aquest fluid de tots els teixits del cos, per més tard, retornar-lo al sistema venós a través dels conductes col·lectors. Al llarg de la xarxa limfàtica trobem els ganglis limfàtics, que són els encarregats de filtrar la limfa de patògens i exposar-los al sistema immunològic per evitar infeccions. D'aquesta manera, el sistema limfàtic esdevé una part essencial per al funcionament de l'organisme amb una important implicació en l'absorció de greixos i nutrients i en la regulació dels líquids.

2. Tipus i composició dels vasos sanguinis

Les venes i les artèries són els vasos de major calibre, els quals es ramifiquen en vèdules i arterioles, respectivament, i finalment, en capil·lars, els vasos més petits i amb major extensió al llarg de l'organisme. Podem identificar les artèries com a vasos de menys diàmetre i amb poques ramificacions o branques, les quals es formen deixant un espai considerable entre l'arteria i els capil·lars que l'envolten. Per tant, la remodelació dels

capil·lars arterials comporta un extensiu procés de retracció o “*pruning*” mitjançant una retracció i estrenyiment dels vasos, per finalment deslligar-se de l'arteria. Tot i que aquest fet també es dona durant la formació i remodelació dels capil·lars venosos, és un fenomen significativament més freqüent a l'espai periarterial. Una altra característica de les artèries és la seva morfologia estreta i recte, a causa de la necessitat d'adaptació a l'alt i ràpid flux sanguini i a les considerables pressions locals que aquest comporta. A més a més, les cèl·lules que formen les artèries es presenten elongades i s'alineen en paral·lel per formar el vas.

D'altra banda, les venes són morfològicament més irregulars i presenten diàmetres més grans. En comparació amb les artèries, a venes i capil·lars trobem més quantitat de cèl·lules endotelials (ECs) proliferatives, suggerint una major plasticitat. També hi ha diferències notables en el reclutament i associació amb les cèl·lules que cobreixen el vasos, les anomenades cèl·lules murals. Durant la diferenciació arteriovenosa, les artèries es recobreixen d'una gran quantitat de cèl·lules musculars llises vasculars (vSMCs), alineades perpendicularment al sentit del flux per reforçar el vas i donar-li estabilitat. En el cas de les venes, aquestes cèl·lules murals són menys abundants i menys alineades. Als capil·lars, les cèl·lules murals encarregades de cobrir el vas són els pericits (PCs), unes cèl·lules contràctils especialitzades, encarregades de proporcionar estabilitat mecànica al vas.

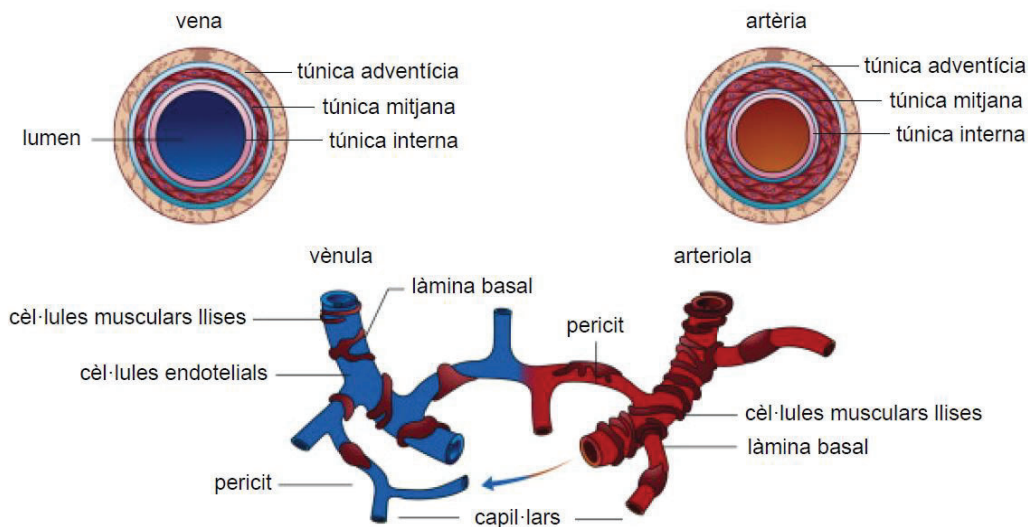


Figura 1.1. Composició dels principals tipus de vasos sanguinis. Estructura tissular d'artèries i venes, constituïdes per tres capes tissulars: la túnica íntima, la túnica mitjana i la túnica adventícia (part superior de la imatge). Estructura i organització de vènules, arterioles i capil·lars (part inferior de la imatge). Imatge modificada de *Stratman et al. 2015*.

En artèries i venes podem distingir tres capes de teixit diferents envoltant el conducte intern per el que circula la sang, també anomenat lumen. De dins cap enfora trobem: 1) la túnica íntima, composada per una fina capa de ECs que revesteixen la capa més interna del vas i es troben en contacte directe amb el lumen i la sang. Aquestes estan recobertes d'una làmina basal i teixit connectiu. 2) La túnica mitjana, formada per

diverses capes (depenent del tipus de vas) de cèl·lules musculars llises i matriu extracel·lular (ECM) rica en elastina. 3) La túnica adventícia, a la part més exterior, formada per teixit conjuntiu lax, rica en col·lagen i encarregada de mantenir i protegir l'estructura del vas. Les artèries presenten una túnica mitjana més gruixuda capaç de suportar pressions sanguínies més altes, mentre a l'interior de les venes trobem vàlvules per tal d'assegurar la unidireccionalitat del flux sanguini. D'altra banda, els capil·lars només estan formats per una fina capa d'ECs recoberta de PCs i una membrana basal (1) (**Figura 1.1**).

3. Desenvolupament vascular

La formació del sistema vascular és un dels primers esdeveniments durant el desenvolupament embrionari i la organogènesis en vertebrats. Tots els òrgans depenen directament de l'abastiment de nutrients i oxigen, i de l'eliminació de residus, pel que l'establiment d'una xarxa vascular funcional és essencial durant les primeres etapes embrionàries. Així mateix, el manteniment de la integritat vascular i la seva funcionalitat esdevenen de vital importància durant períodes postnatsals i adults. Molts dels processos que regulen el desenvolupament vascular són reactivats també en contextos de regeneració tissular, cicatrització i circumstàncies patològiques, pel que la comprensió dels mecanismes responsables d'aquests esdeveniments són imprescindibles per la investigació i el tractament d'un gran nombre de patologies. En el següent apartat es detallaran les principals àrees de coneixement en desenvolupament vascular i biologia de la cèl·lula endotelial.

3.1. Origen dels vasos sanguinis

El sistema cardiovascular de l'embrió en vertebrats s'origina *de novo* a la fulla germinativa mesodèrmica mitjançant un procés anomenat vasculogènesi. Les condicions hipòxiques del teixit donen lloc a una subpoblació de cèl·lules progenitores que formen l'angioblast, i que tindran la capacitat de diferenciar-se i organitzar-se en un plexe vascular primitiu, on les ECs comencen a adquirir identitats arterials, venoses i capil·lars. D'altra banda, estudis recents, suggereixen un nou origen de ECs, provinents de precursors hematopoètics, que també podrien contribuir a la vasculogènesi (2).

Progressivament, la xarxa vascular s'expandeix i es remodela per formar un sistema jeràrquic de vasos de gran calibre que es ramifiquen en conductes més petits. Aquest és el procés anomenat angiogènesi, mitjançant el qual es formen vasos nous a partir de la vasculatura ja existent. Nous brots o *sprouts* de ECs són guiades per els factors de creixement presents a l'entorn, migrant i organitzant-se en noves branques vasculars. Aquest procés es coneix com angiogènesi germinativa o *sprouting angiogenesis*.

Els vasos sanguinis pateixen canvis constants, amb l'objectiu d'expandir, remodelar o adaptar la xarxa a les necessitats de nutrients, oxigen i eliminació residual de cada òrgan. Per tant, la comunicació continuada de la EC amb el teixit que l'envolta li dona la

plasticitat suficient per ajustar-se a les circumstàncies de cada moment. A més a més, al llarg del desenvolupament, les ECs adquireixen una especificitat inter- i intra-tissular gràcies a les senyals moleculars que modulen les seves característiques funcionals (3).

Curiosament, els vasos també es poden formar mitjançant la divisió dels canals existents. Ho fan a partir de la formació d'un pilar intraluminal que resulta en la divisió i bifurcació del conducte. Aquest procés s'anomena angiogènesi intussusceptiva. Tot i ser un procés poc estudiat en el camp de la biologia vascular, s'ha demostrat que l'angiogènesi intussusceptiva contribueix de manera important en la remodelació dels vasos (4,5) i el desenvolupament vascular tumoral (6).

3.2. Fonaments i regulació de l'angiogènesi

La complexitat del desenvolupament vascular es reflecteix en el seu estricte control molecular. Nombroses vies de senyalització estan implicades en la regulació de la germinació, remodelació, maduració i diferenciació dels vasos. Durant les últimes dècades, dues d'aquestes vies han estat estudiades com a motors centrals de la regulació de l'angiogènesi: VEGF/VEGFR i Notch. També cal destacar com a protagonistes de la senyalització vascular les vies de PDGFB, TGF β , PI3K o MAPK, les quals han demostrat rols essencials en la biologia endotelial.

3.2.1. VEGF/VEGFR

El factor de creixement endotelial vascular (VEGF) és el principal factor de creixement angiogènic que modula la formació dels vasos a través dels receptors de la tirosina quinasa VEGF (VEGFR). Múltiples VEGF (VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D i PlGF) són secretats a la matriu extracel·lular per part dels teixits hipòxics, on interactuen amb certa especificitat amb els seus receptors; VEGFR1, VEGFR2 i VEGFR3 (**Figura 1.2**). La distribució, composició i gradient d'aquests factors determina el destí de les ECs durant l'organogènesi, ja que aquestes són capaces de percebre i interpretar-los com una senyal d'activació endotelial (7).

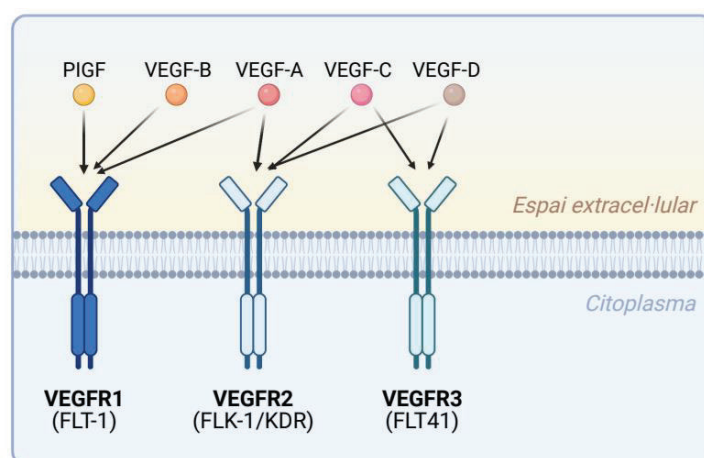


Figura 1.2. Il·lustració esquemàtica del sistema VEGF/VEGFR. La família VEGF inclou VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D i PlGF, els quals s'uneixen al seu receptor específic regulant el procés angiogènic.

Tot i la implicació de tots els factors VEGF en el creixement i manteniment dels vasos, VEGF-A (també referit com VEGF) ha esdevingut el gran protagonista en el procés angiogènic. Quan VEGF-A s'uneix al seu receptor endotelial VEGFR2 (anomenat també KDR o FLK-1), aquest pot exercir de manera transitòria la seva activitat quinasa i formar un complex amb una tirosina intracel·lular o serina/treonina quinasa. Els receptors activats donen lloc a l'activació d'altres proteïnes intracel·lulars i a la producció de diversos missatgers. Finalment, aquests senyals es transmeten al nucli i indueixen l'expressió de gens específics, modulant així la proliferació, la supervivència, la migració i la permeabilitat de les ECs (8).

La senyalització de VEGF-A/VEGFR2 sembla induir respostes cel·lulars implicades en l'angiogènesi modulant la senyalització de vies tant importants com MAPK, PI3K, AKT, PIC-γ i petites GTPases (9). De fet, l'haploinsuficiència del gen codificant per VEGF-A, resulta en letalitat embrionària a causa de la formació anormal dels vasos sanguinis durant la gestació (10). VEGF-A es pot unir tant a VEGFR1 com a VEGFR2, tenint una afinitat més alta amb el primer. Curiosament, VEGFR1 té una activitat tirosina quinasa molt més feble en comparació amb VEGFR2, i també pot existir en la seva forma secretada i inactiva, actuant per tant com un esquer que regula la magnitud de la resposta pro-angiogènica. Estudis en ratolins han demostrat la importància d'aquests receptors durant el creixement dels vasos, ja que els animals amb deficiència de VEGFR1 o VEGFR2 moren durant el desenvolupament embrionari primerenc a causa de defectes vasculars greus, però mostren fenotips oposats. Mentre que els ratolins amb manca de VEGFR2 mostren deficiències en la formació dels vasos degut a la falta de proliferació i germinació endotelial (11,12), ratolins amb deficiències en VEGFR1 mostren una expansió i desorganització excessiva de l'endoteli (13).

VEGFR3 (també conegut com FLT-4) és activat per VEGF-C i es troba present a totes les ECs durant el desenvolupament del sistema. En concret, s'ha demostrat la seva alta expressió en els *sprouts* angiogènics, on la seva absència es reflecteix en una disminució de la germinació dels vasos, així com un impacte negatiu en la proliferació endotelial i la densitat vascular (14). Altres estudis també suggereixen que VEGFR3 controla la senyalització de VEGF-A/VEGFR2 i la permeabilitat dels vasos, prenent especial importància en el manteniment de la quiescència endotelial (15). D'altra banda, en la xarxa vascular madura la expressió de VEGFR3 es restringeix a les cèl·lules endotelials limfàtiques (LECs), sent aquest considerat un factor clau durant la limfangiogènesi (16).

3.2.2. La via de senyalització de Notch

Notch constitueix una via de senyalització crucial durant l'embriogènesi, en especial per al sistema circulatori. Es tracta d'una via altament conservada al llarg de l'evolució, constituïda de quatre receptors (Notch1, Notch2, Notch3 i Notch4) i cinc lligands (Dll1, Dll3, Dll4, Jagged1 i Jagged2). L'activació de la via s'inicia per el contacte directe cèl·lula-cèl·lula, entre un lligand transmembrana i el receptor de membrana de la cèl·lula veïna. Aquesta unió provoca l'alliberament del domini intracel·lular de Notch (NICD), el qual es trasllada al nucli i s'acobla amb la proteïna d'unió a l'ADN RBPJ per regular la transcripció de diversos gens modulats per Notch, inclosos HES, HEY i Dll4. La EC expressa

principalment els receptors Notch1 i Notch4, i els lligands Dll1, Dll4 i Jagged1 (17). Múltiples estudis sobre el rol de Notch durant l'angiogènesi han demostrat la funció essencial d'aquesta. Més concretament, la inactivació de Notch1 o Dll4 provoquen el descontrol dels processos angiogènics donant lloc a un augment de l'*sprouting*. En concordança amb aquests resultats, la sobreactivació de Notch resulta en el fenotip oposat. Com veurem amb més detall en l'apartat següent, l'eix de senyalització de Dll4 i Notch dirigeix l'especificació endotelial necessària per a la formació de nous vasos.

3.3. *Sprouting angiogenesis*: regulació i senyalització

L'angiogènesi per germinació o *sprouting angiogenesis* és un procés biològic dinàmic i complex que implica la formació de nous vasos a partir dels conductes ja existents. Es tracta d'un esdeveniment fonamental durant el creixement i desenvolupament dels teixits, així com durant la iniciació i progressió de diverses malalties.

En resum, les ECs que formen les parets dels vasos són estimulades per migrar i proliferar. Factors de creixement i altres components extracel·lulars estimulen l'endoteli per formar un *sprout*, que s'estén a través de la matriu extracel·lular, per finalment formar un nou lumen. Aquest procés es pot dividir en cinc passos: iniciació, elongació, anastomosis i formació del lumen, maduració i remodelació, i restabliment de la quiescència.

3.3.1. Iniciació i elongació

En aquells teixits on es requereix vascularització es produeixen una gran varietat de senyals moleculars que estimulen la proliferació i mobilització de les ECs. La hipòxia present en aquestes àrees fa que els teixits generin i secretin factors de creixement vascular, uns factors pro-angiogènics que s'uneixen als seus receptors, enriquits a la superfície de les ECs. Aquest senyal paracrí inicia l'activació de l'endoteli i tot el procés angiogènic.

Les ECs i les cèl·lules murals comparteixen una membrana basal formada per proteïnes de la matriu extracel·lular que formen una màniga al voltant dels conductes (18). Aquesta membrana basal i la capa de cèl·lules murals impedeixen que les ECs del vas abandonin les seves posicions. Per aquest motiu, a l'inici de la germinació, les cèl·lules activades per els senyals VEGF seran les encarregades de secretar metal·loproteases (com per exemple MMP1) amb l'objectiu de degradar la membrana basal que les envolta i alliberar-les, facilitant l'espai necessari per a la seva expansió. Les cèl·lules activades lideraran el procés angiogènic, i a la vegada, s'encarregaran de transmetre el senyal i coordinar les cèl·lules adjacents. Les anomenades cèl·lules de punta o cèl·lules *tip*, són aquelles que promouen i guien la migració al front angiogènic d'acord amb el gradient de VEGF. D'altra banda, les cèl·lules de tija o cèl·lules *stalk*, són aquelles situades a continuació de les primeres, amb la missió d'elongar-se i proliferar, donant suport a la formació dels nous vasos. L'especificació entre les cèl·lules *tip* i *stalk* és controlada per la interacció entre la senyalització de VEGF i Notch.

Inicialment, les cèl·lules *tip* són activades per VEGF-A, que mitjançant la seva unió al receptor VEGFR2, canvien la seva morfologia, comportament i metabolisme per tal de formar projeccions citoplasmàtiques (fil·lopodis i lamel·lopodis) i induir la seva capacitat migratòria. Un cop activades, les cèl·lules *tip* augmenten l'expressió del lligand Dll4, el qual s'uneix al receptor de Notch1 de les cèl·lules contigües o *stalk*, activant així la via de senyalització molecular Notch en aquestes últimes. La senyalització de Notch inhibeix l'especificació a EC *tip* mitjançant la disminució de l'expressió dels receptors VEGFR2 i augmentant de l'expressió de VEGFR1. VEGFR1 té alta afinitat per unir-se a VEGF-A, però baixa capacitat activadora (19), pel que disminueix la sensibilitat a l'estimulació amb VEGF. A més a més, Notch activa la transcripció de gens com HES, HEY (17), PTEN (20) i NRARP (21,22), entre altres, contribuint així a l'especificació de la cèl·lula *stalk*. La transició de les cèl·lules *tip/stalk*, mitjançant la inhibició lateral mediada per la senyalització VEGFR2-Dll4-Notch, fa possible l'especialització com a *tip* d'una sola cèl·lula en un grup de ECs (**Figura 1.3**). Tot i així, aquest és un procés en continua evolució, on trobem una constant competició per assolir el lideratge de l'angiogènesi que fa possible la migració òptima de les cèl·lules d'acord amb el gradient de senyals pro-angiogènics (23). De fet, treballs anteriors han demostrat que la inactivació farmacològica de Notch o Dll4 dona lloc a la hipertrofia vascular, degut a l'augment de cèl·lules especificades com a *tip* (24,25).

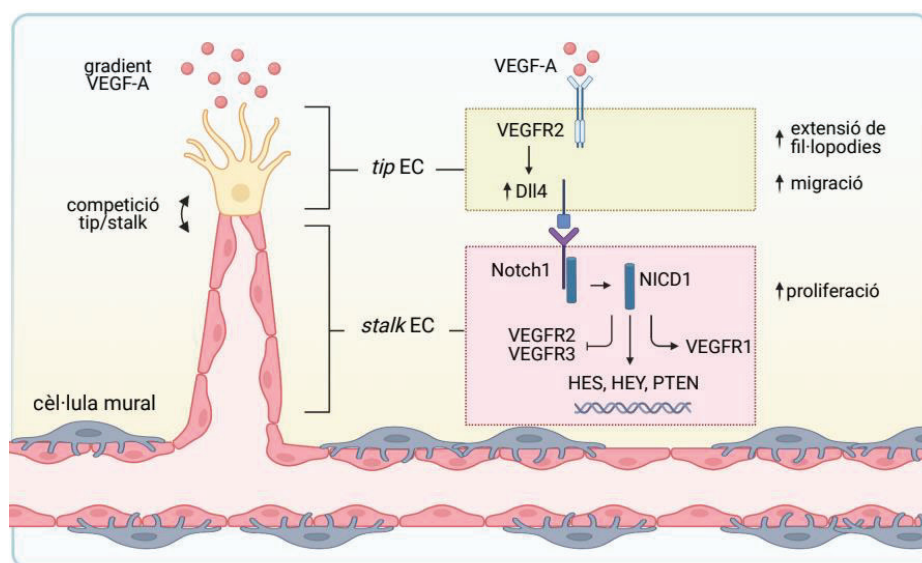


Figura 1.3. Especificació de les cèl·lules *tip/stalk* durant l'angiogènesi germinativa. Durant l'angiogènesi germinativa, les vies de senyalització VEGF i Notch estan directament implicades en l'especificació de les cèl·lules *tip* i *stalk* a l'endoteli vascular. VEGF-A interacciona amb VEGFR2, expressat a la superfície de les ECs dels vasos quiescents, el que indueix la seva activació, l'especificació com a cèl·lula *tip* i expressió de Dll4. A seu torn, Dll4 a la superfície de les cèl·lules *tip* permet l'activació del receptor Notch1 a les cèl·lules adjacents o cèl·lules *stalk*. La senyalització de Notch en aquestes últimes indueix l'especificació de la cèl·lula mitjançant l'expressió de gens com HES, HEY o PTEN, i a la vegada, facilita l'expressió de VEGFR1 i redueix l'expressió de VEGFR2.

Un cop diferenciades, les cèl·lules *stalk*, presenten molt pocs fil·lopodis, ja que s'especialitzen en donar suport al creixement dels vasos i la correcta formació del lumen mitjançant la formació d'unions cel·lulars. L'activació de Notch a les cèl·lules *stalk* desencadena l'expressió de NRARP, que a la vegada activa la via de senyalització Wnt/ β -catenin per tal de regular la proliferació endotelial i l'estabilitat del vas (21,22). Per fer-ho, Notch indueix un arrest del cicle cel·lular mitjançant la senyalització de PTEN (20), per, a continuació, promoure la via de Wnt, la qual activarà la proliferació (mitjançant Lef1/Cyclin D1) superant l'efecte anti-proliferatiu inicial de Notch (22). A més a més, la senyalització continuada de Notch a les cèl·lules *stalk*, indueix una expressió diferencial de VE-Cadherin, que impulsa canvis estructurals en el citoesquelet d'actina, facilitant així les unions cel·lulars estables, l'elongació del nou vas i la producció de la nova membrana basal (26,27). És important tenir en compte que les identitats *tip* i *stalk* són fenotips transitoris i no destins cel·lulars definitius, ja que per expandir la xarxa de vasos, les EC pateixen cicles iteratius de germinació, ramificació i tubulogènesi, que requereixen transicions dinàmiques entre aquests dos tipus cel·lulars (28).

A nivell molecular, les cèl·lules *tip* es caracteritzen per l'alta expressió de Dll4, PDGFB, NRP-1, MT1-MMP, VEGFR-2 i VEGFR-3 i baixos nivells d'expressió de gens governats per la senyalització de Notch (28,29). Aquest tipus cel·lular també s'especialitza en l'expressió de receptors que facilitaran la correcta orientació de l'angiogènesi, com ara ROBO, UNC5B, PLEXIN-D1, NRPs i membres de la família EPH (28). En canvi, el perfil d'expressió genètica de les cèl·lules *stalk* es caracteritza per l'increment de VEGFR-1, NRARP, els lligands de Notch, Jagged1 i Dll1, Robo4 i VCAM1 (29).

3.3.2. Anastomosis i formació del lumen

Anomenem anastomosis vascular al procés per el qual es connecten dos brots angiogènics. L'anastomosis consisteix per tant en la formació d'un nou contacte estable entre dues ECs, ja siguin cèl·lules *tip*, o bé, entre un brot angiogènic i un vas estable i funcional. Podem distingir dos mecanismes d'anastomosis diferents depenent del context; 1) els brots que es fusionen no estan lumenitzats, 2) l'anastomosis es dona entre vasos lumenitzats i en presència de pressió sanguínia. En qualsevol dels casos, l'anastomosis requereix el contacte entre dues ECs mitjançant la interacció dels seus fil·lopodis i la fusió de les cèl·lules. També els macròfags poden jugar un paper important facilitant la unió entre cèl·lules *tip* (30).

Quan la connexió entre ECs s'estabilitza, s'inicia la generació de la nova membrana apical i la seva expansió al llarg del nou vas. Un cop consolidada la unió, es requereix la lumenització del conducte per iniciar la irrigació sanguínia. Durant els darrers anys, s'han proposat diferents mecanismes de lumenització vascular, ressaltant com a més comuns dos d'ells. Per una banda, les ECs poden formar el lumen per coalescència de vacúols intracel·lulars (pinocítics), que s'interconnecten amb vacúols de ECs veïnes. Aquest mecanisme també es coneix com "buidament cel·lular" (31,32). Altres estudis han descrit també fenòmens de reajustament morfològic de la EC i remodelació de les unions cèl·lula-cèl·lula per a la obertura del lumen. En aquest cas, després de definir la seva polaritat, la membrana apical de la EC (en contacte amb el lumen) es revesteix de

glicoproteïnes carregades negativament, adquirint un senyal repulsiu que dona lloc a la obertura del lumen extracel·lular (31,33). Els mecanismes per a la formació del lumen vascular dependran del tipus de vas i de teixit a vascularitzar.

3.3.3. Maduració, estabilització i quiescència

La maduració del vas és essencial per a la seva funcionalitat i inclou tres passos principals: la formació d'unions entre les ECs, el reclutament i associació a les cèl·lules murals corresponents, que donaran suport a les ECs, i la reconstitució de la membrana extracel·lular, que protegirà el vas i li permetrà el contacte amb el teixit que l'envolta (34).

A la vegada, l'arribada del flux sanguini al nou conducte remodelarà la xarxa i iniciarà l'activació de vies de senyalització, com per exemple, la del factor de transcripció KLF2 (35), el qual és sensible a l'estrès produït per la pressió i la fricció del fluid (*shear stress*). Les forces hemodinàmiques són capaces de remodelar grans artèries i esdevenen un factor important per al manteniment de vas i la seva expansió colateral. Amb l'inici de la perfusió, l'intercanvi d'oxigen i nutrients provoca una reducció en la presència de VEGF al teixit i, per tant, la disminució de l'angiogènesi i la transició de la EC a un fenotip més quiescent. Durant aquest procés, les ECs també sofriran una diferenciació cel·lular per tal d'adaptar-se a les demandes del propi teixit i al tipus de vas del que formen part (36).

3.3.3.1. Unions cel·lulars

Les unions entre les ECs que formen el vas, no només facilitaran la unió sòlida entre elles, sinó que també seran clau per a la seva comunicació i la regulació de la permeabilitat i integritat del conducte. Aquestes connexions es formen mitjançant complexes multi-proteics que inclouen elements transmembrana i intracel·lulars. A més de connectar les ECs entre elles, també fan possible la interacció amb altres tipus cel·lulars i la matriu extracel·lular que les envolta, a la vegada que participen en la comunicació i transmissió de senyals a components intracel·lulars en resposta a senyals extracel·lulars.

Troben dos tipus principals d'unions entre ECs segons la seva composició i localització: unions estretes o *tight junctions* (TJs) i unions adherents o *adherent junctions* (AJs). Les TJs es troben a la part més apical del vas i la seva funció principal és la regulació de la permeabilitat del mateix (37), pel que tenen especial importància durant la formació de la barrera hematoencefàlica (38,39). Aquest tipus d'unions inclouen proteïnes de la família de les claudines i les ocludines, entre altres. Per altra banda, les AJs es troben a posicions més basals i, a més d'iniciar el contacte entre cèl·lules i regular la permeabilitat, també regulen la remodelació del citoesquelet i contribueixen significativament a la senyalització cel·lular. En aquest cas, les proteïnes més abundants són les cadherines i les catenines (37). En concret, VE-Cadherin, una proteïna transmembrana implicada en l'organització de les AJs, destaca per la seva especificitat endotelial i per l'important paper durant el desenvolupament vascular embrionari, així com al manteniment de la vasculatura adulta. S'ha demostrat que VE-Cadherin pot formar complexes amb VEGFR2 i membres de la família TGF β , esdevenint un factor clau per a la regulació de la diferenciació, el creixement i l'estabilitat endotelial (37,40). De fet, la deficiència o

absència d'aquesta proteïna durant el desenvolupament embrionari causa greus defectes vasculars incompatibles amb la vida (41).

3.3.3.2. Cèl·lules murals

Un altre aspecte fonamental per a la maduració i estabilització dels vasos sanguinis és l'associació amb les cèl·lules murals, es a dir, aquelles cèl·lules especialitzades en cobrir els vasos aportant estabilitat estructural, però que també participen directament en la regulació de la proliferació i la migració endotelial. Les podem dividir entre cèl·lules musculars llises (vSMCs) i pericits (PCs). Mentre els PCs estableixen contacte directe amb les ECs a capil·lars i arterioles o vècules de petit diàmetre, les vSMCs recobreixen els vasos de gran calibre com artèries o venes, mantenint-se separades de l'endoteli per una làmina basal (28,42). A més a més, les cèl·lules murals no serveixen tan sols com a suport estructural per als vasos, sinó que també contribueixen a la síntesis i organització dels components de la matriu extracel·lular.

Els PCs estan incrustats a la làmina basal, en contacte directe amb les ECs capil·lars. Tot i el creixent interès en aquest tipus cel·lular durant els darrers anys, aquests continuen sent una entitat relativament poc definida (42). Marcadors com NG2 (43), PDGFR β (44), α SMA (45) o desmina (46) són utilitzats per identificar els PCs. No obstant, cap d'ells és estrictament específic ni extrapolable a tots teixits, pel que cal tenir en compte que totes aquestes molècules també poden ser presentades per altres tipus cel·lulars, com ara fibroblasts perivasculars, vSMCs i macròfags.

A la literatura s'han descrit diverses vies de senyalització implicades en l'especificació, diferenciació i reclutament de les cèl·lules murals. La interacció entre el lligand PDGFB i el receptor PDGFR β té un efecte directe durant el reclutament de PCs. La secreció de PDGFB per part dels brots angiogènics de l'endoteli serveix com a atracció per als PCs propers, els quals expressen PDGFR β . A més a més, PDGFB també estimula la proliferació de vSMCs i induïx la diferenciació de progenitors mesenquimals a cèl·lules murals (47,48). L'adequada expressió, unió i la correcta localització tant de PDGFB com de PDGFR β són trets essencials per la maduració vascular, ja que la inactivació de qualsevol dels dos components dona lloc a deficiències en el revestiment mural, disfunció vascular i hemorràgies letals durant el desenvolupament embrionari de ratolí (49–51).

Mentre que l'eix PDGFB/PDGFR β s'ha definit com una senyalització de l'endoteli cap a les cèl·lules murals, una altra via de senyalització important com la de l'Angiopietina (ANG) i el receptor TIE2, presenta l'orientació oposada. ANG1 és secretada per els PCs per unir-se al receptor TIE2 a les ECs. Aquesta unió promou la supervivència i quiescència de les últimes. Pel contrari, ANG2, antagonista de TIE2, és secretada per les ECs a l'inici del procés angiogènic, promovent així la desconexió dels PCs. És evident per tant que el balanç entre ANG1 i ANG2 esdevé essencial per a l'equilibri de la xarxa vascular (28,52,53). En definitiva, alteracions en la densitat o unions inestables entre les cèl·lules murals i l'endoteli són desencadenants d'anomalies vasculars amb greus repercussions per a la funcionalitat del sistema vascular. De fet, nombroses malalties humanes, com ara la retinopatia diabètica, les malformacions venoses o alguns

casos de tumors sòlids, han estat associades amb defectes en la cobertura mural dels vasos (48).

3.3.3.3. Matriu extracel·lular

La matriu extracel·lular o ECM és una xarxa complexa de proteïnes, glicoproteïnes, proteoglicans i polisacàrids. Mitjançant múltiples interaccions entre sí i amb els receptors de les superfícies cel·lulars, l'ECM determina les propietats físiques i mecàniques dels teixits i influeix significativament en el comportament de la cèl·lula. Aquesta estructura acel·lular proporciona suport adhesiu i mecànic per als constituents cel·lulars, dirigint la seva organització morfològica i prenent part en les funcions fisiològiques mitjançant la unió a factors de creixement. A l'endoteli, s'han identificat dues entitats extracel·lulars bioquímicament i morfològicament diferenciades: la matriu intersticial i la membrana basal. La primera està formada principalment per col·làgens fibril·lars i no fibril·lars, fibres elàstiques i glicoproteïnes que contenen glicosaminoglicans (hialuronà i proteoglicans). En canvi, la membrana basal està composta per làmines de matriu extracel·lular altament especialitzades que envolten cèl·lules epitelials o endotelials, hialuronà format per col·lagen IV, laminines, entactina i proteoglicans de sulfat d'heparan. Aquesta estructura pot contribuir directament en la regulació de la morfologia cel·lular, l'expressió gènica, la proliferació, la migració i l'apoptosi endotelial (54,55).

L'ECM és una estructura altament dinàmica, en contínua remodelació, que es forma per la deposició, degradació i modificació dels seus components. La degradació de la membrana basal és determinant durant l'inici de l'angiogènesi, on la seva remodelació mitjançant metal·loproteases de membrana fa possible la senyalització i expansió dels vasos, així com la migració i orientació dels pericits. Aquesta matriu també proporciona una bastida d'unió per a gran varietat de citocines i factors pro-angiogènics que exerceixen funcions de senyalització per a la coordinació de la formació del teixit (56).

3.3.3.4. Remodelació i quiescència

Un cop formades, les xarxes vasculars es someten a processos de remodelació amb l'objectiu de formar una vasculatura funcional i madura. Per tant, vasos o branques vasculars que ja no siguin necessàries sofriran una regressió o *pruning* (57). L'absència de factors que promoguin la supervivència de la EC, com ara VEGF, pot causar la regressió dels vasos sanguinis com a conseqüència de la mort endotelial per apoptosi (57). Altrament, hi ha evidències que mostren que el procés de *pruning* depèn de la migració i reordenació de les ECs als vasos veïns. En aquest cas, els canvis locals de flux sanguini afavoreixen la reorganització de les ECs i la absorció del vas en regressió (58–60).

Finalment, a mesura que els nous vasos satisfan les necessitats d'oxigen i nutrients del teixit, els nivells de proliferació i migració endotelial disminueixen, esdevenint quiescents. Aquestes cèl·lules, també anomenades cèl·lules *phalanx*, són les encomiades a garantir la integritat del vas i sobreviure a possibles situacions d'estrès. Per això, cal que desenvolupin l'habilitat de generar i rebre senyals de supervivència autocrines i paracrines. La senyalització mitjançant VEGF a les cèl·lules *phalanx* actua com a senyal

anti-apoptòtica, però no indueix proliferació, a diferència del que em vist en el context angiogènic (11). Curiosament, la pròpia EC quiescent també és capaç de generar VEGF, activant així la via de senyalització PI3K/AKT, la qual evitarà la mort cel·lular (28,61). A més a més, la quiescència i supervivència cel·lular també és regulada per la senyalització de ANG1/TIE2 (62,63), BMP9/ALK1 (63), i la pressió del flux sanguini o *shear stress*, mitjançant l'activació de KLF2 i la producció d'òxid nítric (NO) (28). El manteniment de l'estat quiescent de l'endoteli és de vital importància per a la integritat dels sistema vascular, per tant, la seva desregulació pot donar lloc a escenaris patològics, com per exemple, el desenvolupament de malformacions vasculars al cervell degudes a deficiències en la senyalització de BMP9 o CCM1-3 (64).

4. Diferenciació i especialització de la cèl·lula endotelial

L'establiment de la identitat arterial, capil·lar i venosa de les ECs és fonamental per a la configuració de l'arbre vascular. L'especificació arterial i venosa de l'endoteli és determinada per factors genètics, tot i que les cèl·lules circumdants i les forces hemodinàmiques també poden contribuir a la decisió de la identitat cel·lular. Desxifrar la complexa interacció entre les vies genètiques i epigenètiques, així com els senyals extracel·lulars i biomecànics que orquestrin la diferenciació endotelial ha estat de vital importància per comprendre els mecanismes subjacent a nombroses patologies vasculars.

La identitat de les ECs ha estat determinada per l'expressió de determinades molècules i marcadors que acompanyen, i fins i tot contribueixen, a la seva funcionalitat i morfologia específica. Tot i que durant les últimes dècades s'han descobert nombrosos marcadors relacionats amb les diferents subpoblacions endotelials, encara trobem mancances en la comprensió de les vies de senyalització que activen aquests programes moleculars i les signatures genètiques que sorgeixen a partir d'elles. En aquest apartat veurem com es regula la diferenciació dels progenitors endotelials, així com el paper que té la perturbació d'aquests mecanismes en certes dolències.

4.1. Desenvolupament dels progenitors endotelials

Durant el període inicial de l'embriogènesi, les cèl·lules mesodèrmiques es diferencien per donar lloc a l'hemangioblast. Aquest continua la seva especificació per donar lloc a dues subpoblacions progenitores: les cèl·lules precursors hematopoètiques i les cèl·lules precursors endotelials (**Figura 1.4**). És aleshores quan les cèl·lules precursors endotelials s'associen entre si per formar illots cel·lulars (angioblasts), els quals són capaços d'organitzar-se formant els vasos primitius i l'aorta dorsal mitjançant vasculogènesi. Com a resultat, es desenvolupa el plexe capil·lar primitiu i, seguidament, una xarxa capil·lar primària. A mesura que l'embrió creix i els teixits augmenten en volum, la xarxa capil·lar primitiva s'expandeix, mitjançant angiogènesi, amb l'objectiu de satisfer la creixent demanda d'oxigen i nutrients. Amb l'expansió de l'endoteli, també augmenta el grau de diferenciació i especialització cel·lular, fins el punt en que les ECs

dels capil·lars més petits adquireixen propietats específiques del teixit que nodreixen. Per exemple, la xarxa capil·lar cerebral presenta unions endotelials característiques per tal de controlar estrictament la permeabilitat de l'endoteli a soluts i cèl·lules inflamatòries. Pel contrari, a altres òrgans, com el fetge o la medul·la òssia, els vasos sinusoidals mostren fenestracions que fan possible una permeabilitat dinàmica a cèl·lules sanguínies i proteïnes circulants.

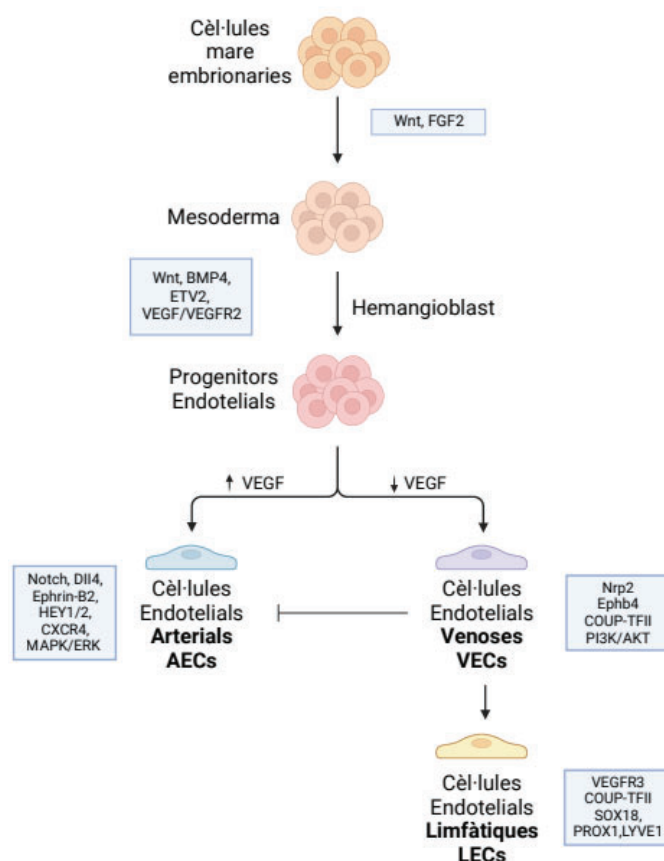


Figura 1.4. Model esquemàtic del desenvolupament vascular embrionari i la diferenciació endotelial. Les cèl·lules endotelials deriven de precursors mesodèrmics que es diferencien formant l'hemangioblast. Aquest es diferenciarà donant lloc a les cèl·lules endotelials progenitores, que continuaran la seva especificació cel·lular fins a esdevenir cèl·lules endotelials venoses, limfàtiques o arterials. Podem veure les vies de senyalització o marcadors cel·lulars més importants en cada una de les subpoblacions endotelials descrites.

4.2. L'arterialització venosa

La sang rica en oxigen provinent del cor es lliura a la resta de teixits a través de les artèries. La necessitat de construir un sistema circulatori estable que proporcioni els nutrients i l'oxigen adequats a totes les cèl·lules del cos (65) fa que l'arteriogènesi o formació de les artèries sigui un procés essencial durant l'embriogènesi dels mamífers. Tot i el creixent interès en l'estudi i comprensió de l'arteriogènesi, l'origen de les cèl·lules endotelials arterials (AECs) segueix guardant nombroses incògnites. En estudis recents,

investigadors del camp de la biologia vascular presenten proves convincentes de la conversió embrionària i generalitzada de les cèl·lules venoses a cèl·lules arterials. Per dilucidar el mecanisme subjacent de l'especificació arterial, avanços en estudis de traçament dels llinatges endotelials han demostrat que les artèries sorgeixen a partir de brots angiogènics del sinus venós, tant en etapes embrionàries, com en estats posteriors a l'organogènesi (66,67). També, les darreres tecnologies per a la seqüenciació de cèl·lules individuals (*single-cell RNA sequencing* o *scRNA-seq*), juntament amb l'anàlisi de les trajectòries d'expressió gènica de les diferents subpoblacions, han determinat que les ECs residents a venes i capil·lars experimenten una conversió molecular per convertir-se en AECs i formar les artèries (68–71).

En línia amb aquests treballs, estudis anteriors també han evidenciat que les ECs *tip*, derivades de vasos venosos, contribueixen directament a la formació de les artèries emergents. Com sabem, durant el procés angiogènic, les cèl·lules *tip* adquireixen capacitats migratòries per guiar i liderar la formació dels nous vasos cap al teixit no vascularitzat. Estudis en la dinàmica i comportament d'aquestes cèl·lules durant el desenvolupament vascular han provat que, després de competir al front angiogènic pel lideratge de la germinació vascular, les cèl·lules *tip* canvien la seva direcció migratòria i es mobilitzen a contracorrent del flux per, finalment, ocupar posicions arterials definitives (72,73). Aquest comportament depèn críticament de la funció del receptor de quimiocines CXCR4a i l'activitat de Notch. La senyalització d'ambdues vies indueix l'especificació pre-arterial de les cèl·lules *tip*, de manera que aquelles cèl·lules amb alta activitat Notch es dirigeixen a les artèries en desenvolupament, mentre que la resta continua competint en el front angiogènic (73).

4.3. Regulació transcripcional de la diferenciació arteriovenosa

Fins al anys 90 es pensava que les característiques pròpies d'artèries i venes eren controlades per les mateixes forces hemodinàmiques, com la pressió sanguínia i diferències en l'oxigenació de la sang que transporten. En canvi, aquesta idea va canviar completament amb el descobriment de l'expressió diferencial de Ephrin-B2 i el seu receptor EPHB4 a cèl·lules arterials i venoses embrionàries, inclús abans de l'inici del flux sanguini i el batec cardíac (74,75). Des deleshores, múltiples marcadors moleculars i vies de senyalització han estat identificats com a reguladors de la remodelació i diferenciació de la xarxa endotelial.

Concretament, les AECs expressen les proteïnes d'unió CX37 i CX40 (76,77), components de la via Notch, com ara Dll4 (78), així com el coreceptor de VEGF, NRP-1 (79). D'altra banda, les cèl·lules endotelials venoses (VECs) expressen específicament, o a nivells més alts, certs membres de la via de VEGF, com el coreceptor NRP-2 (79) i el receptor VEGFR3 (14,80), el factor de transcripció COUP-TFII, el qual regula negativament la via de Notch (81) i el receptor APJ (82). No obstant això, no està clar fins a quin punt alguns d'aquests marcadors arteriovenosos són essencials per a la identitat i el destí de la cèl·lula. Altres evidències també suggereixen que la regulació de la identitat endotelial podria estar estretament condicionada per l'efecte de les forces hemodinàmiques. Per exemple, s'ha demostrat que les pressions derivades del flux

sanguini indueixen l'expressió del factor de transcripció KLF2, i per tant, l'expressió dels gens que aquest controla (35). Altres estudis també han mostrat com la disminució del contingut d'oxigen en sang pot causar el detriment en marcadors arterials (83).

L'escenari vascular mostra una complexa xarxa jeràrquica amb una gran diversitat de senyals i respostes cel·lulars, el que posa de manifest la capacitat plàstica de les ECs per canviar d'un fenotip a un altre en funció de les necessitats del teixit. Els mecanismes dels que disposen per fer-ho encara no estan del tot clars, però s'han descrit alguns factors clau per a la transició entre les identitats endotelials.

4.3.1. VEGF-A i VEGFR2

Com hem descrit anteriorment, el factor de creixement VEGF-A i un dels seus receptors, VEGFR-2, són crucials per a l'angiogènesi. En aquest context, VEGF-A està estretament relacionat amb la determinació de la identitat arterial, ja que l'activació de VEGF-A/VEGFR2 augmenta l'expressió d'Ephrin-B2 a les cèl·lules mare embrionàries (84). A la vegada, VEGF-A inhibeix l'expressió de EPHB4 i estimula l'expressió de Dll4 (85). Per la seva banda, l'activació de VEGFR2 estimula l'activitat de Notch i inhibeix l'expressió de COUP-TFII (86).

4.3.2. Ephrin-B2 i EPHB4

Els receptors EPH són la família més gran de receptors de tirosina quinases (RTKs) en mamífers i s'uneixen als seus lligands transcel·lulars, les efrines. EPHB4 és un receptor especialment interessant ja que el trobem preferentment a l'endoteli venós, iniciant la seva expressió el dia E9.0 (en ratolins) (74). EPHB4 s'uneix específicament a un únic lligand, Ephrin-B2, el qual es troba preferentment a artèries i s'expressa una mica abans durant l'embriogènesi (E8.5) (74). Durant la vida adulta, la presència d'Ephrin-B2 i EPHB4 es manté segregada en artèries o venes, respectivament, pel que es considera una via de senyalització de gran pes duran la diferenciació arteriovenosa.

La senyalització Ephrin-EPH pot ser bidireccional, es a dir, la unió entre lligand i receptor pot generar senyals en les dues cèl·lules implicades. Aquesta característica promou la repulsió cel·lular, el que és crucial per la formació del sistema vascular en desenvolupament i necessari per establir el destí arterial i venós (75,86,87). Un tret característic dels receptors EPH és que son activats en grup (88) i poden donar lloc a respostes diferencials en funció de la seva densitat. L'activació en el context d'una alta densitat de receptors EPH indueix les cèl·lules a allunyar-se les unes de les altres, mentre que l'activació a una densitat més baixa, afavoreix l'adhesió cel·lular (89). D'altra banda, trobem EPHB4 localitzat a les superfícies caveolars, el que suggereix una possible funció com a sensor de forces mecàniques (90).

La senyalització d'EPHB4 dona lloc a l'autofosforilació de les tirosines intracel·lulars d'EPHB4 i al reclutament de molècules de senyalització addicionals que transmeten el senyal a la cèl·lula (86). Aquesta senyalització es tradueix en l'augment de l'expressió de molècules d'adhesió, com ara integrines, permetent així la invasió dels teixits circumdants (91). Pel contrari, Ephrin-B2, expressada per les cèl·lules arterials, indueix

l'endocitosi dels receptors de VEGF, promovent la senyalització de VEGFR2 intracel·lular a l'endoteli (87). Paral·lelament, Ephrin-B2 també té un paper important en el control de les cèl·lules murals mitjançant la modulació de la internalització i senyalització de PDGFR β a les vSMCs (92).

4.3.3. COUP-TFII

COUP-TFII (codificat per el gen NR2F2), és un membre de la superfamília *orphan nuclear receptors*. Aquest factor de transcripció es considera un regulador positiu de l'expressió de nombrosos gens mitjançant la seva unió a elements de l'ADN. COUP-TFII s'expressa àmpliament en una gran varietat de tipus cel·lulars i té un paper important en la funció i l'homeòstasi de molts teixits i òrgans. S'ha demostrat la seva participació en el control de la diferenciació de cèl·lules mare, l'angiogènesi, el metabolisme de lípids o la glucosa i el desenvolupament d'òrgans en general (93,94).

En l'àmbit de la biologia vascular, COUP-TFII va ser identificat com el primer regulador directe de la diferenciació venosa. Tot i que COUP-TFII està present tant a l'endoteli com a les cèl·lules murals, l'expressió endotelial es limita a les venes i s'exclou de les artèries, pel que es considera un robust marcador venós. Els embrions COUP-TFII *knockout* són letals a dia E12 després de la fecundació i presenten un fenotip oposat al que s'observa amb la pèrdua de l'activitat de Notch: una pèrdua parcial del destí de les cèl·lules venoses indicada per una expressió reduïda (però no totalment absent) d'*Ephb4*, juntament amb l'expressió ectòpica de marcadors arterials, com ara Dll4 i *ephrin-B2*. Per tant, la pèrdua de COUP-TFII a les ECs durant el desenvolupament embrionari produeix que les venes adquireixin característiques arterials, demostrant un paper crític en la repressió de la senyalització de Notch, necessària per al manteniment de la identitat venosa (81,95). També s'ha demostrat que la senyalització de Notch, prominent en cèl·lules arterials, suprimeix l'expressió de COUP-TFII, restringint així la seva activitat a l'endoteli venós (96). A més a més, estudis en cèl·lules privades de COUP-TFII *in vitro* han identificat alteracions en nombrosos gens implicats en la regulació del cicle cel·lular i derivats de la via de Notch. Per exemple, FOXC1 i NRP-1, dos gens regulats per la senyalització de Notch, i HEY1/2, un efector d'aquesta mateixa via, han estat definides com dianes directes de COUP-TFII (97). COUP-TFII també sembla induir la inhibició de l'expressió d'Ephrin-B2, alhora que augmenta l'expressió del receptor EPHB4 (97,98). Altres estudis també destaquen el rol de COUP-TFII en la regulació positiva de la proliferació mitjançant el factor de transcripció E2F1, un dels principals reguladors de la transició de la fase G1/S del cicle cel·lular. En aquest cas, l'expressió de COUP-TFII i la seva associació a SP-1 induiria el reclutament de co-activadors que facilitarien l'expressió de E2F1 (97).

Des del seu descobriment, trobem diversos estudis sobre els mecanismes moleculars i els factors que regulen COUP-TFII. L'expressió d'aquest factor de transcripció sembla estar controlada pel regulador transcripcional BRG1, el qual codifica per una adenosinatrifosfatasa integrada dins d'un complex de remodelació de la cromatina. BRG1 s'uneix a les regions promotores de COUP-TFII per induir la remodelació de l'ADN i induir la seva expressió (81). Altres factors de transcripció, com ETS-1 o ETV-1, també han estat relacionats amb la regulació del promotor de COUP-TFII (93,99). No obstant,

les regions promotores, així com les seqüències potenciadores o *enhancers* de COUP-TFII presenten un alt grau de complexitat a causa del gran nombre de co-activadors i co-factors que hi poden prendre part.

Tot i el clar paper pivotant de COUP-TFII, tant en la diferenciació venosa, com en la progressió de la proliferació endotelial, la regulació de l'expressió d'aquest factor de transcripció encara presenta moltes incògnites. De la mateixa manera, el ventall de dianes transcripcionals de COUP-TFII, i per tan, els efectes que aquest pot tenir sobre la biologia de la EC, també romanen poc definits.

4.3.4. CXCR4 i CXCL12

El receptor de quimiocines CXCR4 i el seu lligand CXCL12 tenen un paper important en la morfogènesi vascular. CXCR4 s'expressa preferentment en AECs, de manera que la secreció local de CXCL12 en alguns teixits determina el patró organotípic de la ramificació arterial. Estudis anteriors han mostrat com l'expressió de CXCR4, i per tant, la senyalització CXCL12/CXCR4, és necessària per a una ramificació arterial adequada als òrgans en desenvolupament (100,101). Tant la pèrdua, com la sobreexpressió de CXCR4 en ECs durant el desenvolupament embrionari condueix a la letalitat pre- o perinatal a causa de defectes greus en la formació vascular (100,102). També cal destacar la importància de la senyalització de VEGF-A i CXCR4 durant la pre-especificació arterial de les EC *tip* i la formació de les artèries (72).

4.4. Regulació transcripcional de la diferenciació limfàtica

L'origen de les LECs ha estat envoltat de certa controvèrsia durant els darrers anys. Tot i que hi ha estudis que apunten a un origen independent (103), la hipòtesis més acceptada és que les cèl·lules limfàtiques esdevenen a partir de la diferenciació de l'endoteli venós. El gran nombre de marcadors comuns entre aquestes dues poblacions i, les trajectòries genètiques que s'han descrit entre elles, donen suport a la transició entre la EC venosa i la població limfàtica (104,105).

Les ECs venoses adquireixen un destí limfàtic com a resultat de l'expressió de PROX1 (105). PROX1 és un factor de transcripció que s'expressa durant el desenvolupament embrionari a la vena cardinal i sota la regulació de SOX18, induint la migració de les cèl·lules als sacs limfàtics (106). PROX1 pot alterar la senyalització venosa per induir la identitat limfàtica mitjançant la unió a COUP-TFII. El paper diferencial de COUP-TFII en la diferenciació venosa/limfàtica ha estat atribuït a la capacitat de formar homo o heterodímers amb PROX1. Mentre la unió de COUP-TFII homodimèrica inhibeix la diferenciació arterial mitjançant la unió i el bloqueig de les regions promotores dels gens HEY1 i HEY2 (objectius transcripcionals de la senyalització de Notch), la formació heterodimèrica COUP-TFII/PROX1 no reprimeix HEY1/2 i indueix l'expressió d'un conjunt de gens limfàtics (98).

Un altre marcador limfàtic és VEGFR3, el qual s'expressa inicialment a venes (E8.5). Tanmateix, durant els dies E14.5 i 16.5 aquest limita la seva expressió als vasos limfàtics (107). Aquest procés va acompanyat de l'expressió de VEGF-C, la isoforma de VEGF

que s'uneix preferentment a VEGFR3 (108). A diferència de venes i artèries, a la membrana basal dels vasos limfàtics es formen fenestracions per tal de facilitar l'absorció de líquids, una característica que podria ser atribuïda a mecanismes desencadenats per l'activitat de VEGF-C/VEGFR3 (86,109). En paral·lel, l'endoteli limfàtic manté l'expressió de NRP-2, el qual actua com a co-receptor de VEGFR3 i regula la seva senyalització, promovent així la limfangiogènesi (109).

Finalment, destaquem també LYVE-1 com a component clau durant la diferenciació limfàtica. La seva expressió i unió a l'àcid hialurònic afavoreix la migració dels leucòcits al llarg dels vasos limfàtics (86). És evident per tant que, a més a més dels canvis estructurals, la diferenciació molecular de l'endoteli limfàtic és determinant per al correcte funcionament del sistema circulatori i immunitari.

Artèria	Capil·lars	Vena	Limfàtics
VEGFR-2		VEGFR-3	VEGFR-3, NRP2
NRP1		NRP2	LYVE-1, podoplanin
Dll4, Notch		COUP-TFII	PROX1
Efrin-B2		Ephb4	Efrin-B2, Ephb4

Figura 1.5. Representació esquemàtica de l'expressió diferencial dels marcadors endotelials.

Indiquem l'expressió característica dels vasos arterials (en vermell), els vasos venosos (en blau) i els vasos limfàtics (en verd). Mentre alguns marcadors s'expressen de manera estrictament específica en venes o artèries, d'altres estenen la seva presència a la xarxa capil·lar. Imatge adaptada de *Rocha i Adams, 2009*

4.5. El cicle cel·lular i el destí de la cèl·lula endotelial

Per entendre millor com la senyalització mitjançant Notch i COUP-TFII regula la diferenciació arteriovenosa, cal tenir en compte l'impacte d'aquestes vies en la progressió del cicle cel·lular (110). Durant l'inici del desenvolupament vascular, l'aparició del flux sanguini contribueix a l'activació de Notch, amb el consegüent augment de la conexina CX37, la qual indueix l'arrest del cicle cel·lular, permetent així l'expressió de gens per a l'especificació arterial (111). Aquest i altres estudis (112,113), mostren la necessitat de modular la proliferació per tal de permetre o restringir la decisió cap a una determinada identitat cel·lular. Un altre clar exemple d'aquest fenomen el trobem en una anàlisi genòmic comparant els llocs d'unió de COUP-TFII a l'ADN. Els gens del cicle cel·lular comprenen una gran proporció de les transcripcions regulades per *NR2F2*, indicant que aquest factor de transcripció pot regular directament la progressió del cicle cel·lular (114). L'associació entre la proliferació endotelial i l'expressió de gens característics d'identitats venoses i capil·lars recolzen la idea de que les cèl·lules que ciclen activament presenten un biaix en el procés de diferenciació, afavorint l'especificació venosa. Actualment el repte dels investigadors és identificar i definir els

mecanismes moleculars subjacents al paper de la proliferació en la diferenciació endotelial.

4.6. PI3K/MAPK com a coordinadors de la diferenciació arteriovenosa

Com hem vist, els mecanismes subjacents a l'especificació arteriovenosa han estat objecte d'una investigació intensiva durant els últims anys, i això ha portat a la identificació de diverses vies de senyalització implicades en la coordinació d'aquest procés. Estudis en el desenvolupament vascular del peix zebra han proporcionat evidències de la necessitat d'un balanç o coordinació entre dues importants vies de senyalització: fosfoinositol 3 quinasa (PI3K) i quinasa regulada extracel·lularment/proteïnes quinases activades per mitògens (ERK/MAPK). El paper antagònic de de senyalització de PI3K i ERK/MAPK ha demostrat ser determinant per l'especificació d'artèries i venes durant la formació de la xarxa vascular (115).

En embrions murins, les cèl·lules destinades a contribuir a les artèries expressen alts nivells d'ERK activat, mentre que les cèl·lules destinades a contribuir a les venes no ho fan. A més a més, ha estat provat que l'augment de la senyalització d'ERK produeix una supressió de l'activitat PI3K, facilitant l'estimulació de l'arteriogènesi i la diferenciació arterial. En canvi, la senyalització de PI3K, mitjançant l'activació d'AKT, ha resultat inhibir la senyalització de RAF1-ERK1/2 a l'endoteli, impulsant així l'especificació venosa (116–118). La inhibició de la branca de PI3K amb inhibidors específics promou l'especificació arterial. Per contra, la inhibició de la branca ERK bloqueja l'especificació arterial i la sobreactivació d'AKT promou l'especificació venosa (115). En aquesta línia, altres investigacions han mostrat com la deficiència o insuficiència del receptor TIE2, i la conseqüent inactivació de la via PI3K, condueix a la formació defectuosa de la vena durant l'embriogènesi i el desenvolupament postnatal. Tots aquests resultats recolzen per tant que TIE2 és essencial per a l'especificació venosa de la EC, en aquest cas, mitjançant l'activació d'AKT i l'estabilització de la proteïna COUP-TFII (116). Així doncs, l'equilibri i la interacció entre les vies de senyalització TIE2-PI3K-AKT i RAF-MAPK-ERK és considerat un dels factors clau en la regulació del destí arterial *versus* venós.

4.7. Implicacions clíniques de la desregulació de la diferenciació endotelial

Els avenços en la comprensió del moment de la diferenciació de cada subpoblació endotelial, així com la identificació de nous patrons d'expressió gènica i la seva relació amb el cicle cel·lular, han permès entendre la causa i els mecanismes subjacents a diverses patologies vasculars.

Mutacions al gen codificant per EPHB4 han estat diagnosticades com a causa de malformacions vasculars, incloent síndromes com la telangièctasis hemorràgica hereditària (HHT), malformacions aneurismàtiques de la vena de Galè, malformacions cutànies, malformacions arteriovenoses i anomalies limfàtiques primàries (119–124). D'altra banda, tot i ser crucial durant el desenvolupament embrionari, COUP-TFII disminueix dràsticament la seva expressió en teixits adults sans. No obstant això, s'ha observat que l'increment de l'expressió de COUP-TFII en cors adults pot induir la

disfunció mitocondrial, resultant en insuficiències cardíques (125). Altres estudis han revelat que la modulació de nivells patogènics de COUP-TFII a l'endoteli podria tenir un paper important en la susceptibilitat d'arteries i venes a desenvolupar malalties vasculars com l'aterosclerosi i la calcificació vascular, respectivament (126). La desregulació d'aquesta proteïna també ha estat relacionada amb alteracions en l'angiogènesi tumoral i el pertinent empitjorament de la prognosi del pacient oncològic (127).

Aquests, i altres exemples, posen de manifest la importància dels processos d'especialització endotelial, pel que l'incipient investigació dels mecanismes moleculars que l'orquestran poden ser de vital importància en el disseny de noves estratègies terapèutiques de malalties com l'arterioesclerosi, les malformacions vasculars o els aneurismes.

5. El metabolisme endotelial

El metabolisme de les ECs ha estat reconegut com a una força determinant durant el procés angiogènic. Vies metabòliques, com la glucòlisi, l'oxidació d'àcids grassos i el metabolisme de la glutamina tenen funcions essencials durant el desenvolupament i manteniment de vasos. És important destacar que, en teixits adults i sans, les ECs es mantenen quiescents durant anys. Pel contrari, en situacions de dany tissular, manca de nutrients o privació d'oxigen, així com en algunes condicions patològiques, les ECs són capaces de canviar ràpidament el seu fenotip per activar un estat proliferatiu i recolzar la formació de nous vasos (128,129). Aquesta capacitat plàstica de l'endoteli en vers a les demandes metabòliques de cada circumstància és de vital importància per al correcte creixement i funcionament dels òrgans, tant en condicions fisiològiques, com en resposta a certes malalties (130). Tanmateix, la transició entre un estat quiescent i un estat plenament proliferatiu comporta notables canvis en el metabolisme de la cèl·lula, ja que aquesta s'ha d'adaptar a l'increment de la demanda bioenergètica i de biomassa en un entorn hostil i hipòxic.

Nombroses evidències demostren que la pertorbació del metabolisme endotelial pot ser el responsable de la seva disfunció, i fins i tot, la causa de diverses patologies, com ara l'aterosclerosi, la diabetis, malalties oculars neovasculars o el càncer (128). En aquesta secció resumirem les principals característiques metabòliques de les ECs, així com les evidències més recents que vinculen malalties concretes amb l'alteració o la maladaptació del seu metabolisme.

5.1. Glicòlisi i respiració mitocondrial

L'endoteli, tot i ser probablement el tipus cel·lular amb major exposició a l'oxigen, depèn directament de la glicòlisi, generant el 85% de l'ATP mitjançant la conversió de la glucosa a lactat (respiració anaeròbica). Curiosament, i en contrast amb altres tipus de cel·lulars, el consum de glucosa a l'endoteli per la via glicolítica és comparable a moltes cèl·lules canceroses (131). Atès que el metabolisme oxidatiu d'una molècula de glucosa produeix

moltes més molècules d'ATP que el metabolisme glicolític anaeròbic (36 *versus* 2), és desconcertant que l'endoteli no faci ús de la seva localització privilegiada per oxidar la glucosa. La preferència per la via anaeròbica, i per tant, el reduït ús del metabolisme oxidatiu, ha estat justificat per diversos motius; 1) Podria ser un mecanisme per minimitzar la síntesis d'espècies reactives d'oxigen mitocondrial o ROS, i per tant, per protegir l'endoteli del d'any oxidatiu. 2) El fet d'evitar la utilització de l'oxigen per al seu propi metabolisme podria estar maximitzant la difusió d'aquest als teixits perivasculars. 3) A més a més, durant la germinació de l'endoteli les cèl·lules *tip* migren a microambients hipòxics, pel que no poden confiar en el metabolisme oxidatiu i es veuen forçades a utilitzar la via anaeròbica. 4) D'acord amb les necessitats del front angiogènic, la respiració anaeròbica fa possible una ràpida i localitzada producció d'ATP, el què és essencial per a la formació dinàmica dels brots de lamel·lopodis i fil·lopodis. 5) Finalment, l'entrada de metabòlits glicolítics a altres vies metabòliques laterals garanteix la producció de macromolècules biològiques necessàries per al creixement, la divisió i la migració de la EC (128,132).

A diferència d'altres tipus cel·lulars igualment dependents de la respiració anaeròbica, com ara els eritròcits o les cèl·lules mare embrionàries, les ECs mantenen cert contingut de mitocondries funcionals i actives, tot i que en menys proporció que les cèl·lules oxidatives (133). Sota concentracions fisiològiques de glucosa, només una petita part del piruvat generat en la primera fase de la glicòlisi entra al cicle de Krebs o cicle dels àcids tricarboxílics (134). No obstant això, quan la glicòlisi es troba compromesa, la EC manté la capacitat d'adoptar un metabolisme oxidatiu. D'altra banda, es pensa que les mitocondries endotelials també compleixen funcions de senyalització (mitjançant la producció d'espècies ROS i NO) i participen en la generació de biomassa (135) (**Figura 1.6 B**).

La via glicolítica és iniciada mitjançant l'entrada de glucosa a la EC a través dels transportadors de glucosa de membrana anomenats GLUTs (136). Aleshores, la glucosa és fosforilada per l'enzim hexoquinasa-2 (HK2) a glucosa-6-fosfat (G6P) (137). En situacions amb excés de glucosa, aquesta serà utilitzada per a la síntesis de glicogen, el qual servirà com a reserva d'energia i retornarà al metabolisme catabòlic en ambients amb manca de glucosa (128,138). A més a més, quan es requereix angiogènesi, molècules proangiogèniques com VEGF potencien encara més la glicòlisi impulsant l'expressió d'enzims glicolítics com la fosfofructoquinasa-2/fructosa-2,6-bisfosfatasa 3 (PFKFB3). Per aquest motiu es creu que l'endoteli angiogènic és encara més dependent de la glucosa que les ECs quiescents, fins al punt que l'endoteli activat demostra especial sensibilitat a l'absència de glucosa (131) (**Figura 1.6 A**). La inhibició farmacològica o el silenciament genètic de PFKFB3 en ECs perjudica el desenvolupament de la vasculatura *in vitro* i *in vivo* (131,139–141). Per contra, la sobreexpressió de PFKFB3 dona lloc a un augment de la glicòlisi, induint un fenotip similar al de les cèl·lules *tip*, el qual posa de manifest la importància del flux glicolític per a l'angiogènesi (138).

Els nivells de glicòlisi es redueixen a les ECs *phalanx* quiescents en resposta a la regulació transcripcional. De fet, la proteïna FOXO1 manté la quiescència endotelial suprimint c-MYC, un regulador conegut del metabolisme i el creixement anabòlic, que dona lloc a una disminució de la glicòlisi (142). Aquesta dada indica que la senyalització

entre FOXO1 i MYC és un important regulador transcripcional i un punt de control del creixement i la proliferació endotelial. A més, l'expressió de gens reguladors glicolítics com PFKFB3 i HK2, es suprimeix per l'activació de KLF2, un factor de transcripció activat per la influència de la fricció del flux sanguini laminar (143).

5.2. Branques circumdants a la glicòlisi: via de la pentosa fosfat i síntesi d'hexosamines

La glucosa o els seus productes poden ser derivats a rutes metabòliques circumdants a la glicòlisi per recolzar la síntesi de macromolècules i nicotinamida adenina dinucleòtid fosfat (NADPH). La via de la pentosa fosfat (via PPP) és una via lateral de la glicòlisi que, en dues fases, oxida l'intermediari glicolític G6P per generar NADPH i ribosa-5-fosfat (R5P). La producció de NADPH participarà directament en el manteniment de l'equilibri de les reaccions de reducció i oxidació (homeòstasi redox), i R5P serà utilitzada per a la síntesi de nucleòtids. La via PPP pren lloc al citosol i presenta dos enzims limitants. En primer lloc, la glucosa-6-fosfat deshidrogenasa (G6PD) condueix la glucosa a la primera fase de la via (oxidativa i irreversible) i genera NADPH i R5P. En segon lloc, la transcetolasa (TK) permet l'inici de la fase de la via no oxidativa i reversible, la qual genera gliceraldehid-3-fosfat i fructosa-6-fosfat (F6P) a partir de R5P (132). El NADPH és necessari per a la síntesi de lípids i nucleòtids, i és utilitzat per l'enzim glutatió reductasa per convertir el glutatió oxidat (GSSG) en glutatió reduït (GSH), controlant així l'homeòstasi redox intracel·lular i evitant el dany oxidatiu (144,145). A més, el NADPH s'utilitza per a la generació d'àcids grassos i NO, promovent l'activitat angiogènica (128) (**Figura 1.6 C**). La inhibició de qualsevol de les dues parts de la via provoca una disminució de la supervivència endotelial (138), mentre que la sobreexpressió de G6PD estimula la proliferació, la migració i la formació dels tubs endotelials com a resultat de l'augment de la producció de NO i NADPH (146).

Un pas més enllà a la via glicolítica, la F6P també es pot desviar a la via de biosíntesi d'hexosamines (HBP). L'HBP sovint és considerada una via de detecció de nutrients donat que requereix glucosa, glutamina, acetil-CoA, uridina i ATP per formar el seu producte final: UDP-N-acetilglucosamina (UDP-GlcNAc). L'UDP-GlcNAc és la segona forma de nucleòtid més abundant a l'organisme després de l'ATP, i del qual s'utilitza el grup GlnNAc per la glicosilació i modificació posttranscripcional de les proteïnes (147,148) (**Figura 1.6 D**). El paper exacte de l'HBP en la EC segueix sent poc conegut. Tot i així, s'ha demostrat que una alta concentració de glucosamina augmenta la glicosilació de les proteïnes i redueix la formació i la migració dels vasos sanguinis (149).

5.3. Oxidació d'àcids grassos

El paper del metabolisme lipídic a l'endoteli ha guanyat interès en els últims anys. Tot i que generalment ha estat acceptat que l'EC genera la major part d'ATP per glicòlisi anaeròbica, alguns estudis també suggereixen que l'oxidació d'àcids grassos (*Fatty acid oxidation*, FAO) pot esdevenir una via important de subministrament d'energia, especialment en condicions d'estrès, com per exemple, en absència de glucosa. La

utilització que la EC fa dels àcids grassos és diferent a molts altres tipus cel·lulars. En primer lloc, requereix la difusió passiva o el transport dels àcids grassos de la sang a l'espai intracel·lular per iniciar la seva oxidació (144). En transportar àcids grassos de cadena llarga als mitocondris, la carnitina palmitoltransferasa 1 (CPT1), l'enzim limitant de la FAO, facilita l'oxidació dels lípids i la conseqüent producció d'Acetil-CoA. D'aquesta manera, a més de generar ATP durant el procés, la FAO alimenta el cicle TCA, proporcionant precursors per a la síntesi de macromolècules i dNTPs, els quals són necessaris per la proliferació (150) (**Figura 1.6 I**).

5.4. Metabolisme dels aminoàcids

5.4.1. Metabolisme de la glutamina i el glutamat

A part dels carbohidrats derivats de la glucosa, el metabolisme de la glutamina, un aminoàcid no essencial, també proporciona substrats intermediaris al cicle TCA. De tots els aminoàcids, la glutamina és el més consumit a l'endoteli i resulta important per al manteniment de la proliferació i expansió vascular. Tant els vasos venosos com els arterials expressen glutaminasa (GLS), el primer enzim de la via que transforma la glutamina en glutamat i amoníac (151). En absència de glucosa, les ECs també poden oxidar la glutamina i el glutamat, així com l'alanina, a gran velocitat. A l'endoteli, el 30% dels carbohidrats que entren al TCA deriven del metabolisme de la glutamina, una proporció comparable a la contribució de la glicòlisi o la FAO (128). També és important destacar que el glutamat derivat de la hidròlisi de la glutamina pot acabar sent fusionat amb glicina i cisteïna per a la síntesi de glutatió, i per tant, contribuir a la regulació de l'homeòstasi redox (**Figura 1.6 G**). Per aquest motiu, l'esgotament de la glutamina pot suposar una certa vulnerabilitat per les ECs en front als danys induïts per ROS (151,152). Altrament, el glutamat generat pel catabolisme de la glutamina també es pot convertir en ornitina, i participar en la producció de factors proangiogènics, com el NO i les poliamines (153).

5.4.2. Metabolisme de l'arginina i el cicle de la urea

Tot i que el fetge és l'òrgan principal on té lloc la metabolització de l'arginina, i en general es creu que és l'únic teixit en que trobem el cicle complet de la urea, recentment s'ha demostrat que els intermediaris del metabolisme de l'arginina i de la urea també tenen un paper important a l'endoteli.

A les ECs, l'arginina competeix principalment com a substrat de dos enzims; l'arginasa i l'òxid nítric sintasa endotelial ((e)NOS). Per una part, la hidròlisi de l'arginina per arginases produeix urea i ornitina, compostos que es poden utilitzar posteriorment per a la síntesi de poliamines, glutamat o prolina. D'altra banda, (e)NOS competeix directament amb les arginases per la captació d'arginina i la seva conversió en citrull·lina, un procés que genera NO (el qual actua com a vasoconstrictor) (154). Tenint aquestes vies en ment, és fàcil entendre que l'augment dels nivells d'arginasa durant la inflamació vascular condueix a l'esgotament de l'arginina, donant lloc a una disminució de la producció de NO i la conseqüent vasodilatació (155).

Mitjançant el cicle de la urea, la EC té la capacitat de re-sintetitzar l'arginina a partir de la citrulina per l'acció consecutiva dels enzims argininosuccinat sintasa (ASS) i argininosuccinat liasa (ASL) (144,156). Aquest mecanisme és important per al manteniment dels nivells d'arginina en paral·lel a la producció continua de NO (156). La rellevància d'aquesta estratègia per al reciclatge de l'arginina s'ha fet especialment evident en estudis que demostren que la reducció de la producció de NO endotelial i el conseqüent augment de la pressió arterial en ratolins i humans està relacionada amb deficiències de l'enzim ASL (157) (**Figura 1.6 H**).

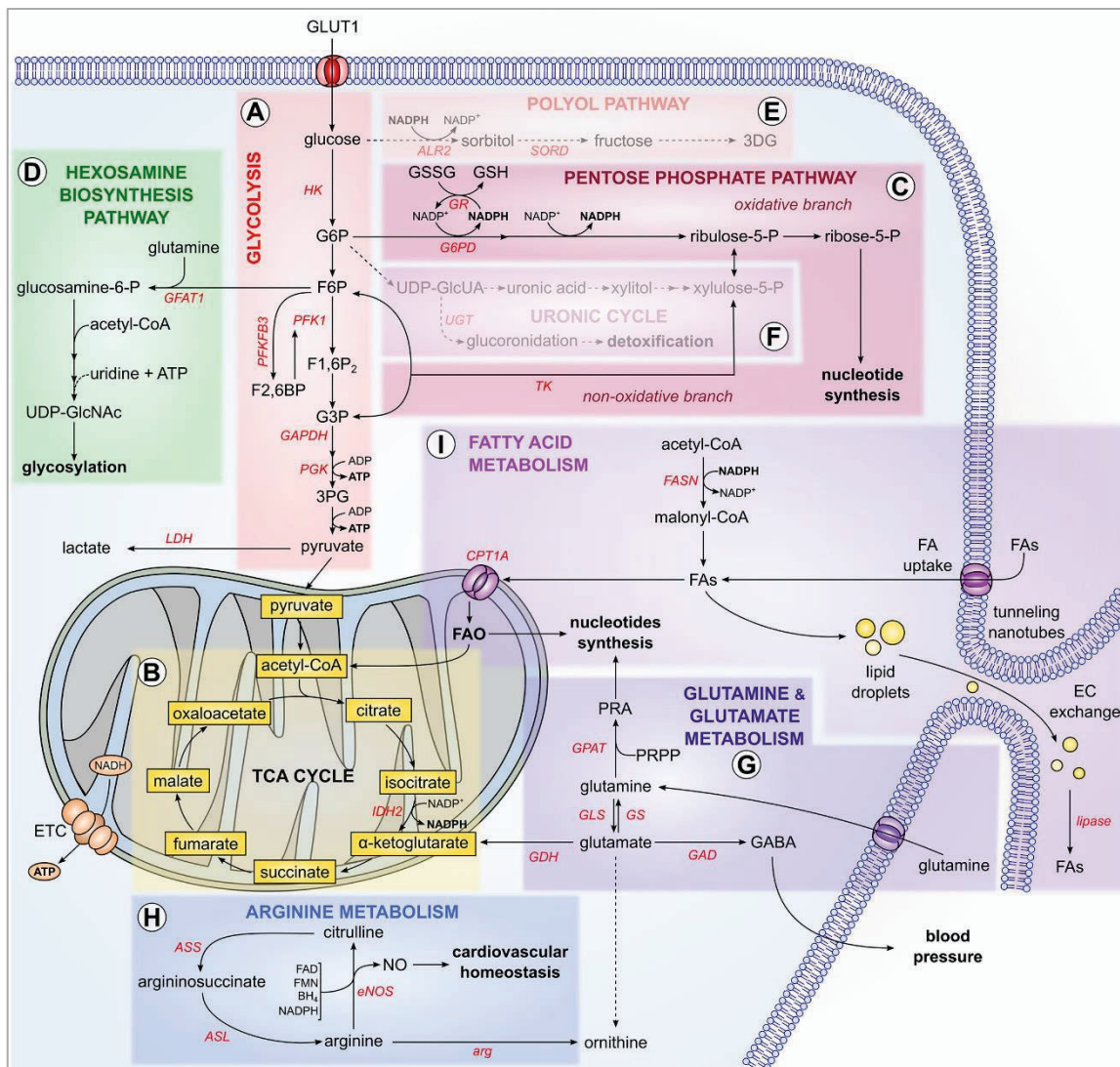


Figura 1.6. Representació general de les principals vies metabòliques a les cèl·lules endotelials. Esquema simplificat de les vies metabòliques més importants per a la fisiologia endotelial i els seus enzims principals. **A**, glicòlisi. **B**, cicle TCA. **C**, via de les pentose fosfat (PPP). **D**, via de la biosíntesi de l'hexosamines (HBP). **E**, via del poliòl. **F**, cicle de l'àcid urònic. **G**, metabolisme de la glutamina i el glutamat. **H**, metabolisme de l'arginina. **I**, metabolisme dels àcids grassos. Les vies amb menor activitat en ECs sanes estan representades amb major opacitat. Imatge obtinguda de *Eelen et al. 2018*.

5.6. Pertorbacions del metabolisme endotelial en malalties vasculars

En conjunt, hem vist que les ECs presenten nombrosos trets característiques en la regulació i ús del seu metabolisme. Cal destacar també la notable capacitat de percebre i adaptar-se a les condicions nutricionals de cada microambient i a les necessitats de vascularització o estabilització del teixit on es troben. Aquesta plasticitat està estretament regulada per factors transcripcionals i epigenètics, però en certes ocasions, la seva desregulació pot donar lloc a escenaris patològics. Ha estat demostrat que els canvis en el metabolisme de les ECs condueixen a la disfunció cel·lular i estan relacionats amb la patogènesi de diverses malalties com ara l'aterosclerosi, la diabetis, la hipertensió pulmonar o el càncer, entre d'altres (128).

A partir d'aquestes troballes, el metabolisme endotelial s'ha convertint en un prometedori objectiu terapèutic. El fet de que l'endoteli presenti unes característiques metabòliques úniques suggereix que podria deixar al descobert certes vulnerabilitats que podrien ser considerades atractives dianes terapèutiques. No obstant això, la relació entre el metabolisme i la disfunció vascular encara amaga nombroses incògnites.

Un clar exemple és la diabetis, una malaltia on la disfunció de l'EC apareix precoçment i té un paper clau en la patogènesi de les micro- i macro-vasculopaties associades (158). La hiperglucèmia a la que es veuen exposades les ECs condueix a l'acumulació de ROS a causa del deteriorament del flux de PPP mediat per G6PD (159). Aquest fet provoca la saturació de la glicòlisi i l'acumulació dels intermediaris de la via, els quals seran forçosament derivats a branques laterals de manera patològica (provocant estrès oxidatiu i altres productes nocius per a la cèl·lula) (144).

Un altre exemple el trobem en la neovascularització dels tumors, on els vasos presenten anormalitats i es caracteritzen principalment per la hiperproliferació endotelial. La transició entre l'estat quiescent i l'estat proliferatiu i migratori de la EC durant l'angiogènesi tumoral està estretament relacionada amb la reprogramació metabòlica. Les ECs involucrades en el tumor mostren una major dependència de la glicòlisi que l'endoteli de teixits sans. Aquest canvi es manifesta com un augment dels nivells d'expressió de gens associats a la glicòlisi, com el transportador de glucosa GLUT1 i l'activador glicolític PFKFB3 (128,160). En aquest context, també trobem un augment en la via PPP i d'altres rutes metabòliques que donen suport al catabolisme i a la descontrolada divisió cel·lular (129). Estudis recents han revelat que el metabolisme de la EC pot activar l'angiogènesi independentment de la senyalització extracel·lular i, per tant, la seva inhibició podria ser un objectiu prometedori per al tractament anti-angiogènic en tumors. Un exemple que il·lustra aquesta hipòtesis el proporciona un estudi on, tant la depleció genètica com la inhibició farmacològica de PFKFB3 resulta en la disminució de la hiperglucèmia, la normalització vascular i la reducció de la extravasació de cèl·lules tumorals al flux sanguini i, per tant, la reducció de la incidència metastàtica (160).

El bloqueig d'altres enzims metabòlics també han estat proposats com oportunitats terapèutiques. De fet, diversos estudis preclínics mostren que la inhibició farmacològica o la inactivació dels gens que codifiquen per enzims metabòlics específicament a l'endoteli, limiten l'angiogènesi en malalties oncològiques, isquèmiques o inflamatòries

(150,152,161,162). La majoria d'aquests enzims (per exemple, PHGDH) (162) només participen en l'activació de la EC quan aquesta es troba en un estat d'expansió anormal en el teixit adult. En canvi, aquests mateixos enzims es consideren totalment dispensables en situacions de salut tissular. Aquesta característica fa d'aquestes proteïnes dianes especialment atractives, que probablement no causin toxicitats sistèmiques, a l'hora que restableixen la funcionalitat vascular.

6. Models animals per a l'estudi de l'angiogènesi

Tal i com s'ha descrit al llarg d'aquesta introducció, l'angiogènesi és un procés que s'inicia durant el desenvolupament embrionari, però que també té un paper molt important durant la vida postnatal de l'individu. A causa de la dificultat de recapitular fidelment un context biològicament rellevant en cultiu cel·lular, la investigació de l'angiogènesi s'ha basat en diverses modalitats d'assajos *in vivo*. Alguns dels mètodes més comuns per estudiar l'angiogènesi fisiològica i patològica són l'assaig en membrana corioal·lantoide de pollastre (163), els empelts d'esferoides endotelials (164) o l'assaig de cicatrització de ferides cutànies (165). També han estat extensament utilitzats models embrionaris de peix zebra o ratolí, models de tumors sòlids o la retina postnatal de ratolí (166).

Malgrat les seves diferències anatòmiques, els vertebrats comparteixen programes de desenvolupament similars als que donen lloc al sistema cardiovascular humà. Així doncs, el ratolí ha estat utilitzat com a model clau per a la comprensió de la biologia vascular. En aquest context, la retina postnatal de ratolí ha esdevingut una eina essencial per a l'estudi de l'angiogènesi. A més, la retina és un sistema excel·lent per a determinats models d'angiogènesi patològica, ja que també és compatible amb diverses estratègies genètiques i farmacològiques.

6.1. La retina postnatal de ratolí com a model angiogènic

En contrast amb els humans, els ratolins (i altres rosegadors) acabats de néixer presenten una vasculatura immadura a la retina, constituïda inicialment per vasos primitius o hialoides. En aquest òrgan, l'arquitectura vascular inicia la seva formació a nivell postnatal, una característica que l'ha convertit en un model ideal per al monitoratge i anàlisis dels diferents esdeveniments angiogènics.

Després del naixement, els vasos hialoides retrocedeixen progressivament i en paral·lel a la formació de la nova xarxa vascular. El sistema vascular de la retina comença a desenvolupar-se a partir del brot angiogènic situat al voltant del disc òptic, formant un plexe vascular primitiu que es remodelarà ràpidament en estructures vasculars més i més complexes. Durant la primera setmana postnatal, els vasos de la retina continuen estenent-se radialment sobre una capa superficial, formant una estructura vascular bidimensional. Seguidament, al voltant del dia postnatal 7 (P7), els vasos comencen a brotar en capes més profundes, per finalment, esdevenir en la formació de 3 capes

vasculars diferenciades. El plexe més profund, situat a la capa més externa, es forma ràpidament i arriba a la perifèria de la retina aproximadament el dia P12, seguit del plexe intermedi, el qual es forma entre els dies P12 i P15. Al final de la tercera setmana postnatal (aproximadament P21), les tres capes vasculars són totalment madures (**Figura 1.7 A**). Cal dir però, que tot i que els diferents estrats vasculars estan interconnectats per branques perpendiculars, els dos nivells vasculars més profunds no es remodelen més enllà dels simples plexes capil·lars. Pel contrari, la capa superficial estableix una arquitectura jeràrquica formada per artèries, venes i capil·lars (167,168) (**Figura 1.7 B**). D'altra banda, al sistema vascular de la retina, els astròcits i les cèl·lules murals estan estretament associats amb les ECs i intervenen activament en el desenvolupament dels vasos. Els astròcits seran els encarregats de migrar des del nervi òptic fins a la perifèria del mateix, amb l'objectiu de guiar l'angiogènesi inicial mitjançant la secreció de VEGF al teixit hipòxic. Durant la formació dels nous vasos, les cèl·lules murals migraran per seguir l'estela del front angiogènic i acabar recobrint la majoria de l'endoteli. L'acció ordenada i seqüencial del conjunt de tipus cel·lulars que prenen part en aquests procés, així com la correcta comunicació i senyalització molecular entre ells, serà vital per al correcte desenvolupament de la vasculatura (169).

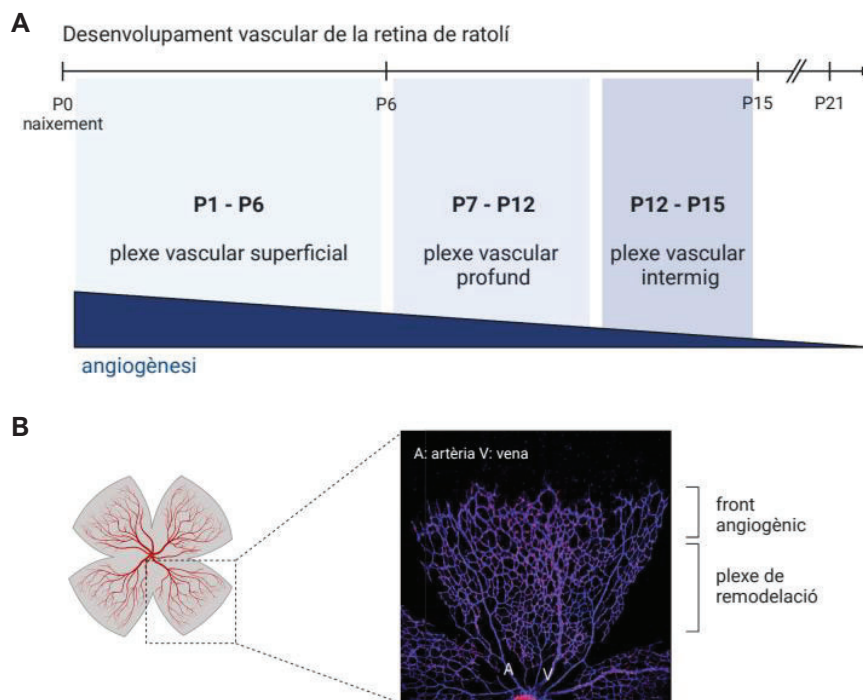


Figura 1.7. Formació de la xarxa vascular durant el desenvolupament de la retina del postnatal ratolí. A. Esquema temporal del desenvolupament seqüencial de la xarxa vascular en tres capes diferenciades a la retina del ratolí. **B.** Imatge representativa de la detecció per immunofluorescència (IB4) del plexe vascular superficial de la retina P6, on s'indica l'artèria (A), la vena (V), el front angiogènic i el plexe de remodelació vascular. Les artèries es defineixen per mostrar bifurcacions, desenvolupar-se com a vasos de menor diàmetre compresos entre zones lliures de capil·lars. Les venes es caracteritzen per no mostrar bifurcacions, presentar majors diàmetres, no presentar zones de *pruning* o retrocés dels capil·lars i la presència de brots angiogènics als seus extrems.

Tenint en compte totes aquestes característiques, el plexe vascular superficial de la retina proporciona un model únic per l'anàlisi dels esdeveniments cel·lulars i moleculars implicats en la construcció de l'arquitectura i diferenciació vascular. A més a més, donada la seva estructura en un sol pla, aquesta xarxa vascular es pot processar i visualitzar fàcilment amb microscòpia d'alta resolució. En ella podem diferenciar dues zones: el front angiogènic, a la zona més perifèrica, on trobem els brots de cèl·lules *tip* i *stalk* en expansió; i el plexe de remodelació, a la part més propera al nervi òptic, on podem identificar estructures vasculars més madures i diferenciades (artèries i venes connectades per àrees capil·lars) (**Figura 1.7**). Aquest escenari ens permet estudiar en una sola retina processos tant diversos com la proliferació endotelial, la germinació, el reclutament de cèl·lules perivasculares, la remodelació o la maduració dels vasos, etc. (166).

En resum, el sistema vascular de la retina proporciona un model útil per analitzar els mecanismes moleculars i cel·lulars que regulen l'angiogènesi perquè; 1) les xarxes vasculars jeràrquiques es formen de nou a partir del naixement de l'animal, 2) els components cel·lulars implicats en l'angiogènesi estan ben caracteritzats i 3) tots els processos mostren un patró ben establert i permeten el seu seguiment i manipulació. Aquests trets fan de la retina un sistema *in vivo* simple, però a la vegada robust i ràpid.

6.2. Manipulació genètica de l'angiogènesi a la retina postnatal

Com que el desenvolupament vascular postnatal a la retina té lloc de manera regulada i organitzada, permet la fàcil detecció de qualsevol anomalia. A més a més, la caracterització dels processos angiogènics en ratolins s'ha vist realment afavorida per els avanços en el desenvolupament d'estratègies genètiques de pèrdua o guany de funció. La fàcil administració de fàrmacs als cadells de ratolí i la possibilitat de induir certes modificacions genètiques en un tipus cel·lular i moment concret, situen a la retina com a eina prototípica per a l'avaluació vascular.

L'escissió global dels gens que afecten al desenvolupament cardiovascular sovint condueix a la letalitat embrionària. Per tant, l'aparició de noves tecnologies per induir modificacions en seqüències genètiques específiques ha donat la possibilitat d'expressar mutacions en moments concrets del desenvolupament postnatal. Les estratègies més conegudes són Cre-loxP, Flp-FRT o ϕ C31-att, on el primer mot dona nom a la recombinasa, seguit de l'identificador de la seqüència sobre la que actua. Fins ara, el sistema Cre-loxP ha demostrat la millor recombinació genètica *in vivo* (166). Aquesta, implica la inserció de dos llocs loxP al voltant de la regió d'ADN que volem modificar. Aleshores, la recombinasa Cre reconeix específicament les dues seqüències loxP i extirpa el segment d'ADN que flanquegen. Mitjançant aquesta estratègia és possible eliminar un al·lel (*knock-out*, KO), generar un al·lel no funcional (*knock-down*, KD) o donar lloc a l'expressió de la versió mutant d'un al·lel (*knock-in*, KI).

El moment de la recombinació pot ser controlat gràcies a l'ús de versions Cre induïbles per tamoxifè (CreER^{T2}). L'administració de tamoxifè o, en animals recent nascuts, el seu metabòlit actiu 4-OH-tamoxifè (4-OHT), ens permet escollir el moment precís de la

inducció de l'activitat transitòria de Cre. D'altra banda, el tipus cel·lular en el que s'expressi la recombinasa, i per tant, tingui lloc la modificació genètica, dependrà del promotor que controli l'expressió de Cre. Afortunadament, i gràcies al descobriment de marcadors característics de cada una de les subpoblacions endotelials, el camp disposa d'una important varietat de línies Cre-endotelials (170) (**Taula 1.1**).

Línia Cre	Gen	Expressió endotelial	Expressió no endotelial	Inici de l'activitat	ID MGI	Ref.
Tek-Cre	<i>Tek (Tie2)</i>	Pan-endotelial	vàlvules cardíaques, cèl·lules del cor	E7.5	MGI:2450311; MGI:2136412; MGI:2445474; MGI:3608912; MGI:2683222; MGI:3837451; MGI:2450312	(171–176)
Tek-CreER^{T2}						
Kdr-Cre	<i>Kdr (Flk1 o VEGFR2)</i>	Pan-endotelial	vàlvules cardíaques, cèl·lules musculars i cardíaques	E8.5–9.5	MGI:3038968; MGI:2655253	(177, 178)
Kdr-CreER^{T2}						
Cdh5-Cre	<i>Cdh5 (Ve-Cadherin)</i>	Pan-endotelial	cèl·lules del cor	E7.5–9.5	MGI:3620560; MGI:3842516; MGI:3836418; MGI:3700149; MGI:5705396; MGI:3848982	(179–183)
Cdh5-CreER^{T2}						
Pdgfb-CreER^{T2}	<i>Pdgfb</i>	Pan-endotelial	ceratinòcits i megacariòcits	E9.5	MGI:3793852	(184)
Sox17-CreA	<i>Sox17</i>	AECs	Tim, melsa, pàncrees i fetge	E8.5	MGI:3852645	(185)
Bmx-CreER^{T2}	<i>Bmx</i>	AECs	-	E10.5	MGI:5513853	(186)
Esm1-CreER^{T2}	<i>Esm1</i>	ECs tip	-	P4	-	(187)
Apln-CreER^{T2}	<i>Apln</i>	ECs en germinació	-	E10.5	MGI:5637737	(188)
Aplnr-CreER^{T2}	<i>Aplnr (Apj)</i>	Cèl·lules del sinus venós i derivades, ECs coronaries, VECs, ECs capil·lars	-	E10.5	MGI:5637737	(189)

Taula 1.1. Resum de les línies Cre endotelials més utilitzades per a l'estudi de l'angiogènesi i la biologia vascular. La taula inclou el moment d'inici de l'activitat recombinasa Cre i les subpoblacions on aquesta ha estat reportada. Per obtenir més informació sobre l'origen, l'activitat de la recombinasa, la disponibilitat del ratolí i una llista completa d'articles que fan referència a cada al·lel, s'indiquen els IDs MGI (es pot consultar a www.informatics.jax.org) i la referència de les publicacions originals de cada línia. Taula adaptada de Payne et al. 2018.

6.3. Estratègies genètiques per a la visualització i seguiment de la cèl·lula recombinant

La principal limitació del model de retina és que els vasos s'analitzen mitjançant imatges instantànies del desenvolupament vascular, pel que és difícil apreciar la dinàmica de determinats processos. A més, és complicat tenir constància de l'activitat recombinasa o localitzar les cèl·lules que han estat genèticament manipulades. La informació espacial sobre l'activitat de la recombinasa Cre es pot obtenir mitjançant l'ús de ratolins reporters. En aquests, s'insereix un gen reporter (per exemple, GFP, RFP o lacZ) en un locus expressat de manera ubíqua, però precedit per una seqüència de terminació transcripcional flanquejada per seqüències loxP. D'aquesta manera, el gen reporter només es transcriurà en presència d'activitat Cre, el que farà possible la detecció de les proteïnes reporter, per exemple, per immunofluorescència. Aquesta estratègia és àmpliament utilitzada per determinar quines cèl·lules han recombinat i quin és el seu comportament, distribució o expansió al llarg del procés angiogènic. Tanmateix, tot i que els ratolins reporters proporcionen una informació espacial excel·lent, la seva sensibilitat està limitada per la naturalesa de la proteïna reportera i la seva vida mitjana. Sovint, quan combinem un gen reporter amb un altre constructe dependent de Cre, també és difícil determinar fins a quin punt la recombinació d'ambdós és equivalent (el dos gens dependents de Cre recombinen en una mateixa cèl·lula). Aquest fet dependrà de l'eficiència de recombinació de cada un dels constructes i la seva sensibilitat a l'activitat Cre. Per abordar aquestes i altres limitacions, durant els darrers anys s'han desenvolupat nous i sofisticats models genètics, alguns dels quals, podrem veure al llarg d'aquesta tesi.

7. La via de senyalització de PI3K

La via fosfoinositol 3 quinasa (PI3K) regula una gran varietat de respostes cel·lulars primàries, incloent la proliferació, la migració, el metabolisme i el trànsit vesicular, i per tant, constitueix un dels principals punts de control de la fisiologia cel·lular. No és d'estranyar doncs, que la desregulació d'aquesta via sigui la responsable de moltes patologies, com ara el càncer, síndromes de sobrecreixement, trastorns immunològics i neurològics o la diabetis, entre molts d'altres.

7.1. La família PI3K

Les PI3K són una família d'enzims amb activitat quinasa, molt conservades evolutivament, i encarregades de captar i transmetre senyals extracel·lulars per traduir-los en accions intracel·lulars. Ho fan mitjançant la fosforilació del grup hidroxil de l'anell d'inositol en posició 3' de diverses espècies de substrats lipídics de fosfatidilinositol (PtdIns o PI). Un cop activades per estímuls extracel·lulars, les diferents PI3Ks generen PtdIns3P (PI3P), PtdIns(3, 4)P₂ (PIP₂) o PtdIns(3,4,5)P₃ (PIP₃) a partir dels seus substrats lipídics; PtdIns (PI), PtdIns(4)P (PIP) i PtdIns(4,5)P₂ (PIP₂), respectivament.

Aquests productes resulten ser uns potents missatgers lipídics que transdueixen la senyal interaccionant amb múltiples proteïnes efectores mitjançant els dominis d'unió a lípids, entre els que podem trobar el domini d'homologia de Pleckstrin (PK), el domini d'homologia Phox (PX) i el domini FYVE. Aquesta unió aleshores produeix canvis en la localització i/o activitat de les proteïnes efectores, que tindran una repercussió en la senyalització i la fisiologia de la cèl·lula (190). Totes les subunitats catalítiques PI3K tenen una estructura comú, conformada per un domini C2, un domini helicoidal i un domini catalític. En canvi, la família PI3K comprèn vuit isoformes que es divideixen en tres classes en funció de la seva estructura molecular i la preferència pels substrats que fosforilen (**Figura 1.8**).

La classe I està formada per quatre isoformes (PI3K α , PI3K β , PI3K γ i PI3K δ , també referides com p110 α , p110 β , p110 γ i p110 δ), les quals estan involucrades en la regulació de la supervivència, la proliferació, la migració i la diferenciació cel·lular. Donat el paper central d'aquesta classe PI3K en aquesta tesi, els trets característics de les seves isoformes, així com les implicacions fisiològiques que aquestes comporten, seran extensament descrites a la secció següent (7.1.1).

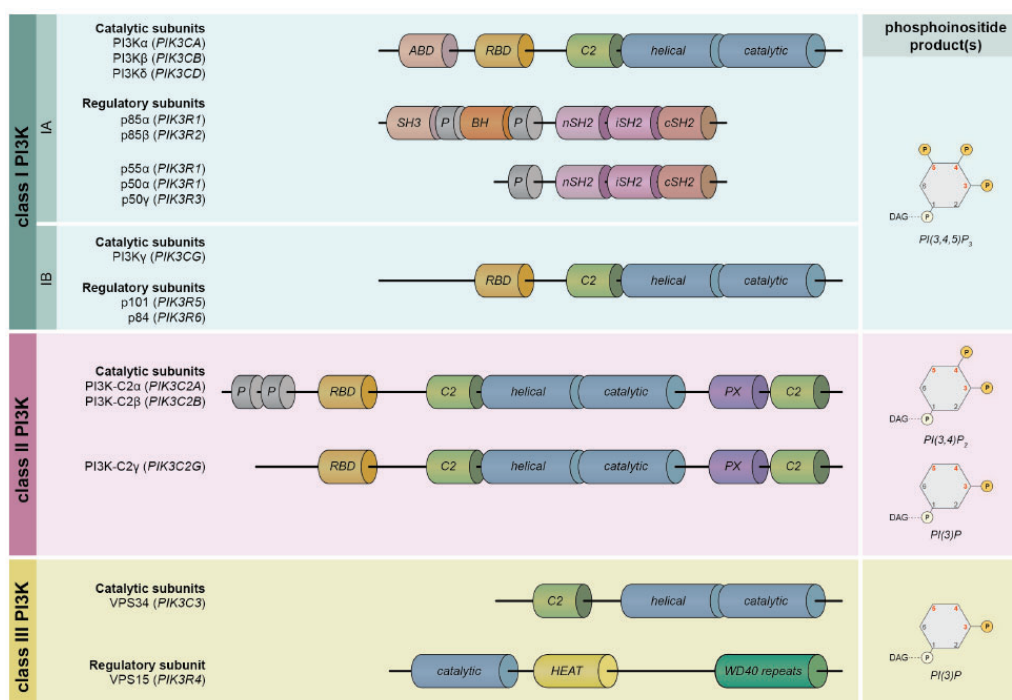


Figura 1.8. Classificació esquemàtica de les diferents subunitats enzimàtiques PI3K. Característiques estructurals de les subclasses I, II i III de la família PI3K, indicant els dominis presents en cada una de les isoformes, així com les subunitats reguladores i els productes lipídics corresponents a cada classe. Imatge obtinguda de Kobińska, P. 2019.

La classe II utilitza PIs com a substrat i consta de tres isoformes (PI3K-C2 α , PI3K-C2 β i PI3K-C2 γ), les quals han estat relacionades amb la formació de vesícules endocítiques. En aquest cas, els enzims actuen com a monòmers, donant lloc a dos possibles productes lipídics; PIP₂ i PIP₃. Mentre PI3K-C2 α i PI3K-C2 β s'expressen arreu de

l'organisme, l'expressió de PI3K-C2γ es limita al fetge, la pròstata i als teixits mamaris. L'estructura d'aquesta classe de quinases presenta dominis addicionals que suggereixen la seva interacció amb vesícules recobertes de clatrina. A diferència de les PI3K de classe I, aquestes isoformes de classe II no actuen com a transductors de senyal. La seva funció es centra en la regulació del trànsit vesicular i la dinàmica de la membrana, tot i que alguns estudis indiquen que la seva activitat catalítica també pot influir indirectament en la senyalització cel·lular (190,191).

Per últim, la classe III està formada per una sola isoforma, PI3K-VPS34. La seva unió a la proteïna adaptadora VPS15 regula la seva localització intracel·lular i la seva activitat quinasa. VPS34 només dona lloc a PI3P i ha demostrat estar implicada en la regulació de la fagocitosis i l'autofàgia. Cal destacar que VPS35 és l'única de les isoformes PI3K present en totes les cèl·lules eucariotes (190,191).

Tot i l'extensa investigació en el marc bàsic de la senyalització PI3K, la contribució de les diverses isoformes segueix guardant molts secrets i queda molt per aprendre sobre la seva reacció a diversos senyals extracel·lulars, així com sobre les conseqüències moleculars de la seva activació en diverses circumstàncies.

7.2. PI3K de classe I

Fins a l'actualitat, les isoformes pertanyents a la classe I han estat les PI3K millor caracteritzades. Totes elles prenen com a substrat PtdIns(4,5)P (PIP2) i produeixen PtdIns(3,4,5)P3 (PIP3), actuant com a complexos heterodimèrics composts per quatre subunitats i controlades per proteïnes reguladores. D'acord amb la vinculació específica a la subunitat reguladora, les PI3K de classe I es divideixen en dues subclasses: La classe IA, que inclou tres isoformes, PI3Kα, PI3Kβ, PI3Kδ (codificades pels gens PIK3CA, PIK3CB, PIK3CD, respectivament), les quals s'uneixen a una de les cinc subunitats reguladores p85 (p85α, p55α, p50α, p85β o p55γ). La classe IB, en canvi, només està composta per una isoforma catalítica, PI3Kγ (codificada per PIK3CG), que s'acobla a la subunitat reguladora p84 o p101(190,192) (**Figura 1.8**). Les proteïnes PI3Kα i PI3Kβ s'expressen de manera ubíqua, mentre que l'expressió de PI3Kδ i PI3Kγ és troba enriquida a les cèl·lules immunitàries.

D'altra banda, cal destacar que aquestes quinases presenten requisits i comportaments específics del tipus cel·lular i el context, i que tot i que han estat caracteritzades principalment per la seva activitat catalítica, algunes evidències també suggereixen un paper important com a suport estructural independent a l'activitat quinasa (almenys en el cas de PI3Kα, PI3Kβ) (193).

La regulació de l'activitat de PI3K, i la conseqüent producció de PIP3, està impulsada per la interacció entre dos fenòmens: els senyals que sorgeixen dels estímuls activadors o *inputs*, i la interpretació d'aquests senyals pels components catalítics i reguladors de PI3K (*outputs*). L'activació de la via s'inicia mitjançant la senyalització extracel·lular i la captació d'aquesta per receptors tirosina quinasa (RTKs), receptors acoblats a proteïnes G (GPCRs), integrines o petites proteïnes GTPases (com per exemple Ras). La diversitat en la capacitat de diverses isoformes PI3K per detectar les entrades de senyalització és

clau per als seus variats i crucials papers fisiològics. L'activació d'aquests receptors atrau aleshores els heterodímers PI3K a la membrana plasmàtica a través de la seva subunitat reguladora, i és en aquesta localització cel·lular on es produeix la conversió enzimàtica de PIP2 a PIP3 (190). Tot i que totes les PI3K de classe I produeixen el mateix lípid, difereixen en els seus patrons d'expressió, modes d'activació i senyalització cel·lular.

Com hem mencionat anteriorment, cada isoforma catalítica forma un dímer amb una subunitat reguladora que modula l'activitat i la localització subcel·lular del complex. Les PI3K de classe IA les trobem sempre acompanyades de les subunitats reguladores p85, que exerceixen almenys tres funcions relatives a les isoformes catalítiques p110: prevenir la seva degradació mitjançant l'estabilització de la proteïna, mantenir la funció catalítica inactivada en estats basals i permetre el reclutament dels heterodímers a les proximitats dels RTKs i a les proteïnes adaptadores a través dels seus dominis SH2. A més, cal tenir en compte que les subunitats p85 també poden ser fosforilades o ubiquitinitzades, unes modificacions que poden tenir un gran impacte en la seva regulació, i per tant, en el seu rol sobre la via PI3K (194).

Després de l'acció enzimàtica de PI3K, el missatger lipídic PIP3 facilita el reclutament i l'activació de les principals proteïnes efectores, les serina/treonina quinases PDK1 i AKT, les quals seran les encarregades de continuar amb la cascada de senyalització i la corresponent modificació en els patrons de transcripció i expressió genètica de la cèl·lula. D'altra banda, la producció de PIP3 és regulada i contrarestada per les fosfatases lipídiques PTEN i SHIP, les quals juguen un paper inhibidor de la via mitjançant la catalització enzimàtica per la desfosforilació de PIP3 a PIP2 (PI(4,5)P2 o PI(3,4)P2 d'acord amb la fosfatasa que hi participi) (190,195) (**Figura 1.9**).

Atesa la participació generalitzada de les PI3K en un gran nombre de mecanismes fisiològics, la seva desregulació també ha estat implicada en el desenvolupament d'un gran nombre de malalties. Per aquesta raó, la comprensió dels detalls moleculars de la seva activació, les subunitats o mecanismes reguladors, la seva influència en l'activació de PI3K i la conseqüent senyalització de la via, pot obrir noves perspectives per a possibles teràpies dirigides.

7.2.1. AKT

Un dels efectors més importants de la via de PI3K és la serina/treonina quinasa AKT, també coneguda com PKB. Donada la seva rellevància biològica, la seqüència genètica codificant per AKT s'ha mantingut altament conservada al llarg de la evolució. La família AKT està conformada per tres isoformes; AKT1 (PKB α), AKT2 (PKB β) i AKT3 (PKB γ), totes elles portadores d'un domini d'unió a fosfolípids PH al seu extrem N-terminal i un domini regulador a l'extrem C-terminal (196). La interacció entre PIP3 i la forma inactiva d'AKT resulta en la translocació d'aquest últim a la membrana plasmàtica, que fa possible la seva fosforilació mediada per PDK1 (a la treonina 308). Tanmateix, per activar completament AKT es necessita una segona fosforilació, en aquesta cas mediada de l'acció de mTORC2 (a la serina 473). La vida útil de l'AKT actiu i totalment fosforilat a la membrana plasmàtica és relativament curta, pel que un cop activat, AKT es pot traslladar

al citoplasma i al nucli, on és l'encarregat de fosforilar un gran repertori de proteïnes i perpetuar així la cascada de senyalització de PI3K (196).

S'han descrit més d'un centenar de compostos substrat d'AKT i les investigacions dels últims anys han mostrat una gran varietat d'efectors de la senyalització d'aquesta quinasa. AKT és capaç de fosforilar directament proteïnes dianes de nombroses classes funcionals, incloses proteïnes i quinases lipídiques, factors de transcripció, reguladors de petites proteïnes G i tràfic de vesícules, enzims metabòlics, lligases d'ubiquitina E3 o reguladors del cycle cel·lular, entre molts altres. Ho fa mitjançant la fosforilació de residus serina/treonina per activar o, més sovint, inhibir la funció de la proteïna en qüestió. Les isoformes d'AKT tenen funcions específiques del tipus cel·lular i el teixit, però en un sentit ampli, l'activació d'AKT pot promoure la supervivència cel·lular, la proliferació, el creixement i canvis en les vies metabòliques cel·lulars (196).

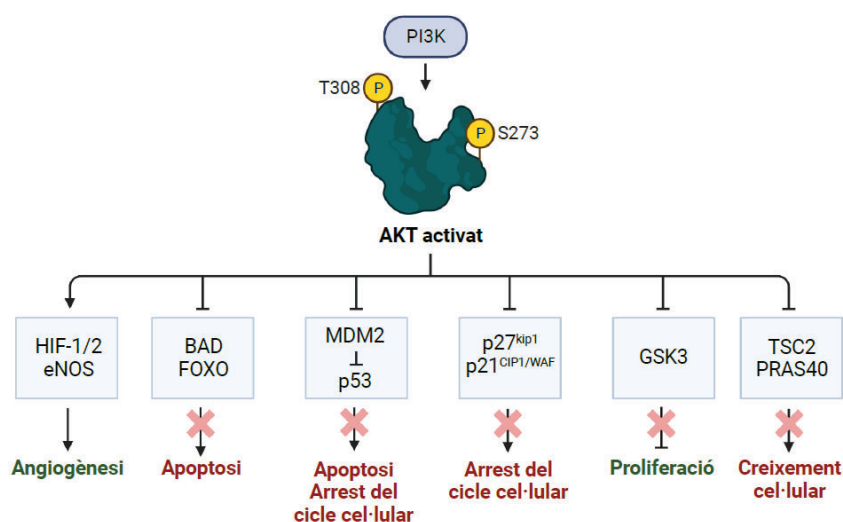


Figura 1.9. Representació esquemàtica de l'activació d'AKT i l'efecte fisiològic d'alguns dels seus efectors. S'indiquen en vermell aquells processos fisiològics que resulten inhibits en resposta a l'activitat d'AKT, i en verd, aquells processos afavorits per aquesta mateixa quinasa.

AKT indueix senyals de supervivència cel·lular mitjançant la inhibició de proteïnes pro-apoptòtiques. La fosforilació mediada per AKT de BAD o FOXO promou la inhibició de l'apoptosi (197,198). També, MDM2, un altre substrat d'AKT, ha demostrat ser un regulador negatiu de p53, el qual és considerat un supressor de tumors degut al seu paper en l'arrest del cycle cel·lular i l'apoptosi (199,200). L'activació d'AKT també pot induir la proliferació de la cèl·lula, mitjançant la fosforilació de diferents substrats directament implicats en la regulació del cycle cel·lular. La fosforilació de p27^{kip1} o p21^{CIP1/WAF} implica el seu segrest citosòlic i per tant, la prevenció de l'aturada del cycle cel·lular (201,202). L'acció d'AKT sobre GSK3, un inhibidor de les ciclines del cycle cel·lular, provoca la seva inhibició, i per tant, el bloqueig de la seva funció anti-proliferativa (203). TSC2 i PRAS40, els quals són inactivats mitjançant la fosforilació mediada per AKT, indueixen l'estimulació de mTORC1 i el corresponent creixement cel·lular (204,205). L'AKT també potencia el metabolisme de la glucosa a partir de la

fosforilació de HK2, que facilita la seva associació a canals aniónics dependents del voltatge a la membrana mitocondrial (206). La via PI3K i l'AKT activat regulen altres aspectes del metabolisme cel·lular mitjançant l'activació de mTORC1. Aquest promou l'activació de S6K1/2 i la inhibició de 4EBP1, el que impulsa processos anabòlics, inclosa la síntesi de proteïnes i nucleòtids, així com l'activació transcripcional de gens que codifiquen enzims de la glicòlisi i la via PPP. Tant PI3K/AKT com mTORC1 promouen la síntesi de lípids mitjançant l'activació dels factors de transcripció SREBP1 i SREBP2 (207). En definitiva, aquests són només alguns exemples de com la fosforilació d'AKT i la seva activitat quinasa sobre una gran diversitat de proteïnes efectores dona lloc a importants repercussions en la fisiologia cel·lular (**Figura 1.9**).

7.2.2. PTEN

Donada la gran importància de la via, la intensitat de l'activació de PI3K està regulada per diferents mecanismes. El principal regulador negatiu de PI3K és la fosfatasa PTEN (*phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10*). Es tracta d'una proteïna fosfatasa lipídica dual que, a diferència de la majoria de les proteïnes tirosina fosfataes, desfosforila preferentment els substrats de fosfoinositol. Un cop situat a la membrana, PTEN hidrolitza el fosfat en posició 3' de PIP3, amortint així l'activitat de PI3K (208).

El substrat de PTEN, PIP3, es troba al interior de la membrana plasmàtica i, com a tal, la seva accessibilitat és un dels principals factors reguladors de l'activitat de PTEN. El control de PTEN recau en gran part en la interacció i localització del mateix a la membrana. Tant la orientació exacta de PTEN, com el grau de penetració a l'interior de la membrana seran factors claus per les propietats cinètiques i enzimàtiques de la fosfatasa. Altres mecanismes reguladors de PTEN també estan associats a la seva estabilització citosòlica mitjançant la fosforilació de diversos residus que eviten la seva degradació, juntament amb modificacions posttransduccionals estretament relacionades amb la conformació proteica de PTEN (209).

PTEN està implicat en la regulació de molts processos cel·lulars, dels quals una gran part s'atribueixen a la seva coneguda activitat com a fosfatasa lipídica. Un cop reclutat a la membrana plasmàtica, PTEN regula negativament la via de senyalització PI3K-AKT, inhibint així tots els processos cel·lulars dependents d'AKT descrits anteriorment. Altrament, PTEN també ha demostrat diverses activitats independents de PI3K/AKT. Aquesta proteïna supressora de tumors s'expressa quan hi ha senyalitzacions de dany cel·lular, bloquejant la supervivència de la cèl·lula mitjançant p53. Per una banda, l'activitat fosfatasa de PTEN permet la conversió de PIP3 a PIP2, inhibint el procés d'activació d'AKT i la conseqüent inactivació de p53 (via AKT/MDM2). En paral·lel, PTEN també s'uneix a p53, afavorint la seva estabilitat i impeding l'activitat inhibidora de MDM2. La preservació de p53 per tant, comporta la inhibició de la proliferació cel·lular i promou els processos de reparació genètica o apoptosi. D'aquesta manera, PTEN actua com a protector de la integritat genòmica i cromosòmica de la cèl·lula (210). Altres estudis també han demostrat que l'expressió de PTEN indueix una disminució considerable de la proliferació a causa de l'aturada del cicle cel·lular en la fase G1, atribuïda a un augment de p27^{Kip1} i la disminució del nivell i localització nuclear de la ciclina D1. Recentment,

també s'ha proposat un paper estructural de PTEN en el manteniment de la polaritat apical-basal en cèl·lules epitelials a partir de la formació d'agregats de PIP2 i les proteïnes d'unió a PIP2 a la membrana apical. S'especula amb la possibilitat que la pèrdua d'aquesta funció contribueixi a la transició epitelial-mesenquimàtica observada en la progressió dels càncers epitelials (210).

7.2.3. Mutacions patogèniques de la via PI3K de classe I

Des del seu descobriment, el paper de PI3K ha destacat pel gran nombre de mutacions associades a diversos membres de la via, directament relacionades amb el desenvolupament de malalties malignes. Degut al seu paper com a regulador central del metabolisme i dels senyals de supervivència i creixement cel·lular, no és d'estranyar que modificacions en la cascada de PI3K condueixin a una gran varietat de desordres patològics.

S'han identificat nombroses mutacions que activen PIK3CA en tumors humans. Les mutacions més comuns són H1047R i E542K/E545K. En concret, la mutació H1047R potencia la interacció del domini quinasa amb les membranes i passa per alt el requisit d'associació amb co-activadors de la via (211). En canvi, les mutacions E542K i E545K provoquen la sobreactivació de PI3K a causa de la modificació de la capacitat d'unió amb els dominis SH2 de les subunitats reguladores (212). També s'han descrit altres mutacions al gen PIK3CA, totes elles menys comuns, com per exemple, N345K o C420R (213), que pertorben la interfície del domini C2 amb SH2. D'altra banda, les mutacions en PIK3CA descrites en càncer, també poden aparèixer de forma mosaica durant el desenvolupament embrionari, donant lloc a síndromes de sobrecreixement, malformacions vasculars (venoses, capil·lars o limfàtiques) o malformacions cerebrals associades a greus repercussions neurològiques. En canvi, les mutacions a les altres subunitats catalítiques p110 β , p110 γ i p110 δ són molt poc freqüents. (195). Cal dir però que s'han descrit mutacions anàlogues en la isoforma de PIK3CD, en aquest cas, donant lloc al trastorn d'immunodeficiència anomenat síndrome de PI3K-Delta activada (APDS) o altres immunodeficiències associades a la sobreactivació de p110 δ , la forma PI3K dominant en limfòcits.

Les funcions associades a PTEN el converteixen en un gen supressor de tumors clau per a l'homeòstasi cel·lular. En conseqüència, PTEN és un dels gens més freqüentment mutats en càncers humans. La pèrdua o la inactivació de PTEN per mutacions somàtiques és molt comú a diversos tipus de càncer (incloent tumors cerebrals, tumors endometrials, càncer de mama o càncer de pròstata). Per exemple, PTEN es troba mutat habitualment en el seu domini fosfatasa en casos de glioblastoma (214). Dites mutacions perjudiquen la localització de la fosfatasa a la membrana i donen lloc a defectes en l'activitat supressora de PI3K. En el cas de PTEN, també s'han diagnosticat mutacions en la línia germinal d'alguns pacients, les quals són responsables de síndromes familiars complexos, com és el cas de *PTEN hamartoma tumor syndrome* (PHTS). Es tracta d'un trastorn hereditari caracteritzat per la formació d'un gran nombre de tumors benignes, anomenats hamartomes, i un elevat risc de desenvolupar càncer al llarg de la vida.

Aquesta síndrome també està relacionat amb l'aparició de malformacions vasculars en una notable proporció dels pacients (215).

Pel contrari, les mutacions en els gens d'AKT implicades en malalties oncogèniques són molt poc freqüents. S'han descrit mutacions activadores d'AKT en un petit percentatge de càncers de mama, carcinomes de cèl·lules escamoses de cap i coll, càncer d'endometri, càncer de pulmó i càncers renals. La mutació detectada a AKT amb més incidència és una mutació puntual al domini PH d'AKT1 (E17K) que confereix una major activitat a causa de la localització constitutiva d'AKT1 a la membrana plasmàtica. Tanmateix, l'amplificació del gen AKT es produeix en proporcions més elevades i s'ha descrit en càncers gàstrics, de mama, d'ovari, de pàncrees, de còlon, d'esòfag i de tiroides, mostrant amplifícacions més freqüents de la isoforma AKT2 (216).

PI3K ha estat una via molt atractiva per a la teràpia contra el càncer. No obstant això, els inhibidors de PI3K només han mostrat una lleugera eficàcia en tumors sòlids com a teràpia única i han comportat efectes secundaris i toxicitats. A més a més, el tractament amb aquests fàrmacs s'ha enfrontant al desenvolupament de resistències (intrínseques o adquirides al llarg del tractament), ja que en bloquejar la via, un efecte compensatori d'altres rutes de senyalització permet la supervivència, proliferació i disseminació de cèl·lules canceroses. Avui en dia, diversos inhibidors de PI3K estan sota investigació clínica, inclosos els inhibidors pan-PI3K (dirigits a les quatre isoformes de les PI3K de classe I) i inhibidors selectius d'isoformes concretes (217).

8. La senyalització de PI3K a la cèl·lula endotelial

Durant les últimes dècades, la investigació en models animals ha revelat funcions clau dels membres de la família PI3K i els seus efectors durant la formació i el manteniment dels vasos del sistema circulatori. A més, modificacions en la senyalització PI3K han estat associades a un creixement vascular aberrant, incloent la sobreactivació angiogènica durant l'aparició de tumors o l'origen de diferents malformacions vasculars. En conjunt, aquestes evidències posen de manifest la importància de la via, i en especial, el rol determinant de les fluctuacions de la senyalització PI3K en la biologia de la EC (218).

8.1. PI3K de classe I a l'endoteli

Entre les PI3K de classe I, PI3K α és la isoforma més important per al comportament de les ECs durant el creixement dels vasos. Tant la inactivació constitutiva de PI3K α , com la seva inhibició catalítica específica a l'endoteli de ratolí, dona lloc a defectes vasculars greus, letals durant el desenvolupament embrionari (219,220), un fenotip que no es produeix en inactivar altres PI3K de classe I. p110 α sembla controlar la migració de la EC a partir de la regulació positiva de l'activitat RhoA-GTPasa (219). De la mateixa manera, la sobreactivació sostinguda de PI3K α a les ECs comporta greus defectes durant la remodelació endotelial i és incompatible amb la vida (221). Aquest i altres estudis han demostrat l'important paper de PI3K α en la regulació dels reordenaments

vasculars i la remodelació de les unions cel·lulars durant la formació sistema circulatori (222). A més a més, durant les últimes dècades, s'ha posat de manifest el rol de PI3K α en la regulació de la identitat venosa i la repressió de l'arteriogènesi durant la diferenciació vascular (116–118).

Tot i l'indiscutible protagonisme de p110 α , altres isoformes de la classe I també han demostrat participar en el control de la biologia endotelial. Aquest és el cas de PI3K β , que en un context d'isquèmia cardíaca, sembla exercir una inhibició de la via de PI3K α (223). També de manera circumstancial, certs senyals inflamatoris indueixen l'increment de l'expressió de p110 δ a l'endoteli, regulant així algunes funcions cel·lulars (218). A més a més, estudis recents han demostrat que la senyalització de PI3K β , tot i ser poc significativa per les ECs, és un punt de control important de la proliferació i maduració dels PCs. La inactivació d'aquesta isoforma específicament a PCs resulta en una prompta maduració cel·lular i el conseqüent augment de la quiescència endotelial (224).

Respecte als mecanismes reguladors de PI3K en l'endoteli, alguns estudis han demostrat que l'ablació genètica endotelial de quatre de les subunitats reguladores de les PI3K de classe I (p85 α , p55 α , p50 α i p85 β) causa hemorràgies agudes durant la formació embrionària resultant en la mort prematura de l'animal. Curiosament, aquest fenotip és rescatat amb el manteniment d'una sola copia de p85 α , el que indica possibles mecanismes de compensació entre les diferents subunitats reguladores (225). Com hem vist anteriorment, PTEN és un important regulador de la via PI3K. En la mateixa línia que els resultats anteriors, la deleció genètica de PTEN a l'endoteli també dona lloc a hemorràgies i disfuncions cardíques letals durant la embriogènesis, degudes a una proliferació descontrolada de la EC i a deficiències en els mecanismes de remodelació vascular (226). Estudis mecanístics han descrit a PTEN com un modulador de la proliferació endotelial durant certs moments decisius del procés angiogènic. Més concretament, PTEN seria el responsable d'aturar el cicle cel·lular i facilitar la especificació de la cèl·lula *stalk* mediada per la senyalització de Notch (20).

8.2. Activació de la via PI3K a l'endoteli (*inputs*)

A l'endoteli, les PI3K responen a diversos senyals ambientals. Multitud de receptors de la superfície cel·lular de les ECs participen a la senyalització de PI3K (incloent VEGFR1-3, TIE-1/2, EGFR1-2, PDGFR β i ERBB1-4, entre d'altres), mitjançant la seva activació per factors de creixement, citocines o altres senyals biomecànics (VEGFA, VEGFC, ANG1/ANG2, VE-Cadherin, Dll4 o les efrines en són alguns exemples). Gràcies a l'activació d'aquestes sistemes, PI3K regula la proliferació i la supervivència de les ECs, així com la germinació angiogènica, el creixement, la maduració o la permeabilitat dels vasos.

Els factors de creixement endotelial vascular (VEGF) són activadors clau de la senyalització endotelial de PI3K. Com hem mencionat anteriorment, la família VEGF es compon dels lligands VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C i VEGF-D, que activen la senyalització mitjançant la unió específica als receptors VEGFR1/FLT1, VEGFR2/FLK1 i VEGFR3/FLT4 (**Figura 1.2**). Estudis inicials van determinar que la via PI3K és activada per l'estimulació

de VEGFR2 i VEGFR3, però no a partir de l'activació de VEGFR1. A més a més, VEGFR2 i VEGFR3 semblen utilitzar diferents rutes moleculars per activar la senyalització PI3K/AKT. Un cop activat per VEGF-A, VEGFR2 activa la família de quinases SRC, i gràcies a l'acció d'aquestes, el complex p110 α -p85 és reclutat a la membrana plasmàtica, on inicia l'activació de la via (**Figura 1.10**). VEGFR2 també requereix la formació de complexos mitjançant la unió a co-receptors transmembrana, incloent VEGFR3, Ve-Cadherin, NRP1 i integrines, que cooperen per induir l'activació de PI3K (227). L'activació VEGFR2-PI3K també pot estar negativament regulada. Un clar exemple n'és la S1P, un mediador lipídic que s'oposa a l'eix de senyalització VEGF-A/VEGFR2/PI3K a partir de la seva unió al receptor S1PR1 durant l'angiogènesi germinativa (227,228).

En canvi, el mecanisme per el qual VEGFR3 activa la senyalització de PI3K no està del tot clar. Aquest receptor, estimulat per VEGF-C, reacciona amb la subunitat reguladora p85, però probablement ho fa de manera indirecte, mitjançant una molècula adaptadora. S'ha provat que RAS podria estar implicat en aquest tipus de senyalització, ja que les cèl·lules limfàtiques de ratolins portadors de mutacions al domini d'unió de p110 α amb RAS, no són capaces d'activar AKT després de l'estimulació amb VEGF-C (227,229).

A banda de la senyalització per VEGF, un altre sistema essencial tant per l'activació de PI3K, com per el procés angiogènic, és l'angiopoietina i els seus receptors TIE. L'activació de ANG/TIE té un paper important en la morfogènesi i la maduració vascular i consta de tres lligands, ANG1, ANG2 i ANG3, i dos receptors, TIE1 i TIE2 (també anomenats receptors TEK). ANG1, la qual és expressada principalment per cèl·lules perivasculars, és un activador de TIE2 (expressat específicament a les ECs) i és necessari per a la supervivència de l'EC i l'estabilització dels vasos. La interacció entre ANG1 i TIE2 induïx el reclutament dels complexos p10 α -p85 gràcies a la interacció entre TIE2 i la subunitat p85 (52,230) (**Figura 1.10**). En canvi, ANG2, que és produït i emmagatzemat per les ECs, actua com antagonista d'ANG1 i, per tant, afavoreix la desestabilització dels vasos i pot interferir en la seva formació. Tanmateix, alguns treballs suggereixen que ANG2 pot exercir com a factor pro-angiogènic en algunes circumstàncies. De fet, ANG2 a l'endoteli juga un paper dual, on pot actuar com a estímul, però també com a efector de la via PI3K. En altres paraules, aquesta angiopoietina pot induir la senyalització PI3K/AKT mitjançant l'estimulació de TIE2. En paral·lel, l'activitat PI3K també es tradueix en una disminució de l'expressió de ANG2 mitjançant la inhibició de FOXO1, un conegut activador transcripcional d'ANG2. Així doncs, ANG2 sembla actuar com un regulador autocrí de la via TIE2/PI3K/AKT (227,231).

8.3. Efectors de la via PI3K a l'endoteli (*outputs*)

L'activació de les PI3K de classe I per estímuls extracel·lulars dona lloc a la formació de PIP3 a la membrana plasmàtica. Aquest lípid és l'encarregat de traduir la senyal en instruccions moleculars mitjançant la unió a una sèrie de proteïnes efectores i la regulació de la seva localització i/o activitat. A la EC trobem diverses proteïnes clau en la transducció de la senyal. Entre elles, la quinasa AKT constitueix l'efector per excel·lència de la via PI3K, un paper associat a l'extens nombre d'objectius moleculars

que se li atribueixen, entre els quals s'inclouen nodes de senyalització tant importants com eNOS, mTORC1, PFKFB2, TSC2, p21, GSK3 o els factors de transcripció FOXO (**Figura 1.10**).

S'ha demostrat que l'activació sostinguda d'AKT1 a l'endoteli induïx la formació de vasos sanguinis estructuralment anormals, comparables a les aberracions dels vasos tumorals (232). D'altra banda, models de ratolí AKT *knock-out* han mostrat que només l'absència de AKT1 a l'endoteli, però no AKT2, compromet la biologia de la EC. Tot i que el ratolí amb deficiència en AKT1 mostra un creixement retardat, manté un sistema vascular viable i compatible amb la vida (233).

Una de funcions endotelials regulada directament per l'acció d'AKT és la producció d'NO mitjançant l'oxidació de L-arginina dependent de NADPH. AKT activat és un regulador de l'activitat de l'enzim eNOS, el qual és responsable de la metabolització de NO. A la EC el NO és necessari per la vasodilatació dels conductes i, per tant, l'augment del cabal del flux sanguini, així com un estimulant de la remodelació i l'angiogènesi. Per tant, en absència sostinguda de la senyalització de PI3K, la falta de NO pot comportar disfuncions endotelials (234). A la vegada, l'activació d'AKT també induïx la producció dels factors induïbles per hipòxia HIF1 i HIF2, tant a la EC com a altres tipus cel·lulars. La presència dels factors HIF induïx l'expressió i secreció de VEGF, i la consegüent activació de l'angiogènesi (235). En aquest escenari, podem entendre que l'ablació genètica d'AKT causi el deteriorament del desenvolupament vascular durant l'angiogènesi postnatal a la retina o en altres situacions on la formació dels vasos és depenent de VEGF (233).

mTOR representa un altre centre de senyalització clau en el que convergeixen una gran quantitat de senyals diferents, tant extracel·lulars com intracel·lulars. mTOR pot ser activat a partir de l'eix PI3K/AKT i actuar en dos complexos multiproteics diferents, anomenats mTORC1 i mTORC2. La inhibició farmacològica del complex mTORC1 amb rapamicina provoca una disminució de la proliferació i la capacitat de migració de les ECs, així com una major susceptibilitat a l'apoptosi. Aquest fenotip és el resultat de la reducció de la fosforilació i activació d'AKT, així com la consegüent inhibició de FOXO1 i FOXO3a (236). D'altra banda, estudis recents *in vitro* van suggerir a mTORC2 com a regulador de la polimerització d'actina i la formació d'adhesions focals i, per tant, responsable de la migració de les ECs (237).

La fosforilació mediada per AKT dels factors de transcripció FOXO inhibeix la seva activitat. La senyalització de PI3K induïx l'exclusió nuclear de FOXO i el seu segrest al citoplasma, on es troba destinat a la degradació (238). Aquests factors de transcripció són considerats reguladors crítics durant la formació dels vasos. De fet, s'ha demostrat que l'activitat de FOXO1 restringeix la proliferació endotelial dificultant la glucòlisi i la fosforilació oxidativa mitjançant MYC (239). Els ratolins amb deficiència endotelial de *Foxo1* moren durant el desenvolupament embrionari com a resultat de defectes en la formació vascular (238). Així doncs, aquests resultats indiquen que FOXO1 actua com a un guardià molecular de l'activació endotelial.

En conjunt, aquests estudis posen de manifest la rellevància de la regulació de la via de PI3K α i emfatitzen en la necessitat de seguir investigant en els processos involucrats per entendre la complexa xarxa de senyalització que, en bona part, governa l'endoteli.

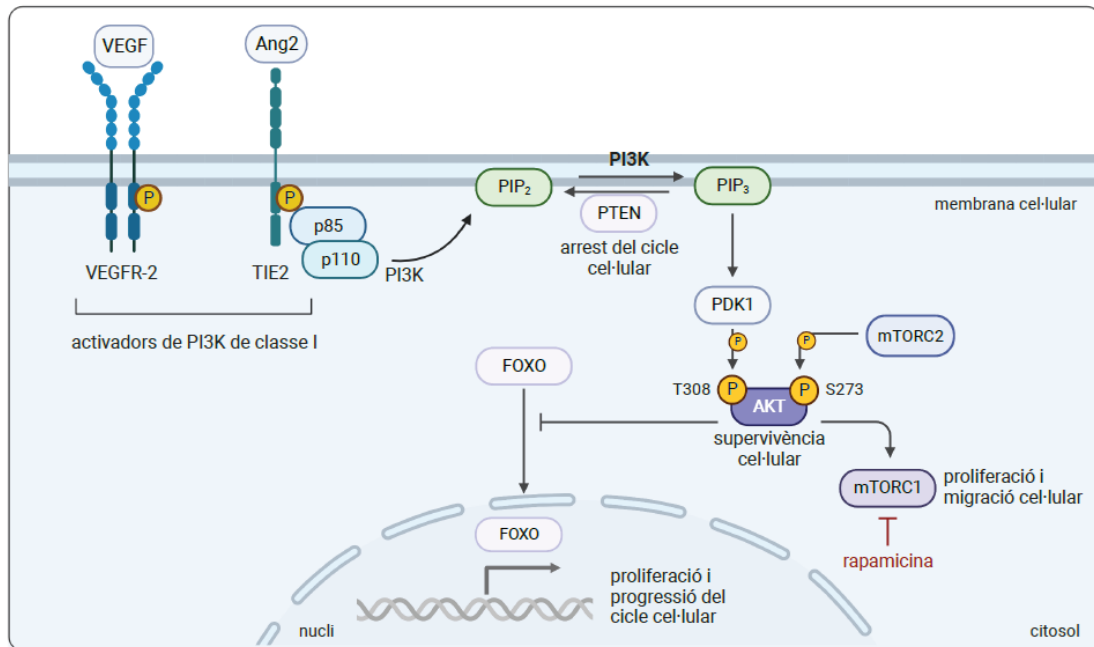


Figura 1.10. Senyalització de PI3K a l'endoteli. L'activació dels receptors VEGFR2 i TEK mitjançant l'estimulació amb VEGF i ANG2, respectivament, atrau a p110 α a la membrana plasmàtica a través de la seva subunitat reguladora p85. És aleshores quan es produeix la conversió enzimàtica de PIP2 a PIP3. Aquest lípid tradueix la senyal a la cèl·lula mitjançant l'activació de diverses proteïnes quinases, com AKT (fosforilat per PDK1 i mTORC2). AKT és capaç de regular l'acció d'un ampli ventall d'efectors, entre els que a l'endoteli destaquen mTORC1 i els factors de transcripció FOXO.

9. Anomalies vasculars

Com hem vist, el sistema vascular nodreix a tots i cada un dels teixits de l'organisme. No és estrany per tant que, defectes estructurals o funcionals en els vasos sanguinis tinguin un gran impacte en una àmplia varietat de patologies. Per exemple, el manteniment o creixement inadequat de la xarxa vascular causa episodis d'isquèmia en malalties com l'infart de miocardi, l'ictus o desordres neurodegeneratius o associats a l'obesitat. Pel contrari, un creixement excessiu de la vasculatura o la remodelació aberrant d'aquesta, promou i té un paper clau en diferents dolències, com ara el càncer (en tumors sòlids), desordres pro-inflamatoris, malalties oculars o anomalies vasculars (28,47,240). En aquesta secció en centrarem en la descripció de les característiques principals de les anomalies vasculars, referides com un ampli grup de patologies associades a la formació aberrant dels vasos.

9.1. Classificació i caracterització de les anomalies vasculars

Les anomalies vasculars comprenen un ampli espectre de lesions que van des de simples marques de naixement fins a grans tumors. La majoria d'elles es presenten de manera congènita o apareixen durant la infància. A més a més, el seu tractament i les complicacions associades sovint requereixen un equip multidisciplinari d'especialistes. A causa de la complexitat i heterogeneïtat d'aquestes lesions, així com de la confusió al voltant de la seva classificació, les anomalies vasculars són freqüentment mal diagnosticades i manquen d'opcions terapèutiques adients a les característiques de cada cas. Així doncs, aquestes dolències representen un repte tant per al seu diagnòstic com per a la elecció del tractament terapèutic més apropiat. La identificació d'aquestes lesions és difícil a causa de la immensa variabilitat fenotípica, ja que les convencions per la seva denominació i classificació han estat històricament inconsistents. En la última dècada, i gràcies als darrers descobriments científics, el camp de les anomalies vasculars ha fet un esforç per posar en comú tot aquest coneixement i determinar una metodologia clara i consistent per al seu diagnòstic i classificació.

D'acord amb la classificació més recent (publicada al 2018) de la *International Society for the Study of Vascular Anomalies* (ISSVA), les anomalies vasculars es classifiquen en dos subclasses: tumors vasculars i malformacions vasculars. La distinció entre els dos grups es basa en l'avaluació histopatològica de l'augment de proliferació cel·lular. La classificació ISSVA es fonamenta en les característiques clíniques, radiològiques i/o histopatològiques de cada tipus de lesió (241). D'altra banda, donat els grans avenços en el descobriment de les causes genètiques associades a aquestes patologies, també han sorgit noves classificacions basades en les mutacions genètiques responsables, una alternativa objectiva que podria obrir les portes a teràpies moleculars més precises i personalitzades.

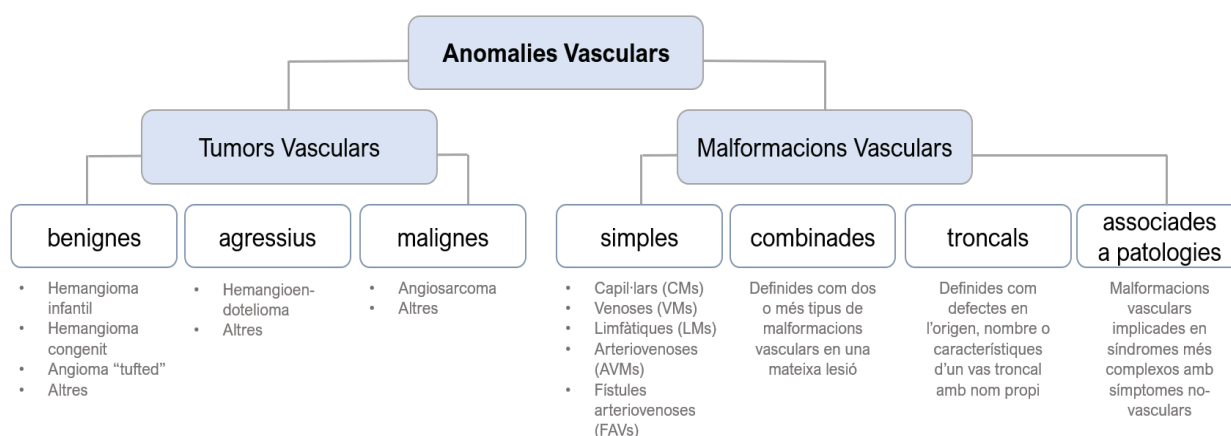


Figura 1.11. Classificació de les anomalies vasculars segons les directrius ISSVA 2018. Les anomalies vasculars consisteixen en tumors vasculars proliferatius i malformacions vasculars no proliferatives, que es poden subclassificar en funció del potencial maligne (tumors) o dels canals vasculars implicats (malformacions).

9.1.1. Tumors vasculars

Els tumors vasculars es caracteritzen per una hiperproliferació de les ECs. Les lesions solen créixer ràpidament i la majoria no estan presents al néixer. Es poden classificar com a benignes (per exemple, hemangioma infantil o hemangioma congènit), localment agressius (per exemple, hemangioendotelioma kaposiforme (KHE)) o malignes (per exemple, angiosarcoma), segons el comportament cel·lular (241) (**Figura 1.11**).

L'hemangioma infantil és el tipus de tumor vascular benigne més comú, present en aproximadament el 5-10% de la població. Aquests poden aparèixer en qualsevol part del cos, però mostren certa freqüència a la pell, especialment del cap i el coll, del tronc i de les extremitats. La majoria de lesions apareixen setmanes o mesos després del naixement, però també hi ha entre un 30 i un 50% dels casos derivats d'una lesió precursora congènita. En general, aquest tipus de lesions es manifesten com a taques de color vermell amb forma lobulada, recobertes per un epiteli prim i delicat. En ocasions, amb el pas del temps els hemangiomes evolucionen en formes més profundes, ocupant la dermis i el teixit subcutani, i tornant-se de color més blavós a causa de l'augment del grossor de l'epiteli. Aquestes anomalies les podem trobar localitzades o segmentades, i presents en solitari, o bé, en forma de múltiples lesions. Els hemangiomes infantils han demostrat desenvolupar-se en una fase inicial proliferativa de creixement ràpid, la qual és seguida d'una fase d'involució, en que les lesions retrocedeixen gradualment sense necessitat d'intervenció. Les ECs involucrades són positives per GLUT1 (un transportador de glucosa), un tret immunohistoquímic que ha estat utilitzat per distingir aquest tipus de patologia d'altres casos d'anomalies vasculars (242,243).

Les formes més agressives de tumors vasculars es caracteritzen per la seva major capacitat d'infiltració als teixits perivasculars, com el múscul o el teixit adipós. En últim lloc, els tumors vasculars malignes, entre els que trobem els angiosarcomes, tenen una baixa incidència i els trobem amb més freqüència a teixits tous subcutanis. La majoria dels casos són esporàdics, però la seva aparició també ha estat vinculada amb tractaments previs de radiació o amb casos de limfedema crònic. L'aspecte clínic dels angiosarcomes és extremadament variable, pel que el tractament suposa un repte que cal considerar de forma personalitzada (242).

9.1.2. Malformacions vasculars

Les malformacions vasculars es defineixen com la formació anormal dels vasos en una part de la xarxa vascular, sense mostrar canvis en l'estat proliferatiu de la EC. A diferència dels hemangiomes, les malformacions vasculars no retrocedeixen amb el pas del temps, sinó que creixen proporcionalment amb l'individu. Aquestes són considerades de naturalesa congènita, tot i que en ocasions poden passar desapercebudes al néixer i fer-se notables més tard. Poden aparèixer en qualsevol teixit del cos, però cal destacar una major incidència a pell, teixits tous, espais articulars o vísceres (242). Segons l'ISSVA, les malformacions vasculars es classifiquen en quatre grups: simples, combinades, associades a un gran vas o malformacions associades a altres afeccions o síndromes (**Figura 1.11**).

La majoria de les malformacions vasculars simples involucren un sol tipus de vas, que dona nom a la lesió. Per tant podem trobar malformacions capil·lars (CMs), limfàtiques (LMs), venoses (VMs), arteriovenoses (AVMs) o fistules arteriovenoses (AVFs). En el cas de les afeccions arteriovenoses és cert que poden estar implicades arteries, venes i capil·lars. Tot i així, com que no es consideren com a lesions formades per diferents tipus de malformacions, són classificades amb més precisió com a malformacions simples. En el cas de les malformacions combinades, dos o més tipus de malformacions vasculars estan presents en una mateixa lesió. S'anomenen a partir de la menció dels components específics de cada lesió, per ordre alfabètic. Per exemple, les malformacions capil·lar-venoses (CVMs), serien aquelles en que trobem anomalies capil·lars i venoses. De la mateixa manera també existeixen moltes altres modalitats, com malformacions limfàtic-venoses (LVM), capil·lar-linfàtic-venoses (CLM), capil·lar-venosa-arteriovenoses (CVAVM), etc. (241).

D'altra banda, les malformacions de grans vasos, també anomenades troncal, són aquelles presents en canals conductors grans o axials. S'inclouen anomalies en l'origen, els curs, el nombre, la longitud, el diàmetre o les característiques de les vàlvules dels vasos sanguinis amb nom anatómic propi. Un exemple n'és la coartació de l'aorta o els vasos embrionaris persistents. Aquest tipus de malformacions es caracteritzen per la seva estabilitat i el potencial de reparació sense recurrència. Per últim, qualsevol dels tipus de malformacions vasculars que hem descrit, poden estar associats a anomalies no vasculars, destacant afeccions òssies o del teixit tou o de sobrecreixement visceral. Per exemple, la síndrome de Klippel-Trenaunay (KTS) presenta malformacions vasculars juntament amb un creixement excessiu d'alguns teixits tous i els ossos. Un altre cas inclòs en aquest grup seria la síndrome de Struge-Weber (SWS), el qual es caracteritza per malformacions capil·lars, sovint a la cara, a prop de l'ull, que comporten també complicacions oculars i neurològiques com el glaucoma o episodis d'epilèpsia i retard mental. En algunes classificacions també s'inclouen els síndromes de sobrecreixement PROS, amb fenotips molts variables però definits per el sobrecreixement segmentari heterogeni a causa de mutacions activadores somàtiques al gen PIK3CA, codificant per la subunitat p110 α de la via PI3K. La majoria de casos PROS inclouen diverses malformacions vasculars en el quadre clínic (241,244).

Com és evident, la presentació clínica de les malformacions vasculars és variable i depèn del tipus de lesió, així com de la localització, la mida i la relació amb altres teixits. Aquestes lesions poden causar símptomes com isquèmia, inflamació, dolor, trombosi, deformitat i deteriorament funcional. Actualment, el diagnòstic de les malformacions vasculars es basa tant en la presentació clínica com en tècniques d'imatge complementàries, amb especial èmfasi en la ressonància magnètica. També cal destacar els grans avenços en l'ús del diagnòstic genètic o molecular. Així doncs, el tractament pot variar segons el tipus de vas implicat, el tipus de malformació o la síndrome associada. Com que per la majoria de casos no hi ha una cura definitiva, el tractament té com a objectiu minimitzar els símptomes, pel que les decisions terapèutiques es prenen en base a equips multidisciplinaris que determinen quina és la millor estratègia per a cada pacient. Els tractaments actuals poden anar des de simples tractaments cosmètics, fins a intervencions complexes, incloent tractaments embolitzants o

esclerosants, tractaments làser, la resecció quirúrgica de la lesió o tractaments farmacològics dirigits a les alteracions moleculars diagnosticades. Desafortunadament, el risc de recurrència d'aquestes lesions és alt, especialment després de tractaments invasius o durant etapes de creixement del pacient (245).

Es creu que les malformacions vasculars resulten d'errors genètics durant el desenvolupament embrionari que donen lloc a processos de senyalització anormals responsables del control de processos cel·lulars bàsics, com ara l'apoptosi, la maduració o el creixement de les ECs. Comprendre els canvis genètics que impulsen la formació de les malformacions és clau per fer diagnòstics adequats i entendre la patologia. Aquestes variants genètiques patogèniques es poden classificar com a germinals (mutacions familiars o hereditàries) o somàtiques (mutació espontània adquirida durant el desenvolupament). La majoria de les anomalies vasculars sorgeixen de mutacions somàtiques, en les quals hi ha una mutació postzigòtica en una sola cèl·lula que s'expandeix i es perpetua, acabant tenint presència en certs grups cel·lulars de manera mosaica (244).

Les malformacions vasculars s'han dividit tradicionalment en malformacions de baix flux (lesions capil·lars, venoses, limfàtiques o mixtes) o d'alt flux (lesions amb un component arterial) segons les seves característiques hemodinàmiques (**Taula 1.2**). Aquesta distinció es pot fer radiològicament o basant-se en l'examen físic, ja que les lesions d'alt flux són més propenses a demostrar calidesa i un flux palpable. La diferenciació entre malformacions d'alt (*high flow*) i baix (*low flow*) flux pot ser útil a l'hora de seleccionar una intervenció o tractament farmacològic. Tanmateix, aquestes designacions reflecteixen essencialment el tipus de vas predominant en la lesió, però no s'inclou com a part de les directrius de l'ISSVA.

9.1.2.1. Malformacions vasculars d'alt flux: lesions arteriovenoses

Les AVMs es produeixen a causa d'una connexió directa entre una artèria i una vena, obviat el llit capil·lar, i donant lloc a l'arterialització de les venes i una lesió d'alt flux amb propensió a créixer i sagnar. Les AVMs esporàdiques s'associen habitualment a mutacions a la via RAS/MAPK i mutacions a RASA1 s'associen amb CM-AVMs (244). També s'han detectat canvis genètics a MAP2K/MEK o KRAS i diversos grups estan començant a utilitzar inhibidors de MEK per a al tractament preclínic d'aquestes anomalies (246,247). Mutacions en heterozigosis dels gens ENG i ALK també han estat diagnosticades en alguns casos de AVMs esporàdiques (244). Tot i els nombrosos descobriments pel que fa a la causa genètica d'aquestes malformacions, tant el mecanisme fisiològic associat a la patologia endotelial com el subtipus cel·lular responsable del fenotip no estan del tot clars.

Aquest tipus de lesió es troba més freqüentment en localitzacions intracranials i es pot expandir com a resposta a determinats estímuls, com ara traumatismes o la pubertat. Els símptomes de les AVMs són atribuïbles al lloc afectat. Per exemple, les AVMs cerebrals poden presentar-se amb signes d'ictus hemorràgic o epilèpsia, mentre que les AVMs pulmonars causen hipòxia i símptomes neurològics aguts a causa d'un infart cerebral o un abscess causat per la connexió arteriovenosa. Les AVMs solen estar presents des del

naixement, però sovint romanen asimptomàtiques fins a l'edat adulta. En quant a les AVMs hereditàries, el cas més freqüent és la telangièctasi hemorràgica hereditària (HHT), també coneguda com a síndrome d'Osler-Weber-Rendu. L'HHT és un trastorn vascular caracteritzat per l'aparició de múltiples AVMs arreu del cos. Es tracta de petites telangièctasis que poden manifestar-se com a lesions superficials a la pell i a la membrana mucosa, i que degut a la seva tendència a trencar-se, donen lloc a recurrents episodis d'epistaxi o hemorràgies gastrointestinals. Les mutacions causants d'HHT inclouen gens involucrats a la via de senyalització de TGF β , així com ENG, ALK1/ACVRL1, GDF2 o SMAD4/MADH4 (248–250) (**Taula 1.2**).

9.1.2.2. Malformacions vasculars de baix flux: lesions capil·lars, venoses o limfàtiques

D'acord amb la hemodinàmica de la lesió vascular, totes aquelles malformacions on no hi ha implicació arterial són classificades com malformacions de baix flux. Per tant, en aquest apartat exposarem les característiques histopatològiques, clíniques i moleculars de les malformacions capil·lars, venoses i limfàtiques.

Les CMs es defineixen per el desenvolupament anormal dels capil·lars i la dilatació patològica dels mateixos. Normalment aquestes lesions es situen a la dermis superficial amb un flux característicament lent. Es detecten en el moment del naixement i poden canviar de color amb el temps, ja que amb l'edat, l'estasi vascular en els capil·lars malformats provoca èctasi vascular i l'engrossiment dels teixits tous (244). D'altra banda, les CMs es poden associar amb síndromes més complexes o poden presentar-se com lesions simples aïllades. El síndrome de Sturge-Weber (SWS) representa el cas més conegut de CM somàtica. Les lesions vasculars observades a SWS o en els casos de CMs simples més freqüents són causades per mutacions a GNAQ o GNA11, les quals condueixen a l'activació constitutiva de la via RAS/MAPK, així com a certa sobreactivació de la via PI3K (251,252).

Les VMs són lesions de baix flux que es manifesten com una massa aberrant de vasos venosos. Sovint es considera el tipus de malformació vascular més freqüent, amb una incidència d'1 de cada 5000-10000 naixements. Poden variar de mida, des de lesions molt petites i localitzades, fins a extenses malformacions, i són de color violeta o blavós a causa del flux sanguini estancat dins de la lesió. Més del 90% dels casos són d'origen esporàdic i donen lloc a anomalies aïllades. Aquestes comporten dolor, inflamació i complicacions trombòtiques i funcionals en el teixit on es troben. La seva localització és molt variada i pot afectar qualsevol teixit, destacant la pell, les superfícies mucoses, els teixits tous, els músculs i les vísceres. La majoria de lesions són evidents al néixer, però en alguns casos on la lesió és més profunda, aquesta no presenta signes clínics fins a la pubertat, on els estímuls hormonals influeixen en el creixement i la reactivació de la lesió (244).

En els darrers anys, estudis genètics han determinat diverses mutacions associades a l'aparició de les VMs, i s'ha especulat amb la hipòtesis de que els gens, les variants i les vies implicades són determinants per a la presentació fenotípica de cada cas. Gairebé la meitat dels casos han estat diagnosticats amb mutacions al gen TIE2/TEK (253), el 25%,

amb mutacions activadores del gen codificant per PI3K α , PIK3CA (254–256), i encara trobem un altre 25% dels casos no diagnosticats genèticament. Cal destacar que les mutacions més comuns a PIK3CA són les mateixes que els canvis genètics més recurrents en càncers humans, també anomenades mutacions “*hotspot*”: E545K i E542K al domini helicoidal i H1047R i H1047L al domini quinasa (257). A més a més, les mutacions “*hotspot*” de PIK3CA i TEK no han estat mai observades juntes, el que ens indica que aquestes només són compatibles en exclusió mútua.

També cal esmentar altres tipus de VMs, com les malformacions glomuvenoses (GVMs), la síndrome de “*blue rubber bleb nevus*” i les malformacions cavernoses cerebrals (CCMs), les quals són morfològicament diferents de les VM comuns, probablement a causa de la diferència entre els gens que les causen. Per exemple, les CCMs són VMs localitzades al cervell i la medul·la espinal que es fan evidents quan el pacient presenta símptomes neurològics importants com mal de cap intens, convulsions o hemorràgies. Aquestes lesions també es poden associar amb VMs o CMs extraneurals, i gran part dels casos es relacionen amb antecedents familiars hereditaris. S’han descrit nombroses mutacions genètiques associades a aquest tipus de VM entre les que trobem pèrdues de funció a KRIT1 (CCM1), CCM2 i PDCD10 (CCM3) (258–260). La funció precisa d’aquests gens encara no es compren totalment, però se’ls hi atribueixen papers importants en l’assemblatge entre les ECs, on les versions mutants donen lloc a unions més febles i per tant, a la permeabilitat patològica dels vasos. Investigacions recents també han mostrat com el creixement agressiu de les CCMs requereix tant la pèrdua de funció dels gens CCM, com l’activació constitutiva de PI3K (per mutacions activadores a PIK3CA) (261). Els tipus i les causes genètiques associades a cada una de les VMs descrites es troben resumits a la **Taula 1.2**.

En últim lloc, les LMs estan formades per canals limfàtics dilatats o quists revestits d’endoteli limfàtic. Podem trobar-los de forma localitzada o bé difusos, presentant una gran heterogeneïtat fenotípica. Les LMs comuns es poden classificar com a macrocístiques, microcístiques o mixtes, i les trobem principalment en regions amb gran contingut de vasos limfàtics com el cap i el coll, l’axil·la, la cavitat oral, l’engonal o el mediastí. Les LMs macrocístiques són masses quístiques grans i llises. Aquestes lesions solen ser superficials, subjacents a la pell o al teixit subcutani. Les lesions microcístiques apareixen com a vesícules petites, sovint fermes, translúcides o hemorràgiques. Per últim, els casos mixtos contenen els dos tipus de LMs anteriors. La majoria de LMs es deuen a mutacions esporàdiques en gens que regulen la limfangiogènesi, majoritàriament implicades en la regulació de la senyalització VEGF-C/VEGFR3 o PI3K/AKT/mTOR. Cal subratllar que al voltant del 80% de les LMs comuns es diagnostiquen amb les mateixes mutacions a PIK3CA que les presents a les VMs (262–264) (**Taula 1.2**).

Com hem vist, les mutacions activadores de PIK3CA són causants de diversos tipus de malformacions vasculars, amb un important protagonisme en les patologies venoses i limfàtiques. Tanmateix, aquest tipus de mutacions no han estat identificades en cèl·lules germinals o casos de malformacions hereditàries. En aquesta línia, experiments *in vivo* en ratolins han demostrat que la inducció de mutacions en *Pik3ca* a la línia germinal deriva en danys vasculars letals per al desenvolupament embrionari (221). En canvi, la

expressió endotelial postnatal d'aquestes mutacions desencadena una notable hiperplàsia a la vasculatura de la retina murina, resultat de l'augment dramàtic de la proliferació endotelial, així com la disminució del recobriment mural dels vasos (256).

Malformacions Vasculars				
Tipus de malformació	nom		mutació	naturalesa de la lesió
alt flux (high flow)	AVMs	Malformacions artiovenoses esporàdiques	RASA1, MAP2K/MEK, KRAS, NRAS, BRAF, ENG, ALK	somàtica
		Telangièctasi hemorràgica hereditària (HHT)	ENG, ALK1/ACVRL1, GDF2 o SMAD4/MADH4	hereditària
		Malformacions capil·lars-arteriovenoses (CM-AVMs)	RASA1, EPHB4	somàtica/hereditària
baix flux (low flow)	CMs	Malformacions capil·lars (CM)	GNAQ, GNA11	somàtica
		Telangiectasi <i>Cutis Marmorata</i> (CMTC)	possible GN11, desconegut	somàtica
		Síndrome Struge-Weber (SWS)	GNAQ	somàtica
		Phacomatosis pigmentovascularis	GNAQ, GNA11	somàtica
	VMs	Malformacions venoses comuns (VM)	TEK, PIK3CA	somàtica
		Malformacions venoses verrucoses	MAP3K3	somàtica
		Anomalies vasculars fibroadiposes (FAVA)	PIK3CA	somàtica
		Malformacions cerebrals cavernoses (CCM)	KRIT1, CCM2, PDCD10	somàtica/hereditària
		Síndrome de "blue rubber bleb nevus"	TEK	somàtica
		Anomalies venoses associades a PTEN	PTEN	hereditària
		Malformacions venoses mucocutànies	TEK	hereditària
		Glomangiomes	GLMN	hereditària
		Venes varicoses	FOXC2	hereditària
	LMs	Malformacions limfàtiques (LM)	PIK3CA	somàtica
		Anomalies limfàtiques generalitzades (GLA)	PIK3CA	somàtica
		Limfangiomatosis kaposiforme (KLA)	NRAS	somàtica
		Malformacions limfàtiques congenites pulmonars	CCBE1	somàtica
		Limfedemes primaris	FLT3, VEGFR3	hereditària
		Altres casos de limfedema	FOXC2, GJC2, KIF11, SOX18, PTPN14, CCBE1, FAT4, ADAMTS3, GATA2	hereditària
	Associades a altres patologies	Síndrome Parkes Weber	RASA1	somàtica
		Síndrome Sevelle-Weber	unknown	somàtica
		Síndrome Malfucci	IDN1-IDH2	somàtica
		Síndrome CLOVES (PROS)	PIK3CA	somàtica
		Síndrome CLAPO (PROS)	PIK3CA	somàtica
		Síndrome Proteus	AKT1	somàtica
		Síndrome KTS (PROS)	PIK3CA	somàtica
		Síndrome MCAP (PROS)	PIK3CA	somàtica
		Síndrome DCMO (PROS)	PIK3CA	somàtica

Taula 1.2. Classificació de les malformacions vasculars en vers a les característiques hemodinàmiques de la lesió i les mutacions genètiques associades. Les malformacions vasculars poden subdividir-se en malformacions d'alt flux, incloent malformacions arteriovenoses, o de baix flux, on s'inclouen malformacions venoses, capil·lars o limfàtiques. També podem trobar malformacions vasculars associades a síndromes complexos (al final de la taula). Cada tipus de malformació ha estat associat amb certes mutacions genètiques de naturalesa germinal o somàtica, tal i com s'indica a la part dreta de la taula. Taula adaptada de *Borst et al. 2020*.

La baixa freqüència al·lèlica de les mutacions PIK3CA a les biòpsies dels teixits afectats suggereix que només una població cel·lular concreta expressa la variant genètica de manera mosaica. A més a més, l'existència de la mateixa mutació PIK3CA tant a malformacions simples (VMs o LMs) com a malformacions combinades, i inclús, a síndromes de sobrecreixement més complexos (PROS), ens fa pensar que el factor genètic no és l'únic responsable de la manifestació clínica d'aquestes patologies (265). El tipus, la localització i la severitat de l'anomalia vascular probablement depèn de la variant genètica, però també, del moment i el llinatge cel·lular on aquesta succeeix, així com dels estímuls ambientals als que la cèl·lula mutada pugui estar exposada. Així doncs, les mutacions a PIK3CA podrien ocórrer en progenitors cel·lulars molt primitius, pel que la seva expansió podria acabar afectant a múltiples llinatges endotelials. Pel contrari, si la mutació té lloc més endavant durant el desenvolupament, en un llinatge cel·lular més diferenciats, l'afectació fenotípica també acabaria sent més continguda. Aquestes i altres hipòtesis en relació als mecanismes que originen i determinen les característiques de les malformacions vasculars encara generen una gran discussió que requereix ser provada per evidències científiques.

9.2. Perspectives de futur en el diagnòstic i el tractament de les malformacions vasculars

En general, l'escleroteràpia o la cirurgia segueixen sent el procediment estàndard per al tractament de les anomalies vasculars. No obstant això, aquests processos rarament són curatius o no són factibles a causa de l'extensió de les malformacions, l'alt risc de relapse i l'alta morbiditat associada a les intervencions quirúrgiques. En els últims anys, el descobriment de les mutacions responsables de les malformacions vasculars ha obert un ventall d'oportunitats per al diagnòstic i la investigació de teràpies moleculars dirigides. La identificació de mutacions somàtiques a PIK3CA i l'eix PI3K/AKT/mTOR com a responsables de gran part de les patologies vasculars descrites anteriorment, ha convertit a aquesta via en un important objectiu terapèutic (**Figura 1.12**).

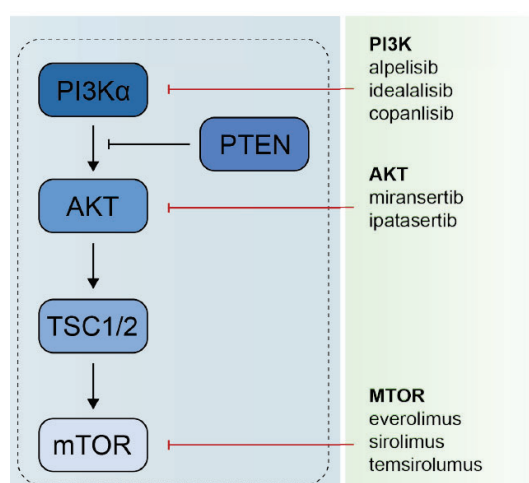


Figura 1.12. Teràpies moleculars dirigides a la inhibició de la via PI3K. Imatge obtinguda de Kobiak P. 2019.

La rapamicina (Sirolimus) es va introduir l'any 2011 com el primer tractament farmacològic per anomalies vasculars complicades i va revolucionar completament el camp. Es tracta d'un inhibidor del complex mTOR, que per tant, evita la fosforilació de proteïnes efectores com S6RP o 4E-BP1, a la vegada que inhibeix l'activació d'AKT mediada per mTORC2. La rapamicina ha demostrat efectes immunosupressors, antiangiogènics i citoestàtics en diferents assajos clínics, però la validació del seus efectes terapèutics en les malformacions vasculars són relativament recents. En diferents models de VMs *in vivo* (generats mitjançant l'expressió de *TIE2*^{L914F} o *Pik3ca*^{H1047R}), el tractament amb rapamicina va provocar la disminució i el retard del creixement de les lesions vasculars. Estudis moleculars han mostrat com l'acció de la rapamicina té un efecte directe en la reducció de l'activitat d'AKT i el conseqüent augment dels nivells de FOXO1 i PDGFB, els quals podrien ajudar a reduir la proliferació endotelial i millorar la cobertura mural dels vasos, respectivament (256,266). Dades provinents d'assajos clínics de fase II van corroborar un benefici terapèutic i una correcta tolerabilitat de la rapamicina en pacients amb diverses anomalies vasculars, inclosos casos de VMs i LMs (267,268).

Més enllà dels inhibidors de mTOR, també s'han desenvolupat inhibidors específics de p110α, com és el cas de BYL719 (Alpelisib). Donada la importància de PIK3α en els processos angiogènics, la inhibició específica d'aquesta quinasa ha estat objectiu d'investigació per la teràpia antitumoral. Diversos estudis han demostrat els efectes d'Alpelisib en la normalització vascular dels tumors en administrar-se amb altres fàrmacs antioncogènics (269,270). Les evidències que sostenen l'eficàcia dels inhibidors de PIK3α per a la modulació de l'angiogènesi ens fan pensar en la seva aplicabilitat en el camp de les anomalies vasculars. Concretament, la inhibició de PIK3α podria ser prometedora en PROS, on ja hi ha estudis preclínic que demostren que el tractament de models animals amb síndrome PROS/CLOVES amb BYL719 presenta una eficàcia superior als tractaments amb rapamicina. Aquests descobriments han permès posar a prova Alpelisib en un cohort de pacients amb PROS on, a més de millorar la simptomatologia, s'ha demostrat una reducció radiològica de les lesions al voltant del 30%, sense signes de toxicitat (271).

El descobriment de PIK3CA com a causant de gran part de les lesions vasculars de baix flux ha catalitzat la reutilització dels inhibidors de la via PI3K per al tractament d'aquestes malalties. Atès que les ECs mutants depenen principalment de la senyalització d'AKT, la inhibició d'aquest component de la via sembla una estratègia atractiva per al tractament de dites patologies. Entre els inhibidors d'AKT disponibles, trobem ARQ092 (Miransertib), un potent inhibidor al·lostèric i amb especial especificitat per AKT1. La inhibició de l'activitat quinasa d'AKT ha demostrat una eficàcia considerable en estudis preclínic antitumorals (272) i en el tractament del síndrome de Proteus (causat per mutacions activadores a AKT) (273–275). Cal destacar també que resultats recents de les nostres investigacions han demostrat el poder terapèutic de Miransertib, tant per la prevenció, com per a la regressió de VMs impulsades per l'expressió postnatal de *Pik3ca*^{H1047R} en ratolins (276). El conjunt d'aquests resultats ha permès l'ús de Miransertib en assajos clínics per pacients amb PROS (NCT03094832) i síndrome de

Proteus (NCT02594215) i ha estat recentment aprovat per la *Food and Drug Administration* (FDA) per al tractament d'aquests desordres (277).

Com hem vist, la inhibició de PI3K s'ha convertit en un objectiu clau per al desenvolupament de nous tractaments contra les anomalies vasculars. De la mateixa manera, trobem una investigació al alça per a la avaluació d'inhibidors de la via RAS/MAPK, ja que les mutacions somàtiques en components d'aquesta via són responsables de l'aparició de malformacions d'alt flux o alguns casos de CMs. Totes les dades apunten a que aquests descobriments impulsaran la evolució en el camp de les anomalies vasculars en els propers anys, posant llum a l'enfoc clínic d'aquestes patologies. Per aquest motiu, és important fer èmfasi en el paper del diagnòstic molecular d'aquest pacients i l'estudi genètic de cada cas. En conjunt, aquestes evidències posen de manifest la importància en la recerca per a la comprensió dels mecanismes moleculars responsables de la patogenicitat de les malformacions vasculars, la qual serà de vital importància per al desenvolupament de noves intervencions terapèutiques, i com a últim fi, la millora en la qualitat de vida dels pacients.

HIPÒTESI I OBJECTIUS

La sobreactivació de la via de la PI3K és un dels trets característics de les malformacions vasculars. En concret, en els darrers anys, s'ha posat de manifest que mutacions al gen *PIK3CA* són causants de malformacions vasculars venoses i limfàtiques, però no han estat descrites com a mutacions patogèniques en anomalies arteriovenoses. Els mecanismes a través dels quals les mutacions a *PIK3CA* presenten un quadre patogènic segregat (venes i vasos limfàtics si, artèries no) són desconeguts. Sota aquest pretext, la meua tesi s'ha centrat en estudiar els mecanismes moleculars subjacents a la patogenicitat selectiva de *PIK3CA*.

La hipòtesi que plantejo proposa que les mutacions a *PIK3CA* només són patogèniques en determinats contextos (incloent temps i localització); el que implica que hi ha estats o llinatges endotelials que són refractaris a les mateixes. Per tant, l'objectiu de la meua tesi és identificar els elements en el temps i l'espai que determinen la patogènesi de *PIK3CA* en les cèl·lules endotelials. Tenint en compte que en un context oncològic *PIK3CA* s'ha associat a canvis proliferatius i metabòlics, aquests seran els dos elements centrals d'estudi com a causa de patogenicitat.

Aquesta tesi s'ha dividit en 4 objectius principals:

- **Objectiu 1:** Generar un model de malformacions vasculars mitjançant l'expressió postnatal de *Pik3ca*^{H1047R} en la vasculatura de la retina de ratolí, considerant el moment d'expressió de la mutació com a element catalitzador.
- **Objectiu 2:** Caracteritzar la patogenicitat de *Pik3ca*^{H1047R} en les malformacions vasculars prenent com a eix central d'estudi el llinatge endotelial on s'expressa la mutació.
- **Objectiu 3:** Desxifrar els mecanismes moleculars implicats en les diferències fenotípiques durant l'origen i especificació molecular dels mutants *Pik3ca*^{H1047R}.
- **Objectiu 4:** Determinar el perfil metabòlic implicat en la patogènesi de les malformacions vasculars causades per *Pik3ca*^{H1047R} mitjançant l'anàlisi metabolòmic de les cèl·lules endotelials mutants.

MATERIALS I MÈTODES

1. Animals i estabulació

1.1. Manteniment de la colònia animal

Els animals utilitzats al llarg d'aquest projecte han estat estabulats en gàbies individuals, ventilades i autoclavables, en sales SPF lliures de patògens i amb accés a aigua *ab libitum*. Durant el procés de cria i experimentació, la colònia animal ha estat mantinguda a una temperatura estable d'entre 20 i 22° C, en cicles de llum/fosc de 12 hores, per tal de garantir el benestar animal i la reproductibilitat experimental. Els procediments experimentals exposats en aquest treball han estat dissenyats i aprovats d'acord amb la normativa i la legislació vigent establerta pel Departament d'Agricultura, Ramaderia i Pesca de Catalunya, així com els criteris del Comitè Ètic d'Experimentació Animal de l'IDIBELL (CEEa-IDIBELL), el Centre de Medicina Comparativa i Bioimatge de Catalunya (CMCiB) i d'acord amb l'acreditació internacional AAALAC (*Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care International*).

1.2. Models murins transgènics

Amb l'objectiu de modelar i estudiar els processos moleculars implicats en el desenvolupament de les malformacions vasculars hem fet ús de diferents models de ratolí manipulats genèticament (*Mus musculus*, soca C57BL/6J), tots ells enumerats i descrits detalladament en els següents apartats. Les característiques principals i la representació gràfica de l'estratègia genètica de cada un dels models es troba resumida a la **Taula 3.1** i la **Figura 3.1**, respectivament.

En general, tots els ratolins emprats tenen l'objectiu de permetre l'expressió induïble dels constructes introduïts en cada un dels models. Hem fet ús de ratolins mutants condicionals, pel que el gen que es vol modificar és emmarcat entre dues seqüències específiques, les quals no són reconegudes per cap enzim endògen, però sí per una recombinasa específica. D'aquesta manera, l'activitat de la recombinasa farà possible la escissió de les seqüències que envolten el gen en qüestió, donant lloc a la modificació genètica de la cèl·lula. Aquesta estratègia permet l'expressió induïble de la modificació genètica, permetent decidir el moment i la subpoblació cel·lular on això ocorri. En el nostre cas, les línies descrites combinen l'expressió de la recombinasa Cre, juntament amb la presència de seqüències loxP (sistema Cre recombinasa/lox).

Per cada una de les combinacions genètiques utilitzades al llarg d'aquesta tesi, ens referim a animals control a aquells animals amb els mateixos al·lels mutants que els animals sota estudi però, negatius per a la línia Cre utilitzada en cada un dels experiments.

1.2.1. *Pik3ca*^{H1047R}

Els ratolins *Pik3ca*^{H1047R} presenten una modificació genètica induïble al gen *Pik3ca*. El constructe a estat introduït sota el promotor endogen del gen en qüestió, pel que permet la regulació natural de la seva transcripció. El constructe emprat manté la seva estructura *wt*, excepte a l'últim dels exons codificants, l'exó 20, el qual es troba flanquejat per dues seqüències *loxP* i finalitza amb un codó *stop* per indicar el final de la transcripció. A continuació d'aquest, trobem una còpia repetida del mateix exó 20, en aquest cas amb la incorporació de la mutació puntual (CAT → AGG) que canvia la histidina de la posició 1047 per una arginina (H1047R). Aquesta estratègia permet que, en absència d'activitat recombinasa, el gen s'expressi de manera normal. Pel contrari, sota l'acció de Cre, l'exó 20 serà escindit, deixant pas a l'expressió de l'exó 20 mutat (278). La mutació H1047R es troba a la regió codificant de la subunitat catalítica de p110α i provoca el guany de funció en aquesta proteïna, augmentant l'activitat catalítica de la mateixa mitjançant l'increment de la seva capacitat d'unió a lípids. En el model animal, mantenim la mutació en heterozigosis per tal de reproduir les condicions genètiques diagnosticades en pacients amb malformacions vasculars.

1.2.2. Línies endotelials Cre

Amb l'objectiu d'induir la recombinació a les diferents subpoblacions endotelials, hem utilitzat un repertori de línies de ratolí Cre induïbles amb tamoxifè. La restricció de l'expressió de la recombinasa Cre depèn dels elements potenciadors o promotors que la controlen:

- ***Pdgfb-CreER*^{T2}**. PDGFB és un lligand de gran afinitat amb els receptors PDGFRα i PDGFRβ. PDGFB s'expressa a les ECs i és crucial per al correcte reclutament dels PCs i les vSMCs. Es tracta d'una línia Cre induïble expressada de forma generalitzada a l'endoteli sanguini i limfàtic, amb activitat reportada des del dia E11.5 durant el desenvolupament (184).
- ***Bmx-CreER*^{T2}**. *Bmx* codifica per un membre de les tirosines quinases Tec, expressat en ECs arterials, tant a nivell embrionari com en teixit adult. La línia Cre té activitat induïble en artèries establertes i diferenciades (186).
- ***Esm1-CreER*^{T2}**. *Esm1* codifica per una proteïna secretada amb rols associats a desordres patològics a l'endoteli. S'expressa a les cèl·lules *tip* de la retina postnatal, pel que és un model habitualment usat per estudiar l'angiogènesi (187). En el context d'aquesta tesi, i d'acord amb estudis previs sobre el comportament de les cèl·lules *tip*, la línia *Esm1* ha estat utilitzada per induir la recombinació en cèl·lules compromeses a adoptar un destí cel·lular arterial (també referides com pre-arterials).

1.2.3. Línia reportera mTmG

La línia murina mTmG (*membrane-Tomato membrane-GFP*) és un doble reporter dependent de Cre, que expressa la proteïna fluorescent de membrana *Tomato* abans de l'excisió mediada per l'activitat Cre, i la proteïna fluorescent GFP, després de l'excisió (279). En altres paraules, el constructe genètic de mTmG permet que la primera

seqüència codificant per *Tomato*, flanquejada per seqüències *loxP*, s'expressi de forma constitutiva a totes les cèl·lules, mentre que la segona (GFP), només s'expressarà en aquelles cèl·lules amb activitat Cre. Aquest sistema permet la visualització *in vivo* de les poblacions cel·lulars recombinades (*mGFP*⁺) amb gran resolució, i ha estat combinada amb el model *Pik3ca*^{H1047R} amb l'objectiu de definir l'extensió espacial i temporal de la recombinació i visualitzar les dinàmiques de les cèl·lules mutants en comparació amb poblacions *wild type*.

1.2.4. iSuRe-Cre

iSuRe-Cre és una eina genètica que permet induir i reportar de manera fiable modificacions genètiques dependents de Cre. Com que l'esdeveniment precís de recombinació Cre-*loxP* no és visible *per se*, s'han desenvolupat mètodes reporters (com és el cas del reporter mTmG). Tanmateix, nombrosos estudis han demostrat que no es possible garantir la recombinació d'un reporter dependent de Cre i un segon gen flanquejat per *loxP* a la mateixa cèl·lula. Sovint, aquests constructes presenten diferents eficiències de recombinació, pel que considerar totes aquelles cèl·lules reportades com a mutants pel segon al·lel podria conduir a errors en els resultats. Pel contrari, el model iSuRe-Cre s'ha dissenyat amb l'objectiu de permetre l'expressió d'una proteïna fluorescent (*Tomato* a la membrana cel·lular, *mTomato*), seguida de l'expressió constitutiva de Cre, amb l'objectiu de potenciar la recombinació del segon al·lel dependent de Cre a la mateixa cèl·lula. Aquesta estratègia permet augmentar significativament l'eficiència i la visualització fiable de les cèl·lules modificades genèticament (*mTomato*⁺), especialment en casos on l'al·lel sota estudi recombini amb menys eficiència que el reporter (280).

1.2.5. iFlu-Mosaic-*Pik3ca*^{H1047R}

Com hem mencionat, el fet de que no hi hagi cap enllaç genètic entre un al·lel reporter i l'altre al·lel flanquejat per seqüències *loxP* (en el nostre cas, *Pik3ca*^{H1047R}), no assegura la correlació entre la recombinació d'ambdós. En contextos concrets, aquesta situació podria induir a la detecció de falsos positius o falsos negatius. És per aquest motiu que, en col·laboració amb el laboratori del doctor Rui Benedito, hem desenvolupat un nou model murí induïble per Cre; iFlu-Mosaic-*Pik3ca*^{H1047R}. Aquest ha estat dissenyat amb dos parells de seqüències *loxP*, les quals recombinen aleatòriament donant lloc a l'expressió de l'expressió de *Cherry* nuclear (*nCherry*), o bé, a l'expressió de *Pik3ca*^{H1047R} seguida de l'expressió de GFP nuclear (*nGFP*). D'aquesta manera podem visualitzar i analitzar el comportament de cèl·lules *Pik3ca* *wt* o mutants durant el desenvolupament vascular amb gran resolució. Cal destacar però, que el constructe *iFlu-Mosaic-Pik3ca*^{H1047R} s'expressa en el locus de Rosa26, sota el promotor CAG, un promotor sintètic dissenyat per garantir alts nivells d'expressió. Aquest fet implica que la regulació transcripcional de *Pik3ca* perd la seva naturalesa endògena, a diferència del model *Pik3ca*^{H1047R}.

1.2.6. Model COUP-TFII *knockout*: *Nr2f2*^{flox/flox}

La línia *Nr2f2*^{flox/flox} és un model nul condicional de *COUP-TFII*, el que implica que un cop recombinat per l'acció de Cre, la seqüència codificant per *Nr2f2* (exons 1-3) sigui deletada, impossibilitant la seva transcripció i expressió funcional. Aquest model ha estat construït a partir de la inserció de dues seqüències *loxP* al locus genòmic de *Nr2f2* (281). Per aconseguir la privació completa de *COUP-TFII* a les cèl·lules recombinants, aquest al·lel s'haurà de mantenir en homozigosis, evitant així possibles mecanismes de compensació entre les dues còpies genètiques.

A. Mutació <i>Pik3ca</i> ^{H1047R} induïble per Cre		
Línia	Producte de la recombinació	
<i>Pik3ca</i> ^{H1047R}	expressió endògena de <i>Pik3ca</i> ^{H1047R} en heterozigosis	
B. Línies endotelials Cre induïbles		
Línia	Població cel·lular	Activitat del promotor
<i>Pdgfb-CreER</i> ^{T2}	Cèl·lules endotelials i endoteli hemogènic	E8-E9.5
<i>Bmx-CreER</i> ^{T2}	Cèl·lules endotelials arterials	E8.5-E11.5
<i>Esm-CreER</i> ^{T2}	Cèl·lules endotelials <i>tip</i> (pre-arterials)	E8.5-E10.5
C. Reporter mTmG		
Línia	Producte de la recombinació	
mTmG	expressió de <i>mGFP</i> després de la recombinació mediada per Cre	
D. iSuRe-Cre		
Línia	Producte de la recombinació	
iSuRe-Cre	expressió de <i>mTomato</i> i Cre després de la recombinació mediada per Cre	
E. iFlu-Mosaic- <i>Pik3ca</i> ^{H1047R}		
Línia	Producte de la recombinació	
iFlu-Mosaic- <i>Pik3ca</i> ^{H1047R}	expressió estocàstica de <i>nCherry</i> en cèl·lules <i>Pik3ca</i> ^{WT} , o bé, <i>nGFP</i> en cèl·lules <i>Pik3ca</i> ^{H1047R} , després de la recombinació mediada per Cre	
F. <i>Nr2f2</i> ^{flox/flox}		
Línia	Producte de la recombinació	
<i>Nr2f2</i> ^{flox/flox}	deleció del gen codificant per la proteïna <i>COUP-TFII</i> (<i>Nr2f2</i>) després de la recombinació mediada per Cre	

Taula 3.1. Resum de les característiques dels models murins transgènics utilitzats.

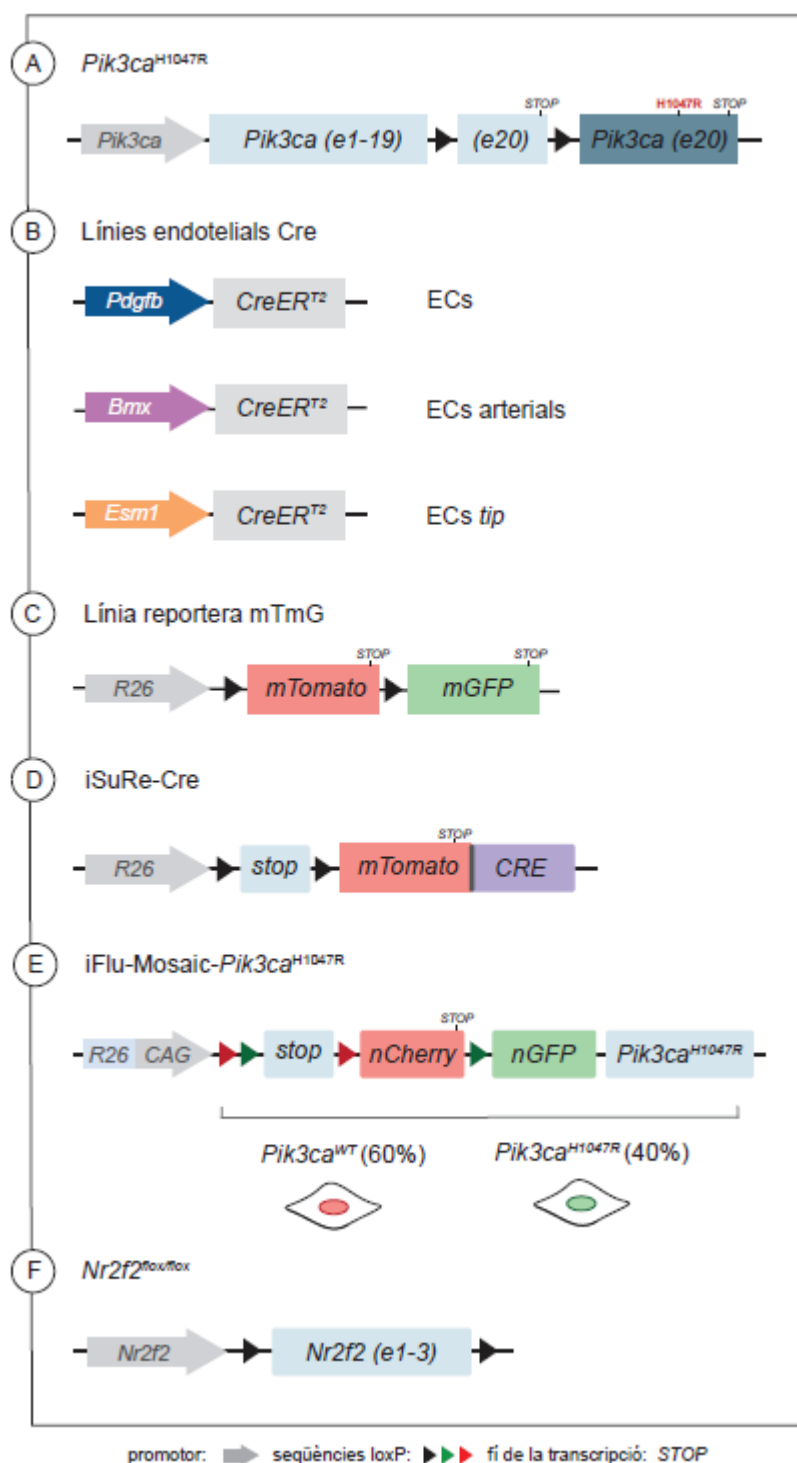


Figura 3.1. Representació gràfica de les estratègies genètiques emprades en els models de ratolí transgènics utilitzats al llarg d'aquesta tesi.

1.3. Deslletament i genotipatge

1.3.1. Biòpsia i digestió de la cua

Els ratolins es van mantenir amb els seus progenitors durant tres setmanes després del naixement, edat en la que són sexats, marcats i biopsiats per determinar el seu genotip. Amb aquest fi, es va recollir un fragment de la cua dels animals adults, o bé, postnatsals (en el moment de l'extracció dels ulls per l'aïllament de les retines). El teixit aleshores va ser lisat amb 600 µL de NaOH 50mM, mitjançant la incubació a 100°C durant 15 min. Un cop digerit el teixit, la mescla va ser atemperada, neutralitzada amb 100 µL de Tris HCl 1M pH 7,4 i homogeneïtzada per vòrtex, per seguidament, ser centrifugada durant 1 min a màxima potència. En aquest punt, la mostra està apunt per ser analitzada o emmagatzemada a 4°C.

1.3.2. Determinació del genotip mitjançant PCR

La determinació dels genotip de cada un dels ratolins emprats en aquest projecte ha estat portada a terme per PCR (tècnica de la Reacció en Cadena de la Polimerasa). Les seqüències dels encebadors o *primers* usats per l'amplificació dels fragments d'ADN de cada un dels genotips, així com els reactius, les proporcions i cicles usats en cada PCR, es troben resumits a la **Taula 3.2**.

Un cop obtingudes les reaccions de la PCR, aquestes van ser separades en gels d'agarosa al 2%, diluït en tampó TAE 1X (provinent de la dilució de TAE 50X: 242 g Tris Base, 57.1 mL àcid acètic glacial, 100 mL EDTA 0.5M pH 8, diluït en dH₂O), al que afegim bromur d'etidi o *SYBR Safe* per fer possible la visualització de l'ADN amplificat.

Línia	Primers (encebadors)	Reacció de la PCR per mostra	Condicions de la PCR
<i>Pik3ca</i> ^{H1047R/WT}	FW 1: TTGGTCCAGCCTGAATAAAG C	1,5 µl mostra ADN 2,5 µl 10X tampó	95°C 10 min
	FW 2: TCCACACCATCAAGCAGCA RV: GTCCAAGGCTAGAGTCTTTCG G	2,5 µl 10µM dNTPs	95°C 30 sec
		2,5 µl 10µM primers	55°C 30 sec
		0,125 µl polimerasa	72°C 40 sec
		Titanium	72°C 5 min
		15,875 µl H ₂ O	
<i>Pdgfb-CreER</i> ^{T2}	FW: CCAGCCGCCGTCGCAACT RV: GCCGCCGGGATCACTCTCG	2 µl mostra ADN	
		3 µl 10X tampó sense Mg ²⁺	94°C 4 min
		3 µl 15µM MgCl ₂	94°C 30 sec
		3 µl 10µM dNTPs	57,5°C 30 sec
		3 µl 10µM primers	72°C 1 min
		0,25 µl polimerasa Bio taq 15,75 µl H ₂ O	72°C 5 min

<i>Cdh5-CreER^{T2}</i>	FW: GGAGGCTGGAAAGTAGAGCA RV: TCCCTGAACATGTCCATCAG	2 µl mostra ADN 3 µl 10X tampó sense Mg ²⁺ 3 µl 15µM MgCl ₂ 3 µl 10µM dNTPs 3 µl 10µM primers 0,25 µl polimerasa Bio taq 15,75 µl H ₂ O	95°C 10 min 95°C 30 seg 55°C 30 seg 72°C 40 seg 72°C 5 min	35X
<i>Bmx-CreER^{T2}</i>	FW: GCCTGCATTACCGGTCGATGC AACGA RV: GTGGCAGATGGCGCGGCAAC ACCAT	2 µl mostra ADN 3 µl 10X tampó sense Mg ²⁺ 3 µl 15µM MgCl ₂ 3 µl 10µM dNTPs 3 µl 10µM primers 0,25 µl polimerasa Bio taq 15,75 µl H ₂ O	94°C 5 min 94°C 30 seg 70°C 30 seg 72°C 1 min 72°C 10 min	34X
<i>Esm-CreER^{T2}</i>	FW: GAGGGACTACCTCCTGTACC RV: TGCCAGAGTCATCCTTGCC	2 µl mostra ADN 3 µl 10X tampó sense Mg ²⁺ 3 µl 15µM MgCl ₂ 3 µl 10µM dNTPs 3 µl 10µM primers 0,25 µl polimerasa Bio taq 15,75 µl H ₂ O	94°C 2 min 94°C 45 seg 62°C 1 min 72°C 45 seg 72°C 2 min	35X
mTmG	FW 1: CTCTGCTGCCTCCTGGCTTCT FW 2: CGAGGCGGATCACAAGCAATA RV: TCAATGGGCGGGGGTCGTT	2 µl mostra ADN 3 µl 10X tampó sense Mg ²⁺ 3 µl 15µM MgCl ₂ 3 µl 10µM dNTPs 3 µl 10µM primers 0,25 µl polimerasa Bio taq 15,75 µl H ₂ O	94°C 5 min 94°C 30 seg 61°C 45 seg 72°C 1 min 72°C 5 min	35X
iSuRe-Cre	FW 1: CCCCCTGAACCTGAAACATA FW 2: GCTCTGCATGTTGCAAGAAA RV1: GTGTCTGTACCAGTTGGTTT G RV2: CCTTGCTCACCATGGTCTTG	2 µl mostra ADN 3 µl 10X tampó sense Mg ²⁺ 3 µl 15µM MgCl ₂ 3 µl 10µM dNTPs 3 µl 10µM primers 0,25 µl polimerasa Bio taq 15,75 µl H ₂ O	95°C 10 min 95°C 30 seg 55°C 30 seg 72°C 40 seg 72°C 5 min	35X
iFlu-Mosaic- <i>Pik3ca</i> ^{H1047R}	FW: ACGAGAAGCGCGATCACAT RV: CCTCACGGAGGCATTCTAAA	1,5 µl mostra ADN 2,5 µl 10X tampó 2,5 µl 10µM dNTPs 2,5 µl 10µM primers 0,125 µl polimerasa Titanium 15,875 µl H ₂ O	94°C 3 min 94°C 30 seg 60°C 30 seg 72°C 45 seg 72°C 7 min	35X
<i>COUP-TFI</i> ^{flox/flox}	FW1: TGGGGAAGCTAAGTGTGTAG TGATTCC FW2: CATCCGGGATATGTTACTGTC CGG RV: TTCTGGTCTTCACCCACCGGT ACC	2 µl mostra ADN 3 µl 10X tampó sense Mg ²⁺ 3 µl 15µM MgCl ₂ 3 µl 10µM dNTPs 3 µl 10µM primers 0,25 µl polimerasa Bio taq 15,75 µl H ₂ O	94°C 5 min 94°C 30 seg 62°C 30 seg 72°C 1 min 72°C 1 min	36X

Taula 3.2. Primers i condicions de les reaccions PCR per al genotipatge animal.

2. Experiments *in vivo*

Les referències de tots aquells reactius utilitzats als experiments descrits en aquesta tesi es troben detallats a les taules de la secció 5 de Materials i Mètodes (**Taules 3.3- 3.10**).

2.1. Inducció de l'activitat recombinasa Cre *in vivo*

Donat l'ús de línies Cre induïbles, l'activitat recombinasa requereix la presència de tamoxifè o 4-OH-Tamoxifè (4-OHT). En el nostre cas, la inducció de la recombinació en cadells de ratolí postnats es va dur a terme mitjançant la injecció intraperitoneal de 4-OHT amb l'ajuda d'una xeringa Hamilton (**Figura 3.2 A**). La dosi i el moment d'administració de 4-OHT dependrà del propòsit de cada experiment, usant dosis menors per aconseguir un major mosaïcisme (menor nombre de cèl·lules recombinants). Dosis d'entre 50 i 0,025 mg/kg han estat injectades a partir d'una solució original *stock* 10 mg/mL, diluïda en etanol pur i emmagatzemada a -20°C.

2.2. Tractaments farmacològics *in vivo*: inhibidor CIA1

CIA1 (**Taula 3.4**) és un inhibidor al·lostèric del factor de transcripció COUP-TFII. Aquest va ser preparat en DMSO a una concentració *stock* 10mM i emmagatzemat a -20°C. La solució de treball va ser preparada mitjançant la dilució de CIA1 10mM en 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP- β -CD) al 10% (diluïda en solució salina). Els ratolins postnats van ser injectats intraperitonealment amb 2,6 mg/kg (en un volum de 10 μ L) de CIA1 a P4 i P5. Cada camada de ratolins es va dividir en dos grups equiparables, injectant un grup amb l'inhibidor i l'altre, amb vehicle HP- β -CD 10% (grup control).

2.3. Modelatge de l'angiogènesi a la retina postnatal

Gran part dels experiments d'aquest projecte es basen en l'anàlisi de la retina postnatal de ratolí per a l'avaluació dels canvis fenotípics durant el desenvolupament vascular. Depenent de l'objectiu i la pregunta científica que volem adreçar en cada experiment, la inducció de la recombinació i l'aïllament de les retines s'ha dut a terme a diferents punts de desenvolupament. Podem trobar animals injectats amb 4-OHT a P1, P2, P7 o P15, i retines aïllades a P2, P4, P6, P8, P12, P15 o P21, en tots els casos, seguint el mateix protocol.

2.3.1. Extracció de l'ull i aïllament de la retina postnatal

Els animals postnats van ser sacrificats per decapitació. Un cop morts, es va extreure un fragment de la cua (per al posterior genotipatge de cada cadell) i es van aïllar els ulls amb ajuda de pinces i tisores de dissecció. Els ulls van ser submergits ràpidament en paraformaldehid (PFA) al 4% (diluït en tampó salí amb fosfat (PBS)) i incubats durant 1 h a 4°C o en gel. És important destacar que les mostres de la cua i els ulls d'un mateix animal han d'estar identificades i emparellades correctament. Un cop fixats, els ulls es van rentar amb PBS i es va procedir a l'aïllament de la retina. L'extracció de la retina es

va dur a terme amb l'ajuda d'un microscopi binocular i un kit instrumental de dissecció. En primer lloc, i prenent com a punt de suport el nervi òptic, cal fer una incisió a la superfície de l'ull, per on serà possible retirar la còrnia i el cristal·lí, donant llum a l'estructura de la retina. En aquest punt, només caldrà retirar les estructures hialoides i altres restes de teixits. Podem trobar els detalls del procediment a la **Figura 3.2**. Un cop aïllada, la retina va ser fixada de nou en PFA 4% durant 1h a 4°C. Transcorregut aquest temps, el teixit va ser rentat amb PBS i es va reservar a 4°C fins al moment de la tinció per immunofluorescència (IF).

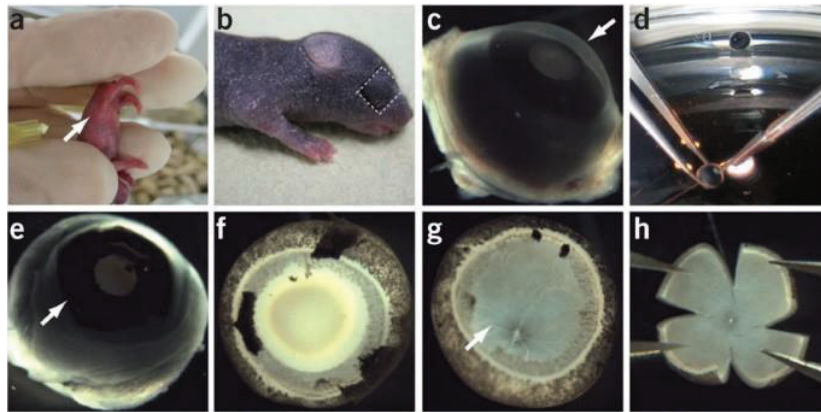


Figura 3.2. Injecció de 4-OHT i dissecció de l'ull i la retina postnatal. **A.** Injecció de 4-OHT en un cadell de ratolí postnatal P1. La fletxa ens indica l'àrea corresponent a l'estómac o lloc d'injecció. **B.** Imatge d'un ratolí P6, mostrant el lloc d'incisió per a l'aïllament de l'ull. **C.** Visió general del globus ocular, on la fletxa indica el lloc per a la incisió de la còrnia. **D.** Imatge de l'ull aïllat sobre una placa de petri. **E.** Imatge del globus ocular sense la còrnia. **F.** Imatge de l'ull després de retirar la corenosclera, els coroides, les capes de la còrnia, les capes pigmentades i l'iris. **G.** Imatge de la retina aïllada i sense el cristal·lí, on podem apreciar encara la presència de vasos hialoides a l'interior (indicats amb una fletxa). **H.** Imatge de la retina aïllada, amb quatre incisions radials per al seu muntatge. *Imatge de Pitulescu et al. 2010.*

2.3.2. Tinció de les retines per immunofluorescència

Per iniciar el protocol de tinció per immunofluorescència (IF), les retines van ser incubades durant almenys 6 h, en moviment constant, amb l'anomenat tampó de permeabilització/bloqueig. Aquest està compost per albúmina de sèrum boví (BSA) al 1% i Tritó X-100 al 0,3%, diluïts en PBS. Seguidament, els teixits van ser incubats amb els anticossos primaris corresponents, preparats a les concentracions adequades (detallades a la **Taula 3.6**) en tampó de permeabilització/bloqueig, i incubats en constant agitació durant tota la nit. Al dia següent, després de 3 rentats de 10 min amb tampó PBT (Tween-20 0,1% en PBS), les retines van ser incubades 30 min amb tampó Pblec (Tritó X-100 1%, CaCl_2 1mM, MgCl_2 1mM i MnCl_2 1mM, en PBS pH 6.8) a temperatura ambient i en moviment. El mateix tampó Pblec es va utilitzar aleshores per preparar les dilucions dels anticossos secundaris conjugats o IB4, d'acord amb les concentracions detallades a la **Taula 3.8**. Les mostres van ser incubades durant 2 h a temperatura ambient en

agitació. Cal apuntar que aquest pas del protocol també es pot dur a terme durant tota la nit a 4°C, el que podria optimitzar l'especificitat de la tinció en cas que fos necessari. A partir d'aquí, les mostres van ser mantingudes en fosc amb l'objectiu de preservar al màxim la immunofluorescència dels anticossos. Es van utilitzar tubs de 2 mL per totes les incubacions i es van fer servir un volum de 100 µL per cada 2-6 retines per a les incubacions amb anticòs. Van ser rentades 3 vegades durant 10 min amb PBT i van ser disseccionades per procedir al seu muntatge. La dissecció consisteix en fer 4-5 talls radials per tal de facilitar la disposició del teixit en una superfície plana. Un cop ben posicionada sobre un portaobjectes, la retina va ser recoberta amb medi de muntatge Immu-mount i un cobreobjectes.

2.4. Assaig de proliferació *in vivo*: incorporació i detecció d'EdU

5-etinil-2'-desoxiuridina (EdU) és un compost sintètic que actua com anàleg de la timidina, i per tant, s'intercala a l'ADN durant la fase S del cicle cel·lular. Basat en aquest principi, el *kit* Click-IT EdU permet la injecció d'EdU a l'animal, i la posterior detecció i visualització del compost. Aquest sistema és àmpliament utilitzat per a l'anàlisi de la proliferació cel·lular, i en aquest projecte ha estat emprat per determinar la proporció de cèl·lules proliferatives durant el desenvolupament vascular de la retina postnatal. Els cadells de ratolí van ser injectats intraperitonealment amb 60 µL del component A del *kit* (EdU), prèviament preparat amb DMSO a una concentració 10mM i diluït 10 vegades amb PBS per a la seva administració. Per a la seva detecció, les retines, ja aïllades i fixades, es van incubar amb el tampó de permeabilització/bloqueig durant 15 min a temperatura ambient i en moviment constant. Seguidament, les mostres van ser incubades 1h (a temperatura ambient en agitació) amb els reactius per a la seva detecció (tampó Click-IT EdU 1X, CuSO₄, Alexa Fluor 488 i additiu del tampó Click-IT EdU), d'acord amb les proporcions facilitades per el manual del *kit* (en un volum de 100 µL per cada 2 retines). Després de 2 rentats amb PBS, les retines van ser incubades tota la nit amb tampó de permeabilització/bloqueig, per tal de seguir amb el protocol d'immunofluorescència de la secció anterior (**secció 2.3.2**). Cal esmentar que l'assaig de proliferació amb EdU requereix de la posterior tinció amb ERG, un marcador nuclear endotelial que ens permet quantificar la quantitat de ECs en proliferació, i descartar per tant totes aquelles altres cèl·lules en divisió presents al mateix teixit. Donada la fluorescència per a la detecció de l'EdU, a partir d'aquest punt, les retines es van mantenir cobertes de la llum per preservar al màxim la tinció.

2.5. Microscòpia confocal

Per a la visualització i anàlisi de les retines de ratolí tenyides per IF es va utilitzar el microscopi confocal Leica TCS SP5. Les imatges van ser preses amb els objectius 10X i 40X (amb oli d'immersió), processades per a l'obtenció de les projeccions màximes (unificació de la màxima intensitat de les imatges obtingudes al llarg de l'eix Z o *z-stack*) amb Volocity i guardades en format *.TIF*. Per a la visualització, anàlisi i edició de les imatges es va fer servir ImageJ/Fiji, Adobe Photoshop 2021 i Adobe Illustrator 2021.

2.6. Anàlisi i quantificació de les imatges

Les imatges obtingudes per a la seva quantificació van ser processades i analitzades amb ImageJ/Fiji i Adobe Photoshop 2021. Totes les quantificacions estan basades en l'anàlisi de paràmetres objectius observats en 2-6 imatges 40X de cada retina, amb excepció de les quantificacions generals de localització i quantificació de les lesions vasculars, les quals s'han determinat a partir d'imatges 10X. En cada experiment s'han quantificat entre 3 i 12 retines per condició o genotip.

2.6.1. Localització i quantificació de les lesions vasculars

La identificació de les lesions vasculars i la seva localització s'ha realitzat a partir de l'observació de imatges 10X. Cada imatge mostra un dels pètals de la retina, on es va determinar el numero de lesions i es van classificar com a generalitzades o localitzades en funció del seu abast. Aquest anàlisi inicial de les imatges també permet determinar la localització de cada una de les lesions en artèria, vena o llit capil·lar (identificades en base a les seves característiques morfològiques). Es van quantificar dos pètals per cada retina, comparant animals mutants i control.

2.6.2. Àrea vascular: IB4

La tinció de les retines amb isolectina B4 (IB4) permet la clara identificació de les estructures vasculars. A partir d'imatges 10X o 40X, l'àrea vascular o vascularitat de la retina va ser quantificada ajustant el llindar de senyal positiu o *threshold* (**Figura 3.3 A**). Aquesta quantificació es va dur a terme en 3 àrees representatives de $10^4 \mu\text{m}^2$ per cada imatge 40X. La quantificació de dita àrea respecte al àrea total de la imatge ens proporciona un percentatge comparable entre grups mutants i control.

2.6.3. Localització i expansió de les cèl·lules recombinants GFP⁺

La quantificació de l'extensió i la localització de les cèl·lules recombinants es va dur a terme en animals portadors de l'al·lel mTmG. Aquest gen reporter ens permet quantificar tant l'àrea com la posició de les cèl·lules positives per GFP, i per tant, recombinants. En primer lloc, es va utilitzar el canal IB4 per dibuixar i seleccionar l'àrea del vas en qüestió (per exemple, en identificar una artèria, manualment podem dibuixar el contorn d'aquesta i guardar la selecció). En segon lloc, la selecció anterior es va aplicar sobre el canal GFP i es va descartar tota aquella senyal positiva fora de la selecció aplicada. En aquest punt, s'ajusta el *threshold* de GFP per quantificar l'àrea GFP⁺ dins del vas seleccionat (**Figura 3.3 B**). D'aquesta manera, podem determinar l'expansió de les cèl·lules recombinants en una zona o vas en concret, expressat com percentatge d'àrea GFP⁺ sobre el àrea total IB4⁺ (% àrea GFP⁺/IB4⁺). Aquesta quantificació s'ha dut a terme en almenys 2 imatges 40X per cada retina.

2.6.4. Quantificació i localització de cèl·lules iFlu-Mosaic-*Pik3ca*^{H1047R}

En utilitzar el model iFlu-Mosaic-*Pik3ca*^{H1047R}, la tinció de les proteïnes reporteres nuclears GFP i Cherry ens va permetre comptar el nombre de nuclis cel·lulars, equiparable al nombre de cèl·lules *Pik3ca*^{WT} o *Pik3ca*^{H1047R}. A més a més, gràcies a la gran resolució d'aquest model, també es va determinar la distribució de les cèl·lules reportades mitjançant la seva classificació d'acord amb posicions arterials, venoses o capil·lars. Aquestes quantificacions es van dur a terme en imatges 40X.

2.6.5. Amplitud del vas

La tinció amb IB4 permet visualitzar la superfície vascular en dues dimensions, pel que es va determinar la amplitud de cada vas a partir del traçat d'una línia perpendicular del conducte. Per cada vas, el diàmetre va ser mesurat a 3 alçades diferents del conducte per tal d'obtenir un valor mitjà més representatiu (**Figura 3.3 C**). La mesura del diàmetre relatiu dels vasos es va dur a terme en almenys 2 imatges 40X de cada retina i els valors obtinguts van ser mostrats d'acord a l'escala de la imatge (expressats en μm).

2.6.6. Número de nuclis endotelials: ERG

L'estimació del número de nuclis endotelials va ser calculat manualment a partir del comptatge d'estructures nucleiques tenyides amb ERG, un marcador nuclear específic de l'endoteli (**Figura 3.3 D**). La quantificació es va dur a terme en 3 seccions representatives de $10^4 \mu\text{m}^2$ de cada imatge 40X, per finalment, obtenir un valor mitjà. Almenys 3 imatges 40X van ser quantificades per cada retina.

2.6.7. Proliferació de cèl·lules endotelials: EdU o Ki67

L'anàlisi de la proliferació endotelial a les retines postnatales es va dur a terme mitjançant dues estratègies diferents. A partir de retines tenyides amb EdU i ERG, es va quantificar manualment el nombre de nuclis endotelials (ERG⁺) en proliferació (EdU⁺). De la mateixa manera, en altres experiments també es va utilitzar la tinció de Ki67 per detectar nuclis cel·lulars en proliferació. A diferència de l'EdU, Ki67 no és un agent intercalant de l'ADN, sinó que és una proteïna present al nucli durant totes les fases actives del cicle cel·lular (G1, S, G2 i mitosi). En ambdós casos, els valors resultants van ser obtinguts a partir de l'anàlisi de 3 àrees representatives de $10^4 \mu\text{m}^2$ (**Figura 3.3 E**) per cada imatge 40X, i expressats com a nombre absolut o percentatge de nuclis EdU⁺ERG⁺ o Ki67⁺ERG⁺ per l'àrea quantificada ($10^4 \mu\text{m}^2$). Almenys 3 imatges 40X per retina van ser quantificades.

2.6.8. Activació de la via PI3K: p-S6

La intensitat de la senyal de p-S6 es va fer servir com un indicador del nivell d'activació de la via PI3K, ja que S6 és un dels efectors fosforilat per AKT. La quantificació de p-S6 és una mesura a partir de la comparació de la intensitat de la tinció entre teixits mutants i control, pel que va ser representada com a valors relatius o *fold change*. Per aquest motiu, la quantificació de p-S6 es va dur a terme comparant sempre animals d'una

mateixa camada, processats i tenyits a la vegada. Amb aquest sistema es va intentar minimitzar la variabilitat associada a la quantificació de la intensitat de la tinció.

D'altra banda, p-S6 es va quantificar en dos contextos diferents: en àrees IB4⁺, o bé, en àrees GFP⁺IB4⁺ de vasos concrets. En ambdós casos, el sistema de quantificació es va basar en determinar el *threshold* de IB4 o GFP, per obtenir i seleccionar l'àrea positiva per aquests canals, i seguidament, aplicar aquesta àrea seleccionada sobre el canal p-S6. Un cop determinada l'àrea on volem quantificar la intensitat de p-S6, es va procedir a la quantificació automàtica de la intensitat mitjana (*integrated density*) del canal. A més a més, en la mateixa imatge, a partir d'un àrea no vascularitzada, es va mesurar el senyal no específic de la tinció (*mean grey value*), el qual va ser restat de la quantificació real de p-S6 (**Figura 3.3 F**). Entre 2 i 4 imatges 40X de cada retina van ser utilitzades per a la quantificació de l'activitat de PI3K.

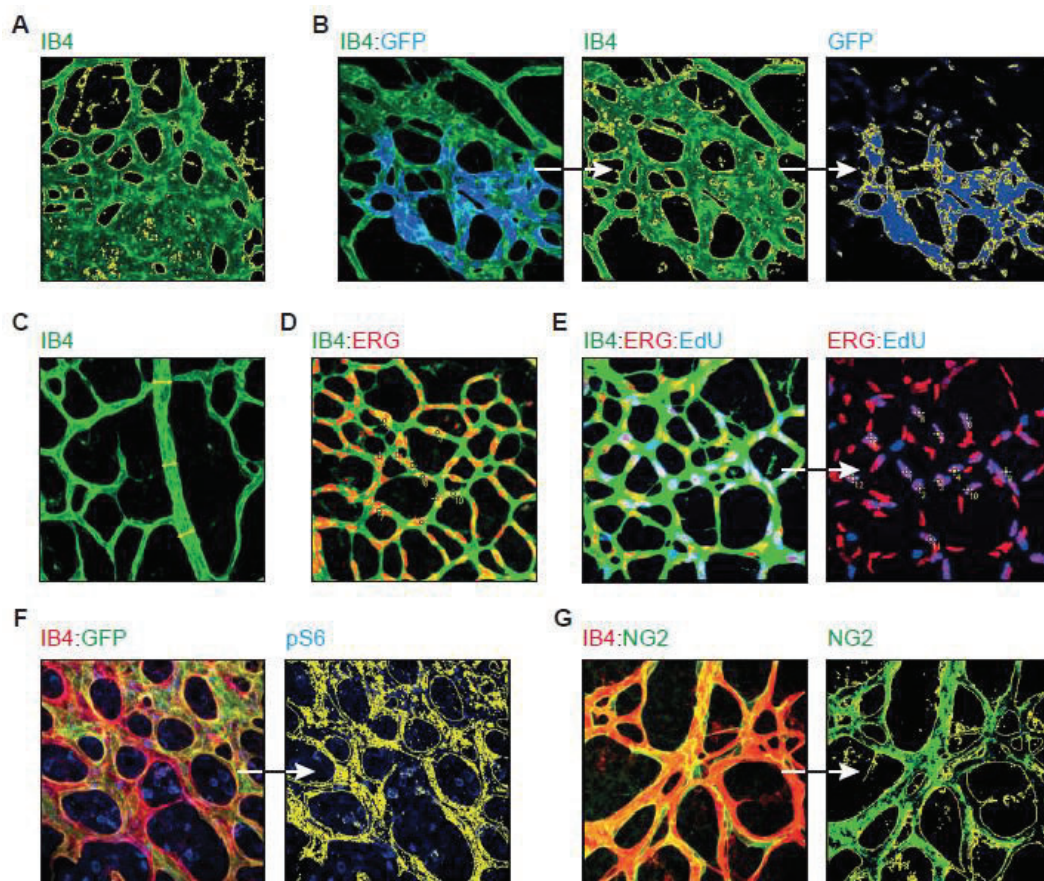


Figura 3.3. Representació dels procediments per a la quantificació de les imatges de la vasculatura de la retina. **A.** Quantificació de l'àrea IB4⁺. **B.** Quantificació de l'àrea GFP⁺ IB4⁺. **C.** Quantificació de l'amplitud del vas. **D.** Quantificació del nombre de nuclis endotelials ERG⁺. **E.** Quantificació del nombre de nuclis endotelials (ERG⁺) en proliferació (EdU⁺). **F.** Quantificació de la intensitat de p-S6 en un àrea concreta GFP⁺. **G.** Quantificació de la cobertura de NG2 sobre l'àrea IB4⁺. Les línies grogues representen les àrees seleccionades i considerades per a la quantificació. Totes les imatges es mostren de manera amplificada, a partir d'imatges 40X.

2.6.9. Cobertura dels vasos per pericits: NG2

La cobertura dels vasos per pericits es va quantificar a partir de les tincions amb NG2 i IB4, ajustant el *threshold* d'ambdues i seleccionant l'àrea positiva per a cada canal (**Figura 3.3 G**). A continuació, es va calcular la relació entre l'àrea seleccionada per NG2 i IB4 i es va presentar com al percentatge resultant (% àrea NG2⁺/IB4⁺). Almenys 3 imatges 40X de cada retina van ser analitzades.

3. Experiments *in vitro*

3.1. Aïllament i cultiu de cèl·lules endotelials murines de pulmó (mLECs)

Els experiments *in vitro* mostrats en aquesta tesi s'han realitzat en cèl·lules primàries endotelials aïllades del pulmó murí, també anomenades mLECs, a partir de ratolins *Pdgfb-CreER*^{T2}; *Pik3ca*^{H1047R/WT} (referits com EC-*Pik3ca*^{H1047R/WT}). Els reactius i medis utilitzats per al cultiu cel·lular es troben detallats a la **Taula 3.5**.

3.1.1. Dissecció del pulmó

Després del genotipatge i el deslletament dels ratolins, aquells amb el genotip desitjat van ser escollits per aïllar-ne les ECs (animals d'entre 3 i 6 setmanes). Els animals seleccionats van ser sacrificats per dislocació cervical. A partir d'aquí, es va procedir a la incisió i obertura de la caixa toràctica i l'aïllament dels pulmons. Aquest són fàcilment identificables ja que es troben situats darrere de les costelles i presenten un color rosa pàl·lid característic i diferent de la resta d'òrgans. Un cop extrets, els pulmons es van mantenir en tampó salí HBSS amb Penicil·lina/Estreptomicina (P/S) al 1%, a 4°C o en gel.

3.1.2. Digestió del teixit i selecció de les cèl·lules endotelials

Sota la campana de cultius cel·lulars, en condicions d'esterilitat, es va procedir a la digestió del teixit pulmonar. Els pulmons van ser traslladats a una placa de petri, on es va procedir a la digestió mecànica mitjançant la trituració i homogeneïtzació amb un bisturí. La pasta homogènia del teixit, es va transferir a un tub de 50 mL amb 5 mL de la solució de digestió (HBSS 1% P/S, dispassa II 4 U/mL) i es va incubar durant 1 h a 37°C. Durant la digestió, es va tractar un placa de cultius de 12 pous amb 0,5 mL de gelatina porcina al 0,5% (diluïda en dH₂O) per pou. Durant aquest temps, també es va preparar la solució de boles magnètiques o *dynabeads* (8 µL/pulmó). Aquestes van ser rentades entre 3 i 5 vegades amb 1 mL de PBS/BSA (PBS amb 0,5% de BSA), amb l'ajuda d'una gradeta imantada. En l'últim rentat, les *dynabeads* van ser resuspeses en tan sols 8 µL/pulmó de PBS/BSA, als que se'ls hi va afegir 1,25 µL d'anticòs anti-CD144 (anti-Ve-cadherin) per pulmó processat. Aquesta mescla va ser incubada a temperatura ambient durant 30 min-1 h.

Un cop digerit, el teixit va ser pipetejat intensament fins aconseguir la seva disgregació i obtenir una suspensió cel·lular. Aquesta es va filtrar per porus de 40 µm i es va barrejar

amb 10 mL de DMEM complet (amb FBS inactivat al 10% i P/S al 1%) per tal d'aturar l'acció enzimàtica de la dispassa. Després de 2 centrifugacions (5 min, 1200rpm) i la resuspensió del pellet en 5 mL de PBS/BSA, la suspensió cel·lular va ser centrifugada un últim cop, i el pellet resultant va ser resuspès en 100 µL de PBS/BSA. En paral·lel, la solució de les *dynabeads* amb CD144 també va ser resuspesa en 100 µL de PBS/BSA. La suspensió cel·lular i les *dynabeads*-CD144 van ser barrejades i incubades durant 1 h a temperatura ambient. Transcorregut aquest temps, la mostra va ser resuspesa en 1 mL de PBS/BSA i, amb l'ajuda de la gradeta imantada, es va separar el sobrenedant de les *dynabeads*-CD144 unides a les ECs. Aquest pas es va repetir 2 vegades més (rentant amb 1 mL de PBS), fins a obtenir una suspensió d'ECs suficientment pura, la qual va ser resuspesa en 1 mL de medi F12 complet (suplementat amb FBS inactivat al 20% i P/S al 1%) i plaquejada a la paca de 12 pous, prèviament tractada amb gelatina.

3.1.3. Purificació del cultiu endotelial

El cultiu d'ECs va ser refrescat amb medi F12 complet cada 2-3 dies. Habitualment, passada una setmana, el cultiu s'ha expandit i arriba a la seva confluència. És en aquest moment que cal dur a terme una segona selecció per tal de purificar el cultiu i evitar el creixement d'altres tipus cel·lulars. Per fer-ho, es van preparar i incubar les *dynabeads* amb l'anticòs CD144 (seguint el mateix protocol anterior). Les *dynabeads*, unides a l'anticòs, es van resuspendre en 0,5 mL de PBS, i després de retirar el medi, es van afegir sobre el cultiu i es van incubar durant 30-45 min a temperatura ambient. A continuació, es va retirar el sobrenedant del pou i les cèl·lules van ser tripsinitzades (afegint 0,5 mL de tripsina sobre el cultiu i incubant 5 min a 37°C) i recollides en DMEM complet. La suspensió cel·lular resultant va ser centrifugada (5 min, 1200rpm) i el pellet va ser resuspès en 1,5 mL de F12 complet per, finalment, ser plaquejat en un pou d'una placa de 6 pous (prèviament tractada amb gelatina porcina 0,5%).

3.1.4. Manteniment i expansió del cultiu endotelial

El cultiu endotelial es va mantenir a 37°C en incubadors amb un 5% de CO₂, canviant el medi cada 2-3 dies. Per a l'expansió del cultiu, les cèl·lules van ser tripsinitzades (rentades amb PBS i incubades amb 0,5 mL de tripsina 5 min a 37°C) i recollides en 1 mL de DMEM complet. Després de la centrifugació, el pellet va ser resuspès en F12 complet i sembrat en una proporció 1 a 3 en plaques prèviament tractades amb gelatina porcina al 0,5%. Ja que es tracta d'un cultiu primari, aquestes cèl·lules van ser utilitzades duran els primers 6 passatges. Més enllà, el cultiu comença a perdre la seva morfologia característica i les cèl·lules comencen a adoptar trets senescents.

3.1.5. Criopreservació del cultiu endotelial

mLECs establertes en cultiu a passatges molt primerencs (idealment després de la segona expansió) van ser criopreservades i emmagatzemades en nitrogen líquid (N₂). Per fer-ho, un pou d'una placa de 6 pous va ser tripsinitzat, centrifugat i resuspès en FBS inactivat i DMSO al 10%. Aquesta suspensió va ser congelada a -80°C en criotubs, per al cap d'uns dies, ser transferida a un tanc de N₂.

Per a la descongelació i ús d'aquestes cèl·lules, els vials congelats van ser ràpidament submergits en un bany a 37°C. Abans de la completa descongelació de la solució, aquesta va ser homogeneïtzada amb 2 mL de DMEM complet i transferida a un tub de 15 mL, que es va centrifugar 5 min a 1200rpm. El pellet de cèl·lules aleshores va ser resuspès en 1,5 mL de F12 complet i sembrat en 1 pou d'una placa de 6 pous. En aquesta cas és important canviar el medi 24 h després de la descongelació, per tal de retirar totes aquelles restes cel·lulars que no s'han adherit a la placa i facilitar la supervivència de la resta de cèl·lules vives.

3.2. Inducció de l'activitat Cre *in vitro*

Les mLECs van ser tractades amb 4-OHT 2mM (preparat a partir de 4-OHT 10mM, diluït en F12 complet) durant 6 h. En paral·lel, es van tractar cèl·lules amb etanol (vehicle) en la mateixa proporció, les quals van ser utilitzades com a control *wild type* (mateix genotip, no recombinants). Després del tractament, les cèl·lules van ser tripsinitzades i re-plaquejades per a l'experiment en qüestió.

3.3. Tractaments farmacològics *in vitro*

3.3.1. Inhibició de p110 α : BYL719 (Alpelisib)

BYL719 (**Taula 3.4**), més conegut com Alpelisib, és un inhibidor específic de la isoforma p110 α . Per a la seva administració es va utilitzar un *stock* de BYL719 10mM (diluït en DMSO i emmagatzemant a -20°C), el qual es va diluït en medi F12 complet fins a la concentració de treball desitjada. Com a control, es van incloure cèl·lules tractades amb vehicle (DMSO) a la concentració de la dosi més alta (5 μ M). BYL719 va ser utilitzat per determinar la senyalització de PI3K i el perfil d'expressió genètica de les mLECs EC-*Pik3ca*^{H1047R/WT}. Per fer-ho es van tractar les cèl·lules amb dosis de BYL719 0,2, 1 i 5 μ M.

3.3.2. Inhibició de la síntesi de glutatió: BSO

L'inhibidor BSO (L-buthionine-sulfoximine) (**Taula 3.4**) és un inhibidor de la síntesi de glutatió que actua sobre l'enzim glutamat-cisteïna lligasa (GCL), responsable de la transformació del glutamat a γ -glutamilcisteïna, el compost precedent (anterior a la incorporació de la glicina) al glutatió reduït (GSH). En els assajos MTS, l'inhibidor BSO va ser administrat a diferents concentracions (0,03, 0,1, 0,3, 1, 3, 10, 50, 100 i 150 μ M), totes elles preparades en medi F12 complet a partir de l'*stock* 100mM (diluït en H₂O i emmagatzemat a -80°C). Com a control, l'experiment va incloure mostres tractades amb vehicle (H₂O) en proporció a la concentració de BSO més alta (150 μ M).

3.4. Assaig de viabilitat cel·lular MTS

L'assaig MTS és un assaig colorimètric utilitzat per determinar la viabilitat cel·lular en vers a l'exposició a una escala de dosis de l'inhibidor BSO. El principi en que es basa aquest experiment és el reactiu MTS *tetrazolium*, el qual és metabolitzat i reduït per les

cèl·lules viables, generant *forzaman* amb color. Aquest assaig colorimètric es va dur a terme en una placa de 96 pous (tractats prèviament amb gelatina porcina al 0,5%). Es van sembrar 1500 mLECs (EC-*Pik3ca*^{H1047R/WT}, prèviament induïdes amb 4-OHT o etanol) per pou, en un volum total de 200 µL de medi. Després del seu cultiu durant 24h, es va canviar el medi per iniciar el tractament farmacològic. Transcorregudes 72 h de tractament, es van afegir 20 µL de reactiu MTS per cada pou, i es van incubar les plaques durant 2 h a 37°C amb un 5% de CO₂. Passat aquest temps, es va mesurar l'absorbància a 490nm de cada un dels pous com a valor relatiu de la viabilitat cel·lular. L'assaig inclou un temps 0, on a l'inici de l'experiment (abans d'afegir el tractament), s'afegeix el reactiu MTS (20 µL/pou), s'incuba 2 h i es mesura l'absorbància per determinar la viabilitat cel·lular inicial. Aquest valor inicial serveix com a referència per determinar diferències en la viabilitat cel·lular després dels diferents tractaments i relativitzar possibles diferències inicials en el nombre de cèl·lules sembrades a cada pou. Per cada una de les rèpliques biològiques (3 per experiment) es van incloure 6 replicats tècnics per a cada condició (genotip, inhibidors i dosis). Les dades dels experiments es van representar en funció del logaritme de la concentració de l'inhibidor BSO.

3.5. Anàlisi de l'expressió gènica: PCR quantitativa

3.5.1. Extracció d'ARN

Les cèl·lules destinades a l'anàlisi de l'expressió gènica van ser rentades amb PBS a 4°C i emmagatzemades a -80°C fins al moment de l'extracció de l'ARN. El contingut d'ARN cel·lular va ser aïllat mitjançant l'ús de dos *kits* diferents: el *kit* RNeasy Plus o el *kit* Maxwell® RSC simplyRNA Cells, en tots dos casos seguint les instruccions dels fabricants. La concentració i la qualitat de l'ARN va ser mesurada amb l'espectròmetre NanoDrop ONE. A partir dels valors obtinguts, es van preparar dilucions amb 0,5 µg d'ARN en 10 µL d'H₂O.

3.5.2. Síntesi de cADN

Per a la síntesi de cADN es va utilitzar el *kit High Capacity cDNA Reverse*, basat en la retrotranscripció de l'ARN a cADN (RT-PCR), seguint les instruccions facilitades per la casa proveïdora. En el processament de les mostres es van incloure els controls negatius pertinents: una reacció sense mostra d'ARN i una mostra sense enzim retrotranscriptasa. La reacció va resultar en l'obtenció de 0,5 µg de cADN per cada una de les mostres.

3.5.3. PCR quantitativa (qPCR)

La PCR quantitativa (qPCR) es va dur a terme amb el *kit* LighCycler 480 SYBR Green I Master. El cADN obtingut va ser diluït 10 vegades en H₂O lliure d'ARNases i el tampó groc facilitat per el *kit*. La qPCR es va dur a terme en una placa de 384 pous seguint les indicacions del *kit* i incloent un últim control entre les mostres testades; una mostra sense cADN. Com a gen de referència o *house keeping* vam utilitzar *ml32*, una proteïna ribosòmica expressada de manera estable a les cèl·lules de ratolí. Totes les seqüències equivalents als primers utilitzats a les qPCR realitzades en aquesta tesi es troben detallades a la **Taula 3.10**.

3.6. Estudi de la senyalització cel·lular: immunodetecció proteica

3.6.1. Extracció i quantificació proteica

Les cèl·lules, en plaques que 6 pous, van ser rentades amb PBS a 4°C i guardades a -80°C fins al moment de l'extracció. Cada uns dels pous va ser lisat amb 80 µL de tampó de lisi (Tris-HCl pH 7.4 50mM, EDTA 5mM, NaCl 150mM i Tritó X-100 al 1%) suplementat amb inhibidors de proteases i fosfatases durant 15 minuts sobre gel. La lisi cel·lular va ser recollida en tubs *eppendorf* d'1,5 mL i centrifugada a màxima potència durant 10 min a 4 °C. El sobrenedant resultant va ser transferit a nous tubs i analitzat per a la seva quantificació. Per determinar el contingut proteic de cada mostra es va utilitzar el *kit Pierce BCA Protein Assay*, seguint les instruccions marcades per el fabricant.

3.6.2. Separació de proteïnes i immunodetecció

Per a la immunodetecció proteica (també anomenada *Western blot*), el contingut total de proteïnes cel·lulars va ser separat per mida en gels de poliacrilamida al 10%, mitjançant l'electroforesi amb tampó de càrrega electroforètica (Tris 25mM, glicina 192mM, SDS 1.7mM) a 130 volts. Seguidament, les proteïnes del gel van ser transferides a membranes de nitrocel·lulosa a partir del contacte físic entre el gel i la membrana en tampó de transferència (glicina 192mM, Tris 25mM, pH8.3) i una corrent constant de 75 volts durant 1,5 h a 4°C.

Les proteïnes, ara a la membrana, van ser bloquejades amb llet al 5% en TBS-T (PBS amb Tween-20 al 1%) durant 30 min a temperatura ambient i en agitació. Després de 3 rentats amb TBS-T, les membranes van ser tallades, d'acord amb la mida de les proteïnes a detectar (gràcies a l'ajuda dels marcadors de pes molecular també carregats al gel). Aleshores, van ser incubades amb l'anticòs primari pertinent (**Taula 3.6**), preparat en TBS amb BSA al 2% i acida 1/1000. La incubació es va dur a terme en rotació constant, a 4 °C, durant tota la nit. Al dia següent, les membranes van ser rentades 3 vegades amb TBS-T i incubades durant 2 h a temperatura ambient amb l'anticòs secundari conjugat amb peroxidasa HRP (**Taula 3.7**) (preparat en llet al 5%, diluïda en TBS-T). A continuació, es van tornar a rentar 3 vegades amb TBS-T i es va procedir al revelat de la immunodetecció. Per fer-ho, les membranes van ser incubades durant 1-2 min amb solució ECL (Tris 0,1 M pH 9.35, luminol 2.2mM, àcid coumaric 2.2mM i H₂O₂ al 0,06%), cobertes de la llum. La reacció de l'ECL amb els anticossos secundaris conjugats va permetre la detecció de la quimioluminescència generada pel luminol, un senyal equivalent a la quantitat de proteïna present a la membrana.

3.7. Estudi del metabolisme cel·lular: anàlisi metabòlic

3.7.1. Extracció dels metabòlits

Les cèl·lules mLECs, provinents de 4 mascles adults (4 setmanes) *EC-Pik3ca^{H1047R/WT}* van ser tractades amb 4-OHT o etanol en una placa de 6 pous durant 6 h (en confluència), i tripsinitzades i re-plaquejades per al seu anàlisi metabòlic. 48 h després de la inducció, amb una confluència entre el 60 i el 80%, es va procedir a l'extracció dels metabòlits intracel·lulars. Per començar, es va retirar exhaustivament tot el medi de les

plaques, les quals van ser depositades immediatament sobre gel sec. Cada pou va ser recobert amb la solució d'extracció (1 mL de metanol gelat al 80%, diluït en H₂O HPLC) i incubat a -80°C durant 15 min per tal d'assegurar la inactivitat enzimàtica. Transcorregut aquest temps, les plaques van ser disposades sobre gel sec i les cèl·lules van ser rascades i recollides en un tub *ependorf* d'1,5 mL. Les mostres es van centrifugar a 20.000 rcf durant 10 min a 4°C, i es va transferir el sobrenedant a 2 nous tubs de 1,5 mL (0,45 mL per tub; un d'ells va ser la mostra a analitzar, i el segon va ser utilitzat com a replicat de seguretat). Finalment, les mostres van ser sotmeses a una centrifugació al buit (màxima potència, temperatura ambient) durant 2 h que va permetre l'evaporació del metanol i la concentració dels metabòlits, donant lloc a un petit pellet sec. Vam analitzar 3 replicats tècnics i 4 rèpliques biològiques (incloent per a cada una el pertinent control *wt*, tractat amb etanol).

3.7.2. Anàlisi metabolòmic

Després de l'extracció, les mostres van ser preparades i enviades a -80°C al laboratori del doctor Jason Locasale (Duke University, Durham, EEUU), on van ser analitzades per cromatografia líquida-espectrometria de masses (LC-MS), incloent la detecció i mesura d'un ampli ventall de metabòlits (al voltant de 1000). L'anàlisi bioinformàtic posterior va determinar els metabòlits diferencialment representat en les mostres *Pik3ca*^{H1047R/WT} respecte als controls *wt*.

3.8. Anàlisi del cicle cel·lular per citometria de flux

Les cèl·lules provinents d'animals EC-*Pik3ca*^{H1047R/WT} van ser induïdes amb 4-OHT o etanol i cultivades amb medi F12 complet (amb FBS inactivat al 20%) o amb F12 sense FBS. Després de 24 h, les cèl·lules van ser tripsinitzades i resuspeses per a l'anàlisi del cicle cel·lular. Es van recollir 10⁶ cèl·lules per condició, que es van rentar amb PBS i es van fixar afegint, gota a gota, 0,9 mL d'etanol gelat al 70% mentre s'agitava suaument la suspensió cel·lular. Les cèl·lules fixades es van emmagatzemar 24 h a -20°C. Al dia següent, les cèl·lules es van centrifugar a 1600rpm durant 5 min i es van rentar amb PBS. El pellet cel·lular es va tenyir durant 30 min a temperatura ambient amb la solució de tinció *FxCycle PI/RNase* (0,5 mL per mostra). Aquesta tinció permet la detecció del contingut d'ADN cel·lular mitjançant la intercalació de iodur de propidi entre les bases nitrogenades. Aquest compost també s'uneix a l'ARN, pel que el *kit* inclou RNAasa per evitar la detecció d'aquest. La tinció cel·lular va ser avaluada mitjançant citometria de flux (BD FACS Canto TM II) i les dades van ser analitzades amb el programa FlowJoTM v10.8.0.

4. Anàlisi estadístic

Els anàlisis estadístics presents en aquesta tesi es va realitzar mitjançant l'aplicació del test no paramètric de Mann Whitney, utilitzant Prism 9 (GraphPad Software Inc.). Totes les gràfiques es mostren amb els punts equivalents a valors individuals de cada rèplica biològica i mostren barres d'error d'acord amb l'error estàndard de la mitjana (s.e.m.).

Els valors de p considerats estadísticament significatius van ser els següents: *p < 0,05; **p < 0,01 i ***p < 0,0001.

5. Taules de reactius

Reactiu	Referència	Casa comercial
4-OHT	H7905	Merck
Àcid coumaric	C9008	Sigma-Aldrich
Acrilamida	161-0156	Bio-Rad
Agarosa	V2111	Promega
Bromur d'etidi	E1510	Merk
BSA	A7030-100G	Sigma-Aldrich
DAPI	S33025	Invitrogen
dNTPs	733-1363	ThermoFisher Scientific
EDTA	E5134	Sigma-Aldrich
etanol pur	64-17-5	Merk
Glicina	G7126	Sigma-Aldrich
H ₂ O HPLC	270733	Sigma-Aldrich
HP-β-CD	H107	Sigma-Aldrich
Inhibidors fosfatases (PhosSTOP™)	4906845001	Roche
Inhibidors proteases (cOmplete™, Mini Protease Inhibitor Cocktail)	11836153001	Roche
Kit Click-iT® EdU Alexa Fluor® 647	C10340	Invitrogen
Kit FxCycle PI/Rnase staining	F10797	Invitrogen
Kit High Capacity cDNA Reverse Transcription	4368814	Applied biosystems
Kit LighCycler 480 SYBR Green I Master	4.707.516.001	Roche
Kit Maxwell® RSC simplyRNA Cells	AS1390	Promega
Kit MTS assay	ab197010	Abcam
Kit RNeasy Plus Mini	50974134	Qiagen
Luminol	123072	Sigma-Aldrich
Membranes nitrocel·lulosa BioTrace™ NT	732-3031	Pall Life Sciences
Metanol HPLC	34860	Sigma-Aldrich
NaOH	10396240	ThermoFisher Scientific
Nuclease-free H ₂ O	AM9937	Invitrogen
PFA	158127	Sigma-Aldrich
Pierce BCA Protein Assay kit	23225	Pierce
Polimerasa Biotaq	733-1302	VWR International Eurolab
Polimerasa Titanium Taq	639208	Clontech
SDS	L3771-100G	Sigma-Aldrich
Shandon™ Immu-mount™	10622689	ThermoFisher Scientific
SYBR™ Safe DNA Gel Stain	S33102	Invitrogen
Tampó 10X Bio Taq sense Mg ²⁺	733-1302	VWR International Eurolab
Tampó 10X Titanium Taq	639142	Clontech
Tritó X-100	T9284	Sigma-Aldrich
Trizima Base	T6066	Sigma-Aldrich
Tween-20	P1379	Sigma-Aldrich

Taula 3.3. Reactius i kits comuns

Inhibidor	Referència	Casa comercial
CIA1	AOB11404	Aobius
BYL719 (Alpelisib)	S2814	Selleckchem
BSO	B2515	Sigma

Taula 3.4. Inhibidors

Reactiu	Referència	Casa comercial
BSA 30%	A0296	Labclinics
DMEM	41965-039	Gibco
DMEM F12	21041-025	Gibco
Endothelial Cell growth medium 2	C-22111	Promocell
Dispasa II	4942078001	Roche Diagnostics
Dynabeads sheep a-Rat IgG	110-35	Invitrogen
FBS	10270106	Gibco
Gelatina porcina	G1890	Sigma-Aldrich
HBSS	14170-112	Gibco
P/S (Penicilina/Estreptomicina)	15140-122	Gibco
PBS	D8537	Sigma-Aldrich
Rat anti-mouse CD144	555289	BD Pharmingen
Tripsina	15400054	Gibco

Taula 3.5. Medis i reactius per al cultiu cel·lular

Anticòs	Referència	Casa comercial	Espècie	Dilució
ERG	AB92513	Abcam	Rabbit	1/300 (IF)
ERG-Alexa Fluor 647	AB196149	Abcam	Rabbit	1/200 (IF)
GFP	AB13970	Abcam	Chicken	1/100 (IF)
GFP	R1091P	Origene	Goat	1/500 (IF)
GFP-Alexa Fluor 488	A-21311	Invitrogen	Rabbit	1/300 (IF)
Ki67	14-5698-82	Invitrogen	Rat	1/200 (IF)
NG2	AB5320	Millipore	Rabbit	1/200 (IF)
RFP-CF594	20422	BIOTIUM	Rabbit	1/300 (IF)
pAKT Ser473	4060	Cell Signalling Tech.	Rabbit	1/1000 (WB)
pS6 Ser235/236	4857	Cell Signalling Tech.	Rabbit	1/1000 (WB); 1/100 (IF)
t-AKT	9272	Cell Signalling Tech.	Rabbit	1/2000 (WB)
t-S6	2212	Cell Signalling Tech.	Rabbit	1/1000 (WB)
Ve-Cadherin	sc-6458	Santa Cruz Biotech.	Goat	1/500 (WB)
Vinculin	9131	Sigma-Aldrich	Mouse	1/10000 (WB)
α SMA-Cy3	C6198	Sigma-Aldrich	Mouse	1/200 (IF)
β -Actin	AB49900	Abcam	Mouse	1/10000 (WB)

Taula 3.6. Anticòssos primaris

Anticòs	Referència	Casa comercial	Espècie	Dilució
anti-mouse	P0260	DAKO	Rabbit	1/5000 (WB)
anti-rabbit	P0399	DAKO	Swine	1/5000 (WB)
anti-goat	P0449	DAKO	Rabbit	1/5000 (WB)
anti-rat	P0450	DAKO	Rabbit	1/5000 (WB)

Taula 3.7. Anticossos secundaris per a la immunodetecció proteica

Anticòs	Referència	Casa comercial	Espècie	Dilució
anti-mouse Alexa Fluor 568 ®	A11004	Invitrogen	Goat	1/300 (IF)
anti-mouse Alexa Fluor 488 ®	A11001	Invitrogen	Goat	1/300 (IF)
anti-chicken Alexa Fluor 488 ®	A11008	Invitrogen	Goat	1/300 (IF)
anti-goat Alexa Fluor 568 ®	A11057	Invitrogen	Donkey	1/300 (IF)
anti-rabbit Alexa Fluor 647 ®	A31573	Life Tech	Donkey	1/300 (IF)
anti-rabbit Alexa Fluor 568 ®	A10042	Invitrogen	Goat	1/300 (IF)
anti-rabbit Alexa Fluor 405 ®	A31556	Life Tech	Goat	1/300 (IF)
anti-rat Alexa Fluor 633 ®	A21094	Invitrogen	Donkey	1/300 (IF)
Isolectin GS-IB4 Alexa-647 ®	I32450	Invitrogen	-	1/300 (IF)
Isolectin GS-IB4 Alexa-568 ®	I21412	Invitrogen	-	1/300 (IF)
anti-streptavidin 405	S32351	Life Tech	-	1/300 (IF)

Taula 3.8. Anticossos secundaris per a la tinció per immunofluorescència

Materials/equips	Referència	Casa comercial
Bisturí quirúrgic	211	Swann Morton
Cobreobjectes 50 x 24 mm	101222	Marienfeld
Cobreobjectes 15mm diàmetre	631-1579	VWR International Eurolab
Eppendorf 1,5 mL	390690	ClearLine
Eppendorf 2 mL	72.695.500	Sarstedt
Filtres 40m (40um Cell Strainers Blue)	352340	Falcon
Microtissors de dissecció	15000-10	Fine Science Tools
Pinces de dissecció corbades	1001592	ThermoFisher Scientific
Pinces de dissecció per l'aïllament de retines	11251-10	Fine Science Tools
Pinces de dissecció rectes	1631	ThermoFisher Scientific
Plaques de 12 pous	3513	CORNING
MicroAmp® Optical 384-Well Reaction Plate	4309849	Applied biosystems
Plaques 12 pous	153513	Cultek
Plaques 6 pous	833.920	Sarstedt
Plaques 96 pous	353072	Falcon
Plaques de petri 150mm x 25mm	CLS430599	Corning
Portaobjectes	1000200	Marienfeld
Tissors de dissecció	NC1832126	ThermoFisher Scientific
Tubs 15 mL	430791	Corning

Tubs 50mL	62.547.254	Sarstedt
Criotubs	363401	Nunc
Xeringa Hamilton®	21325U	Sigma-Aldrich

Taula 3.9. Materials i altres equips

Gen	Proteïna	Seqüència dels primers (5'-3')
<i>ml32</i>	MRPL32	FW: ACCCCAGAGGCATTGACAAC RV: ATTGTGGACCAGGAACTTGC
<i>Gpx8</i>	GPx	FW: GTTCGGGCCCTATCACTTCA RV: GGTCTGATGGCTTCAAGGGG
<i>Ggct</i>	GGCT	FW: TCCGACGAAATGGAAGACATCA RV: CATCACCCTTGCACATGCC
<i>Mgst1</i>	GST	FW: GATGTTTCATGAGCTCTGCGA RV: TCTTGGCATTCTCTCCCTTG
<i>Slc16a10</i>	SL16A10	FW: TCCGACGAAATGGAAGACATCA RV: CATCACCCTTGCACATGCC
<i>Slc1a5</i>	SLC1A5	FW: GCAGTGCACCAACCAAAGAG RV: TGGATACAGGATTGCGGTATTT
<i>Gls</i>	GLS1	FW: GTGACCCTCACTACCTGCAC RV: AGCAACATAGCAACAGGGCT
<i>Nr2f2</i>	COUP-TFII	FW: GCAAGTGGAGAAGCTCAAGG RV: TTCCAAAGCACACTGGGACT
<i>Ephb4</i>	EPHB4	FW: CTGGATGGAGAACCCCTACA RV: CCAGGTAGAAGCCAGCTTTG
<i>Cxcr4</i>	CXCR4	FW: TCCTCCTGACTATACCTGACTTCATCT RV: CCTGTCATCCCCCTGACTGAT

Taula 3.10. Primers per a l'anàlisi de l'expressió gènica per qPCR

RESULTATS

El descobriment de mutacions activadores a la via PI3K com a causa comú de les malformacions venoses va marcar un abans i un després en la comprensió d'aquest tipus de patologies. Aquest projecte parteix de resultats previs, publicats per les directores de la present tesi, on es descriu la mutació H1047R al gen *PIK3CA* com a causa de la hiperplàsia endotelial i les anomalies venoses. Es va demostrar que l'expressió de la mutació en heterozigosi de manera mosaica durant etapes primerenques del desenvolupament embrionari, dona lloc al naixement de ratolins amb evidents malformacions vasculars al llarg de l'organisme. Donada la implicació vascular en les lesions observades i, per tant, el possible rol de la EC en el desenvolupament de les malformacions, l'expressió de *Pik3ca*^{H1047R} específicament a l'endoteli va corroborar el fenotip observat, desenvolupant una hiperplàsia vascular dramàtica, la qual va ser correlacionada amb un notori increment de la proliferació endotelial (256).

Altres resultats generats prèviament al nostre laboratori van confirmar que la senyalització de PI3K en mLECs *EC-Pik3ca*^{H1047R/WT} es veu significativament incrementada 24 h després de la seva inducció amb 4-OHT. L'increment dels nivells d'AKT fosforilat (Ser473) a les cèl·lules mutants en comparació amb el pertinent control *wt* (cèl·lules no induïdes, tractades amb etanol), prova la ràpida i robusta sobreactivació de la via després de l'expressió de la mutació. D'altra banda, l'anàlisi transcriptòmic d'aquestes mateixes cèl·lules mitjançant la seqüenciació de l'ARN de 4 replicats biològics *EC-Pik3ca*^{H1047R/WT} i els respectius controls, va donar lloc al descobriment d'un ampli perfil d'expressió diferencial, amb un augment remarcable dels gens associats a la divisió cel·lular, la mitosi i la progressió del cicle cel·lular (276). Els resultats d'aquest anàlisi transcripcional seran utilitzats en diversos punts al llarg de la tesi.

1. Objectiu 1: Generar un model de malformacions vasculars mitjançant l'expressió postnatal de *Pik3ca*^{H1047R} en la vasculatura de la retina de ratolí, considerant el moment d'expressió de la mutació com a element catalitzador.

1.1. Els factors de creixement potencien la sobreactivació de PI3K i la proliferació de les ECs *Pik3ca*^{H1047R}.

Ha estat provat que *Pik3ca*^{H1047R} provoca la hiperproliferació de les ECs, però els mecanismes rere aquest procés encara són desconeguts. Per avaluar la rellevància biològica del programa molecular proliferatiu desencadenat per l'expressió de *Pik3ca*^{H1047R} vam utilitzar les ECs primàries mLECs, derivades d'animals *EC-Pik3ca*^{H1047R/WT} (Figura 4.1).

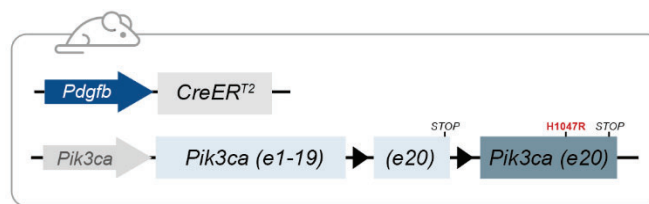


Figura 4.1. Model EC-*Pik3ca*^{H1047R/WT}. A partir de l'administració de 4-OHT, la recombinasa CreER^{T2} es transloca al nucli per recombinar l'exó 20 wt en un dels al·lels de *Pik3ca*, donant lloc a l'expressió de l'exó 20 portador de la mutació activadora H1047R. La modificació genètica tindrà lloc a les ECs donat el control de Cre per el promotor de *Pdgfb*.

Amb l'objectiu de valorar l'impacte dels estímuls extracel·lulars sobre el fenotip de les cèl·lules mutants vam comparar la senyalització de PI3K de cultius cel·lulars exposats durant 30 minuts a medi no suplementat amb FBS o medi amb FBS al 20%. La presència o absència del conjunt de factors de creixement presents en el medi va determinar, en certa manera, el grau de sobreactivació de la via PI3K. La sobreactivació d'AKT (Ser 473) va resultar evident en les cèl·lules *Pik3ca*^{H1047R} (tractades amb 4-OHT) independentment de la presència de factors de creixement al medi. Tant mateix, els nivells de fosforilació de S6 (p-S6 Ser 235/236), un efector posterior de la via PI3K, si van demostrar diferències d'acord amb la composició del medi. Mentre els nivells de p-S6 són pràcticament inapreciables en absència de FBS, S6 augmenta notòriament la seva fosforilació després de l'estimulació amb FBS, tant a cèl·lules mutants com als controls wt (**Figura 4.2**). Si bé és cert, S6 no és exclusivament activat per l'acció de PI3K, sinó que altres cascades de senyalització prenen part en el seu control i podrien estar responnent a l'estímul extracel·lular del medi. Tant mateix, l'increment en p-S6 és superior sota l'expressió de *Pik3ca*^{H1047R}, el que suggereix que la sobreactivació genètica de l'eix de senyalització de PI3K/AKT/mTOR manté certa dependència en l'estimulació extracel·lular de la via.

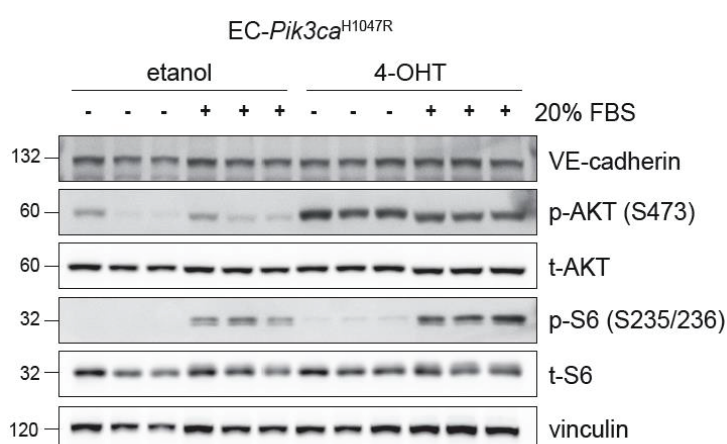


Figura 4.2. La sobreactivació de PI3K derivada de l'expressió *Pik3ca*^{H1047R} és potenciada en presència de factors de creixement extracel·lulars. Immunodetecció dels nivells de fosforilació de les proteïnes efectores de la via PI3K (AKT i S6) després de l'exposició durant 30 min a medi privat de FBS o amb FBS al 20%, comparant ECs *Pik3ca*^{H1047R} (tractades amb 4-OHT) i *Pik3ca*^{WT} (tractades amb etanol). Els nivells totals de les proteïnes fosforilades, així com els nivells de VE-Cadherin i vinculin són mostrades com a controls de càrrega. n = 3.

Sota aquestes mateixa premissa, i amb l'objectiu de avaluar l'impacte de l'estimulació extrínseca sobre el comportament fisiològic de la cèl·lula mutant, mLECs *Pik3ca*^{WT} i *Pik3ca*^{H1047R/WT} van ser induïdes i cultivades durant 24 h amb o sense FBS (20%). Després de la seva fixació i tinció, les mostres es van sotmetre a l'anàlisi del cycle cel·lular per citometria de flux. Aquest experiment va revelar que, tot i que la senyalització d'AKT sembla ser independent de l'estimulació amb FBS (**Figura 4.2**), la presència de factors de creixement al medi és suficient i necessària per induir l'augment significatiu en la proporció de ECs *Pik3ca*^{H1047R} en proliferació (fase S o G2/M) (**Figura 4.3 A i B**). En absència d'estímuls externs i amb independència al genotip de les ECs, els nivells de proliferació es mantenen relativament baixos (al voltant del 20-25%). Pel contrari, en ser estimulades amb FBS, les ECs activen la seva proliferació, de manera lleugerament major a les cèl·lules *Pik3ca*^{H1047R}. Aquest fet correlaciona amb les diferències en els nivells de p-S6 observades anteriorment (**Figura 4.2**), i ens suggereix que els nivells d'activació de l'eix PI3K/AKT/mTOR són rellevants per a la inducció de la proliferació patològica derivada de *Pik3ca*^{H1047R}.

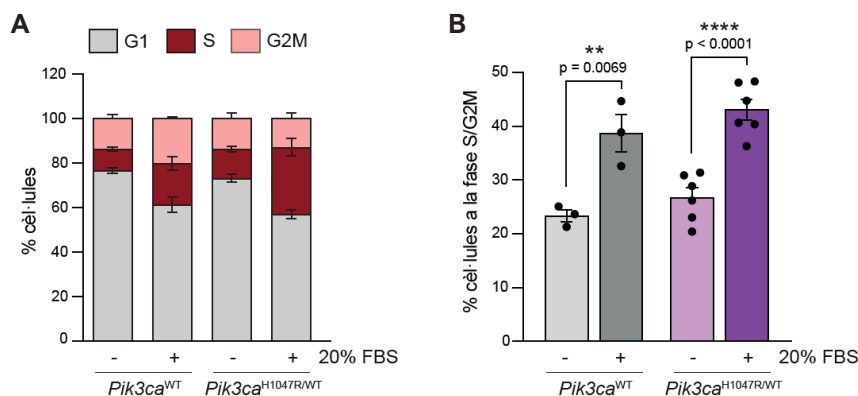


Figura 4.3. L'estimulació amb FBS indueix un augment del nombre de cèl·lules *Pik3ca*^{H1047R} en proliferació. Anàlisi del cycle cel·lular mitjançant citometria de flux d'ECs *Pik3ca*^{WT} i *Pik3ca*^{H1047R} en cultiu amb 20% FBS o sense FBS durant 24 h. **A.** Representació del % de cèl·lules identificades en cada una de les fases del cycle cel·lular (G1, S o G2/M). **B.** Representació del % total de cèl·lules identificades en fase S/G2M per cada un dels genotips i condicions testades. n = 3-5.

1.2. L'estimulació angiogènica és necessària per al desenvolupament de malformacions vasculars derivades de *Pik3ca*^{H1047R}.

Les malformacions vasculars apareixen durant el desenvolupament embrionari, quan els senyals mitogènics endotelials es produeixen a altes concentracions. D'altra banda, en la pràctica clínica, trobem casos recurrents on la progressió o reactivació del creixement de la malformació té lloc en estadis d'alta fluctuació d'estímuls de creixement, com per exemple, la pubertat. Aquestes evidències, juntament amb els resultats dels experiments *in vitro* mostrats anteriorment (**Figures 4.2 i 4.3**), suggereixen que el fenotip causat per l'expressió de *Pik3ca*^{H1047R} podria créixer de manera sinèrgica a l'estimulació del

creixement del teixit vascular. Es a dir, la patogènesi originada per *Pik3ca*^{H1047R} podria ser depenent del moment i el context mitogènic del teixit en qüestió.

Per provar aquesta idea, hem pres avantatge de la vasculatura de la retina postnatal de ratolí, la qual permet l'estudi de diferents fases del desenvolupament vascular. Publicacions anteriors han postulat la existència de tres etapes diferenciades durant la vascularització de la retina, a les quals ens referim com etapa primerenca, intermèdia o tardana (166,282). En la primera etapa té lloc la formació de la capa vascular superficial on l'estimulació angiogènica és constant. En la fase intermèdia, es formen les capes vasculars internes, i tot i que hi continua havent activitat angiogènica, aquesta es considera menor. Per últim, durant l'etapa tardana, els vasos ja estan pràcticament formats i estan assolint la seva maduresa, pel que el procés angiogènica procedeix a finalitzar. En el model animal *EC-Pik3ca*^{H1047R/WT}, l'administració de 4-OHT (25 mg/kg) postnatal a l'inici de cada una de les finestres angiogèniques (P1, P7 o P15), i l'aïllament de les retines entre 5 i 8 dies després de la injecció (a P6, P15 o P21, respectivament), ens va permetre determinar l'impacte de la mutació sota la influència de diferents nivells d'estimulació mitogènica (**Figura 4.4**).

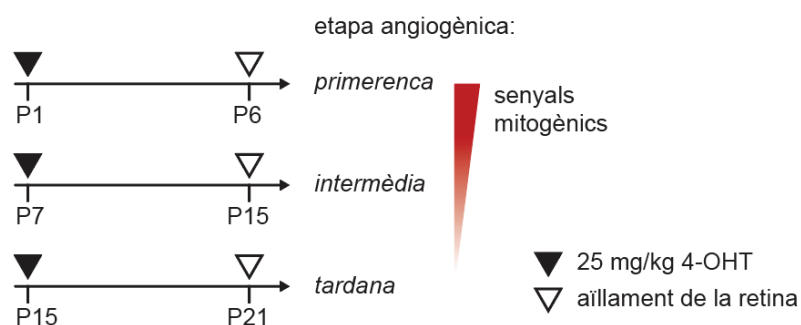


Figura 4.4. Esquema del procediment experimental per a l'estudi de *Pik3ca*^{H1047R} en les diferents etapes del desenvolupament angiogènica de la retina postnatal. Es mostren tres finestres experimentals (anomenades etapa primerenca, intermèdia i tardana) amb inducció de la recombinació (administració de 4-OHT 25 mg/kg) a P1, P7 o P15, i l'aïllament de les retines a P6, P15 o P21, respectivament.

En analitzar l'extensió del creixement vascular en les diferents etapes, vam trobar que durant la etapa primerenca i intermèdia el fenotip hiperplàstic mostrava una incidència del 100%, identificant zones vasculars malformades en el total de retines analitzades. No obstant, l'abast de les lesions va resultar menor durant l'etapa intermèdia, on es presenten malformacions més reduïdes i localitzades. En canvi, durant l'etapa primerenca, les lesions es desenvolupen de forma massiva i generalitzada, causant danys extensius a tot el pètal de la retina. Pel contrari, només un 33% de les retines analitzades a la etapa tardana mostren àrees vasculars aberrants, i en la majoria dels casos, les lesions detectades es desenvolupen de manera localitzada (**Figura 4.5 A i B**). Aquestes dades es veien reflectides en la quantificació de l'àrea vascular (IB4⁺) per cada una de les condicions, ja que mentre en les dues primeres etapes s'observa un augment

significatiu de l'àrea vascular a les retines *Pik3ca*^{H1047R}, en la etapa tardana no hi ha diferències entre les retines mutants i els respectius controls (**Figura 4.7 C**).

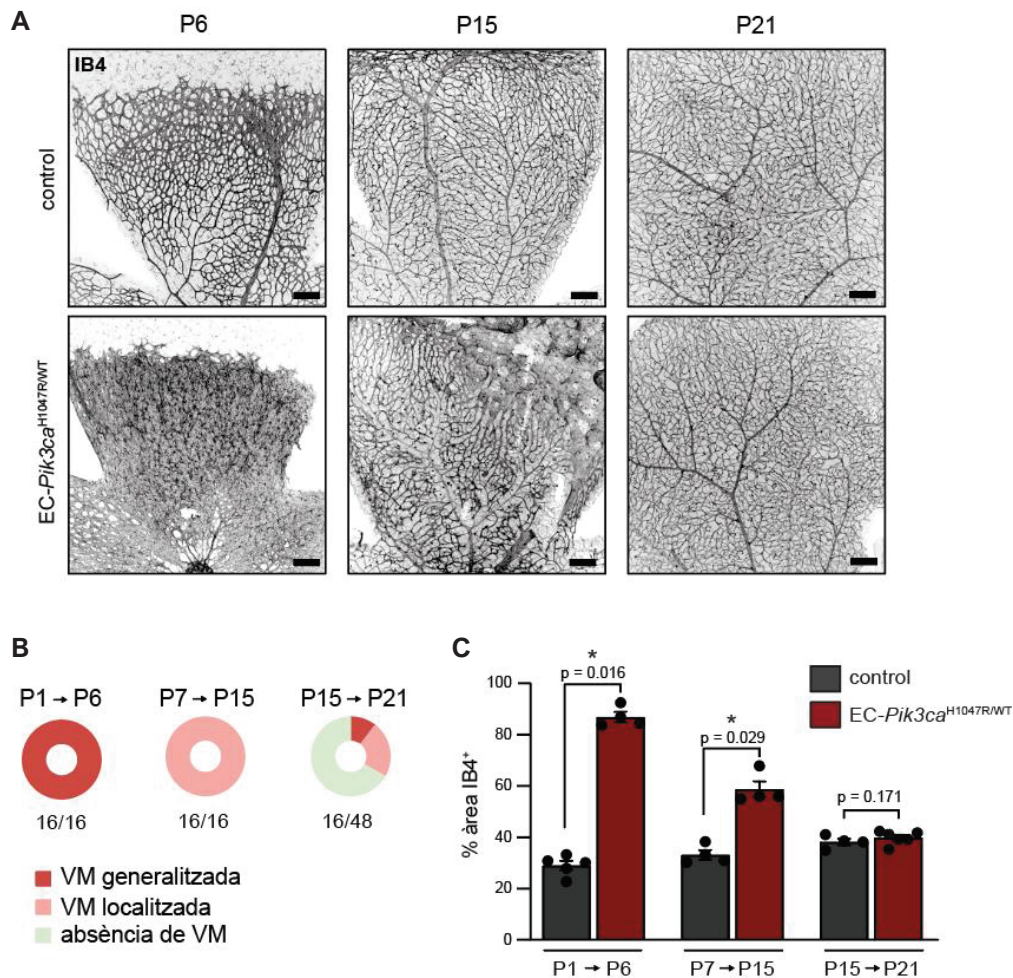


Figura 4.5. L'estimulació mitogènica és necessària per al desenvolupament de les malformacions vasculars *Pik3ca*^{H1047R} in vivo. **A.** Imatges representatives de retines P6, P15 i P21 *Pik3ca*^{WT} (control, negatives per *Pdgfb-CreERT2*) i EC-*Pik3ca*^{H1047R/WT}. Escala = 150µm. **B.** Gràfics circulars mostrant la incidència de les lesions vasculars durant les diferents etapes analitzades. Aquestes són classificades com a lesions localitzades, generalitzades o absència de lesió. Es pren com a unitat cada pètal de les retines analitzades. n ≥ 16. **C.** Quantificació de la vascularitat o àrea IB4⁺ (% d'àrea IB4⁺). n ≥ 4.

Com a control de la quantitat i distribució de les cèl·lules recombinants en cada una de les etapes descrites, en paral·lel als experiments anteriors, vam creuar ratolins *Pdgfb-CreERT2* amb l'al·lel mTmG (model al que anomenem EC-mTmG) per al traçat de les cèl·lules recombinants. Els animals EC-mTmG van ser tractats i analitzats segun el protocol descrit anteriorment (**Figura 4.4**). A partir de la quantificació de % d'àrea GFP⁺ respecte a l'àrea vascular total (IB4⁺) vam comprovar l'absència de diferències significatives en la proporció de cèl·lules recombinants (GFP⁺) durant les diferents etapes testades (**Figura 4.6 A i B**). Aquestes dades van confirmar per tant que les dosis de 4-OHT administrades són equiparables i proporcionals al creixement del ratolí, que la línia

Pdgfb-CreER^{T2} és igualment activa en totes les etapes del desenvolupament vascular i, per tant, que la penetració i abast de les malformacions vasculars observades no es veu influenciada per diferències en el número de cèl·lules mutants.

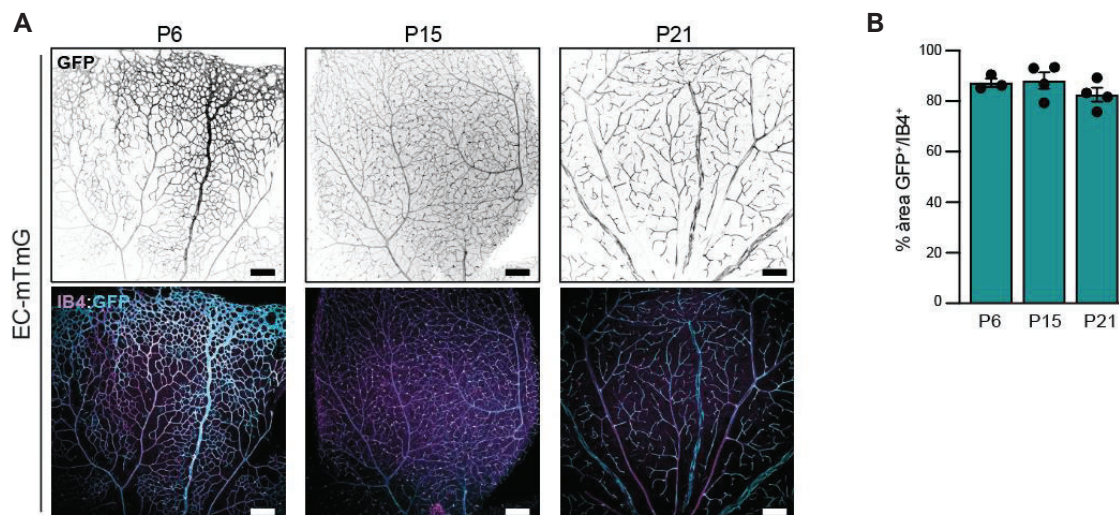


Figura 4.6. El percentatge de cèl·lules recombinants és equiparable entre en les diferents etapes angiogèniques. A. Imatges representatives de retines P6, P15 i P21 EC-mTmG. Escala = 150µm. B. Quantificació del percentatge d'àrea GFP+/IB4+ per cada una de les finestres angiogèniques proposades. n ≥ 3.

Així doncs, aquest resultat indiquen que l'expressió endotelial de *Pik3ca*^{H1047R} requereix, almenys parcialment, d'un context activament angiogènic, amb presència d'estímuls mitogènics que indueixen el creixement aberrant dels vasos i potencien l'aparició del fenotip patològic.

1.3. L'expressió endotelial mosaica de *Pik3ca*^{H1047R} permet la configuració d'un model per a l'estudi de les malformacions vasculars venoses.

Com hem vist en el resultats anteriors, la inducció de l'expressió postnatal de *Pik3ca*^{H1047R} a P1 amb una dosi alta de 4-OHT (25 mg/kg) dona lloc a el creixement massiu dels vasos, fent impossible la distinció entre estructures vasculars (**Figura 4.5 A**). A més, els experiments amb l'al·lel mTmG, han demostrat que amb la dosi de 4-OHT administrada fins al moment induïm la recombinació d'una gran proporció de ECs (superior al 80%) (**Figura 4.6 A i B**). Pel contrari, es creu que l'origen de les malformacions vasculars rau en l'aparició de la mutació patològica en una sola cèl·lula progenitora, la qual té la capacitat d'expandir-se, donant lloc a la distribució mosaica de les cèl·lules mutants.

És per aquest motiu que el següent objectiu en la nostre recerca va centrar-se en aconseguir l'expressió mosaica de *Pik3ca*^{H1047R}, és a dir, l'expressió de la mutació en tan sols unes poques ECs de la retina. Per fer-ho, vam estudiar l'impacte d'un rang decreixent de dosis de 4-OHT (25, 2,5, 0,25, 0,125, 0,025 mg/kg) durant l'etapa primerenca del desenvolupament vascular (administrant 4-OHT a P1 i analitzant les

vam estudiar l'impacte d'un rang decreixent de dosis de 4-OHT (25, 2,5, 0,25, 0,125, 0,025 mg/kg) durant l'etapa primerenca del desenvolupament vascular (administrant 4-OHT a P1 i analitzant les retines a P6) (**Figura 4.7 A**). De la mateixa manera que en els experiments anteriors, i amb la voluntat de validar la proporció de cèl·lules recombinants per cada una de les dosis de 4-OHT testades, vam fer ús de la línia d'animals EC-mTmG (**Figura 4.8 A i B**).

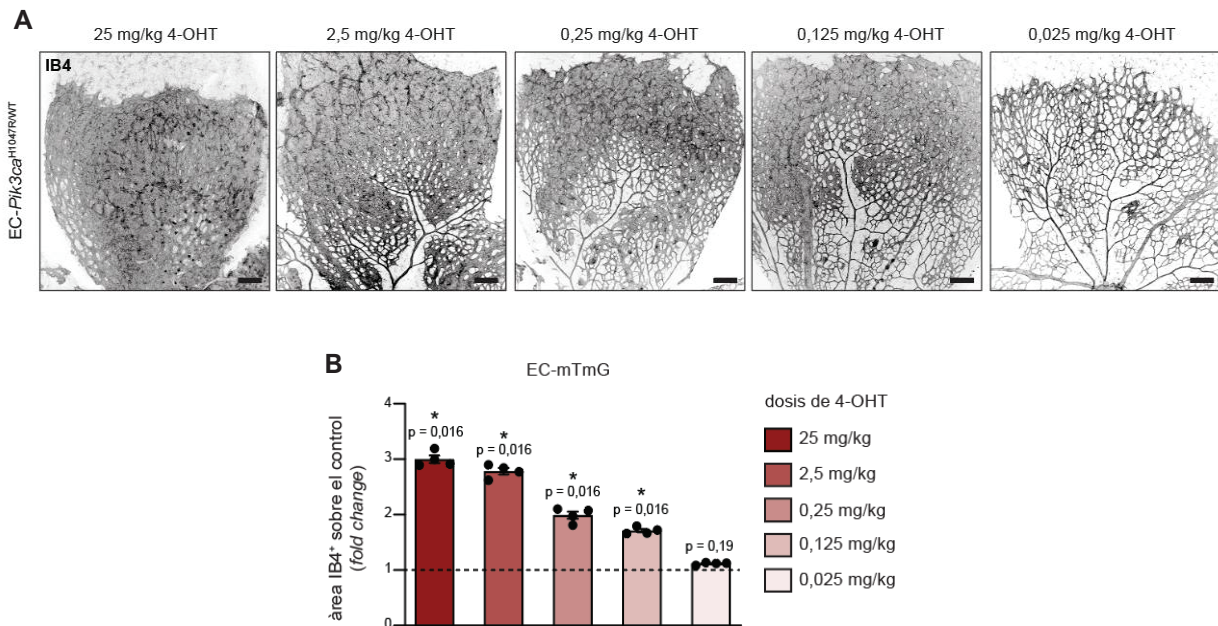


Figura 4.7. La disminució de la dosi de 4-OHT permet configurar un nou model de malformacions vasculars mitjançant l'expressió mosaica de *Pik3ca*^{H1047R}. A. Imatges representatives de retines EC-*Pik3ca*^{H1047R/WT} P6, induïdes a P1 amb dosis decreixents de 4-OHT (25, 2,5, 0,25, 0,125 i 0,025 mg/kg). Escala = 150µm. **C.** Quantificació del % d'àrea IB4⁺ per cada una de les dosis de 4-OHT estudiades. n = 4.

Aquesta estratègia ens va permetre identificar la dosi més baixa de 4-OHT (0,125 mg/kg) que indueix l'aparició d'un fenotip de malformacions vasculars robust i reproducible (**Figura 4.7 A i B**). En disminuir la dosi de 4-OHT el fenotip massiu observat anteriorment deixa pas a lesions vasculars més localitzades i fa evidents les artèries, les quals no semblen afectades per la mutació. Les aberracions vasculars ara es concentren en venes i zones capil·lars, però mantenen les artèries aparentment intactes. La quantificació de l'àrea vascular (IB4⁺) per cada una de les dosis de 4-OHT estudiades (a excepció de la dosi més baixa) resulta significativament augmentada en retines *Pik3ca*^{H1047R} i disminueix proporcionalment amb el nombre de cèl·lules recombinants (**Figura 4.7 B**). En paral·lel, la quantificació de l'àrea GFP⁺/IB4⁺ dels animals EC-mTmG mostra una proporcionalitat similar (**Figura 4.8 A i B**), pel que podem deduir que el nombre de cèl·lules mutants determina l'abast del fenotip.

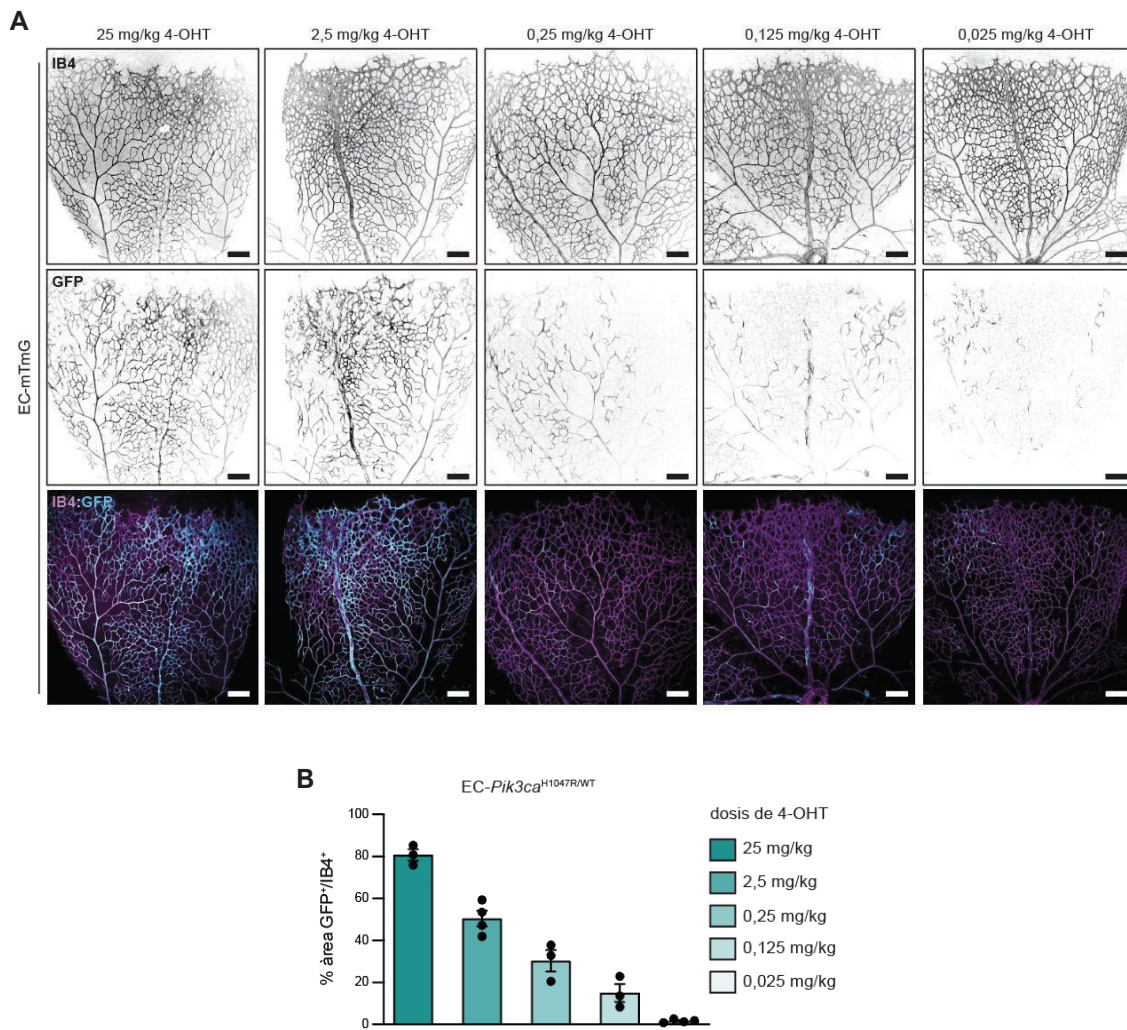


Figura 4.8. El model EC-mTmG mostra la proporcionalitat entre el nombre de cèl·lules recombinants per mTmG i la dosi de 4-OHT. **A.** Imatges representatives de retines EC-mTmG P6, induïdes a P1 amb dosis decreixents de 4-OHT (25, 2,5, 0,25, 0,125 i 0,025 mg/kg). Escala = 150µm. **C.** Quantificació del % d'àrea GFP⁺/IB4⁺ per cada una de les dosis de 4-OHT estudiades. n ≥ 3.

1.4. El model mosaic EC-*Pik3ca*^{H1047R} recapitula els trets característics de les malformacions venoses.

Un cop establertes les condicions per a l'expressió de *Pik3ca*^{H1047R} en mosaïcisme, cal determinar si el model recapitula els trets més característics de la patologia humana. Tal i com he descrit anteriorment, les lesions apareixen de manera generalitzada a venes i zones capil·lars. En canvi, els vasos arterials no es veuen afectats ni mostren diferències estructurals en expressar *Pik3ca*^{H1047R} (**Figura 4.9 A i B**). Així doncs, el nostre model reflecteix els trets de la patologia humana, on mutacions activadores a *PIK3CA* han estat diagnosticades exclusivament en malformacions venoses i capil·lars, però no semblen afectar la formació de les artèries.

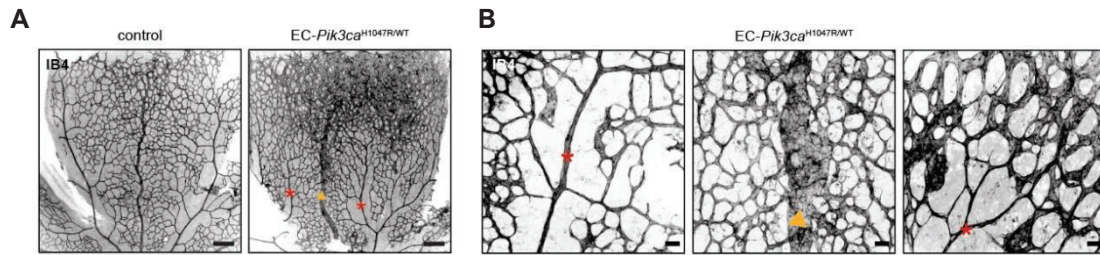


Figura 4.9. L'expressió endotelial de *Pik3ca*^{H1047R} causa l'aparició de malformacions vasculars a venes i capil·lars, però no afecta a les artèries. **A.** Imatges representatives de retines EC-*Pik3ca*^{H1047R/WT} P6, induïdes a P1 amb 4-OHT 0,125 mg/kg. Escala = 150µm. **B.** Imatges a gran augment (40X) de les retines anteriors. Els asteriscs vermells indiquen artèries o arterioles, el triangle groc indica una vena. Escala = 30µm.

L'anàlisi de les retines P6, induïdes amb 0,125 mg/kg de 4-OHT a P1, també va permetre avaluar els nivells d'activació de la via PI3K, el recobriment mural dels vasos, la hiperplàsia vascular i la proliferació endotelial a les lesions. En quant a l'activitat de PI3K, les retines mutants van demostrar un augment significatiu en la intensitat de la tinció de p-S6 (Ser235/236), indicant un increment en l'eix de senyalització PI3K/AKT/mTOR (**Figura 4.10 A i B**). Aquest augment s'observa tant al comparar retines mutants i control (representat com a *fold change*) (**Figura 4.10 B**), com en comparar els nivells de senyalització d'una lesió aïllada amb el teixit vascular circumdant i aparentment sa (**Figura 4.10 A**).

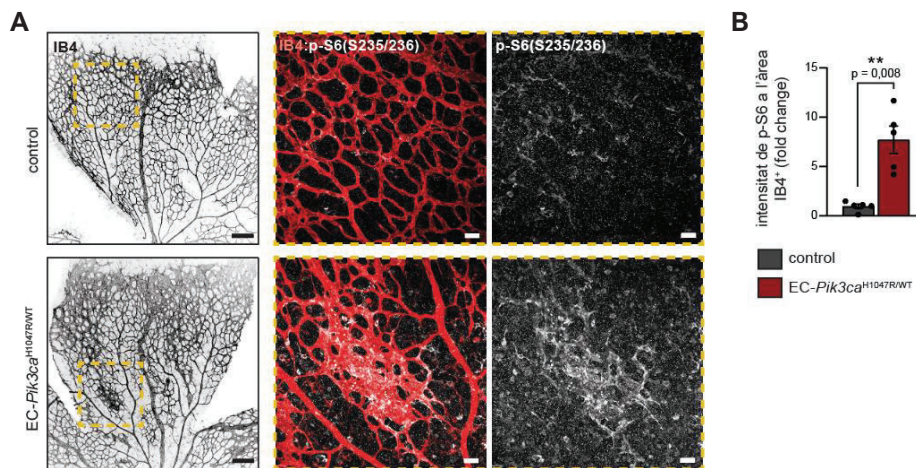


Figura 4.10. Les lesions *Pik3ca*^{H1047R} mostren una sobreactivació de la via PI3K/AKT/mTOR. **A.** Imatges representatives de retines EC-*Pik3ca*^{H1047R/WT} P6, induïdes a P1 amb 4-OHT 0,125 mg/kg. Escala = 150µm. A la part dreta del panell, es mostren les regions indicades amb els requadres grocs a gran augment (40X). Escala = 30µm. **B.** Quantificació de la intensitat relativa de p-S6 (Ser235/236) en comparar retines *Pik3ca*^{H1047R/WT} i control (negatius per *Pdgfb-CreERT2*), expressat com a *fold change*. n = 5.

La tinció de les retines amb NG2 (un marcador específic de pericits a la retina) i la seva quantificació, també va determinar una pèrdua del percentatge de cobertura mural respecte al l'àrea vascular total (IB4⁺) a les retines *Pik3ca*^{H1047R} en comparació amb les retines control (**Figura 4.11 A i B**).

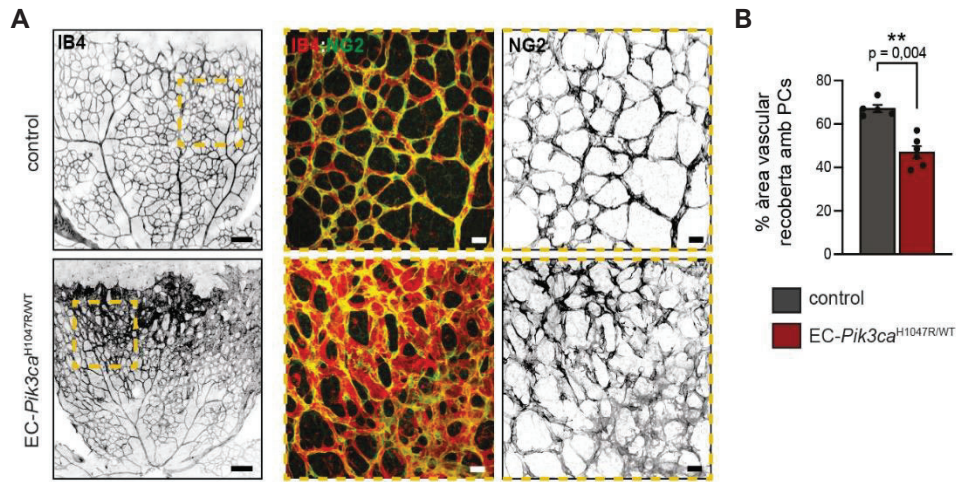


Figura 4.11. Les retines *Pik3ca*^{H1047R} mostren defectes en la cobertura mural dels vasos. A. Imatges representatives de retines EC-*Pik3ca*^{H1047R/WT} P6, induïdes a P1 amb 4-OHT 0,125 mg/kg. Escala = 150µm. A la part dreta del panell, es mostren les regions indicades amb els requadres grocs a gran augment (40X). Escala = 30µm. **B.** Quantificació del % de cobertura mural, expressat com % àrea NG2⁺/IB4⁺ comparant retines *Pik3ca*^{H1047R/WT} i control (negatius per *Pdgfb-CreERT*²). n ≤ 5.

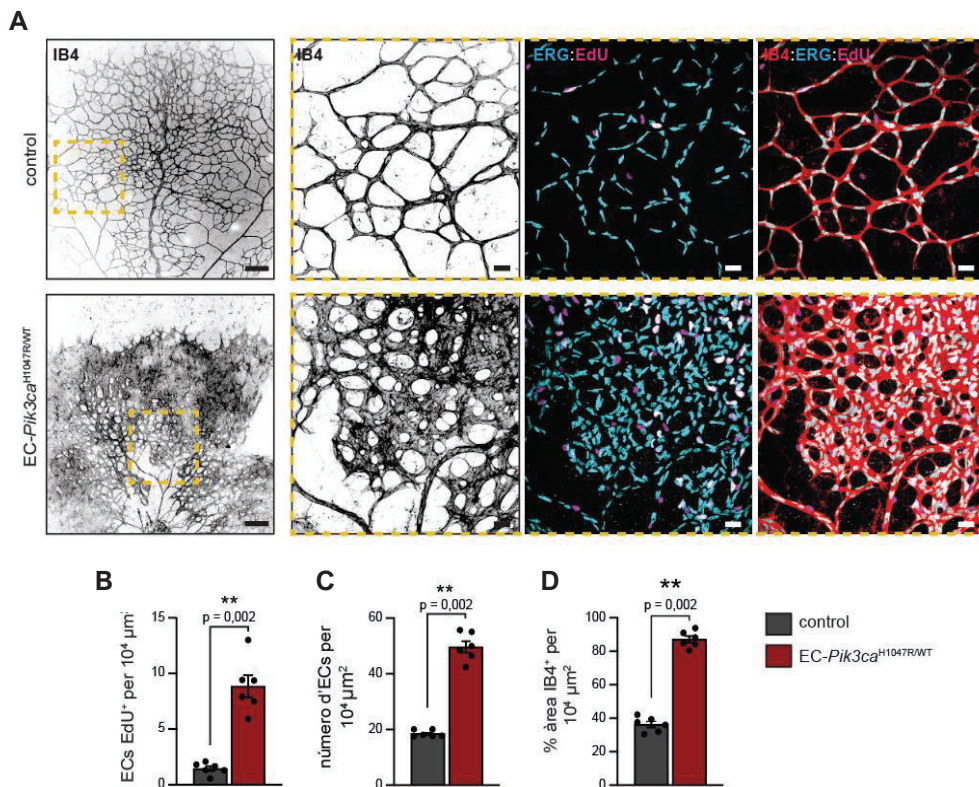


Figura 4.12. Les lesions causades per *Pik3ca*^{H1047R} són hiperproliferatives. A. Imatges representatives de retines EC-*Pik3ca*^{H1047R/WT} P6, induïdes a P1 amb 4-OHT 0,125 mg/kg i tractats amb EdU 2 h abans del seu sacrifici. Escala = 150µm. A la part dreta del panell d'imatges es mostren les regions indicades amb els requadres grocs a gran augment (40X). Escala = 30µm. **B.** Quantificació del nombre absolut de ECs en proliferació ERG⁺EdU⁺ per 10⁴ µm². **C.** Quantificació del nombre total de ECs per 10⁴ µm². **D.** Quantificació l'àrea vascular (IB4⁺) per 10⁴ µm² comparant retines *Pik3ca*^{H1047R/WT} i control (negatius per *Pdgfb-CreERT*²). n = 6.

D'altra banda, l'administració d'EdU als animals 2 h abans de l'aïllament del teixit va permetre avaluar el nombre d'ECs en proliferació (en fase S del cicle cel·lular). Aquest experiment va revelar que les retines mutants presenten un major nombre d'ECs proliferatives (ERG⁺ EdU⁺) (**Figura 12 A i B**). En concordança, la quantificació de l'àrea vascular i el nombre total de ECs (ERG⁺) també va resultar significativament superior a les retines *Pik3ca*^{H1047R} (**Figura 12 A, C i D**). En aquest cas, la quantificació de la proliferació és presentada com a nombre absolut de nuclis per àrea analitzada, és a dir, número de cèl·lules proliferatives totals per 10⁴ μm², ja que en normalitzar aquests valors per el nombre total d'ECs, hauríem eliminat qualsevol diferència degut a l'acumulació de cèl·lules a les lesions.

En relació a aquest últim punt, vam realitzar un segon experiment per comprovar que la proporció entre ECs proliferatives i ECs totals és superior a les retines mutants. En comptes d'administrar EdU 2 h abans de l'anàlisi, aquest compost va ser injectat a l'animal 24 h abans. Aquesta estratègia va permetre marcar amb EdU totes aquelles cèl·lules en proliferació i la seva progènie des de el moment de la injecció. D'aquesta manera, totes les ECs que hagin proliferat en algun moment durant les 24 h seran detectades com EdU⁺ i quantificades en relació al total de ECs. Confirmant les nostres sospites, en aquesta ocasió, es va demostrar que la proliferació és significativament major a les retines mutants, ja sigui a partir del càlcul del percentatge de cèl·lules EdU⁺ ERG⁺/ total de ECs ERG⁺, com expressat com a nombre total de ECs EdU⁺ (**Figura 13 A, B i C**)

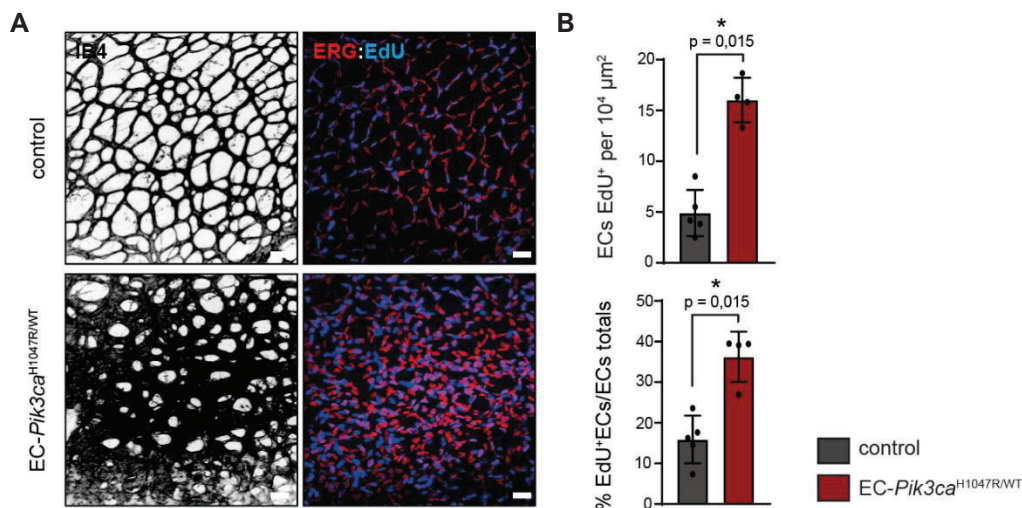


Figura 4.13. L'administració d'EdU 24 h abans de l'anàlisi confirma l'acumulació de ECs proliferatives en retines *Pik3ca*^{H1047R}. **A.** Imatges representatives de retines EC-*Pik3ca*^{H1047R/WT} P6, induïdes a P1 amb 4-OHT 0,125 mg/kg i tractades amb EdU 24 h abans del seu sacrifici. Escala = 30 μm. **B.** (gràfic superior) Quantificació del nombre absolut de ECs en proliferació ERG⁺EdU⁺ per 10⁴ μm² en retines *Pik3ca*^{H1047R/WT} i control (negatius per *Pdgfb-CreER*^{T2}). (gràfic inferior) Quantificació del percentatge de ECs en proliferació (ERG⁺EdU⁺) respecte al total de ECs (ERG⁺) en retines *Pik3ca*^{H1047R/WT} i control (negatius per *Pdgfb-CreER*^{T2}). n ≤ 4.

1.5. La caracterització de retines *Pik3ca*^{H1047R} a P4 mostra l'inici del desenvolupament dels trets patològics.

Amb l'objectiu de caracteritzar amb més precisió l'inici del fenotip patològic descrit a les retines P6, vam voler estudiar un moment més inicial durant el desenvolupament de les lesions. Per fer-ho, després de induir la recombinació seguint el mateix protocol anterior (injecció de 0,125 mg/kg de 4-OHT a P1), vam aïllar i analitzar les retines tan sols 3 dies més tard (P4) (**Figura 4.14**).

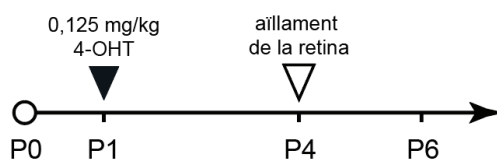


Figura 4.14. Esquema del procediment experimental per a l'estudi de l'inici del desenvolupament de les malformacions vasculars. Inducció de la recombinació mitjançant l'administració de 0,125 mg/kg de 4-OHT a P1, i aïllament de la retina a P4.

Les retines *Pik3ca*^{H1047R} a P4 ja mostren una vasculatura distesa i aberrant, amb especial incidència al front angiogènic (**Figura 4.15**). Tot i que es tracta d'un moment incipient en el desenvolupament de les malformacions, a P4 els vasos mutants ja demostren els trets patològics descrits a les retines P6. La quantificació dels mateixos paràmetres demostren que a P4 ja hi ha un increment significatiu de la senyalització PI3K/AKT/mTOR (augment de la intensitat de p-S6) (**Figura 4.16 A i D**), el recobriment mural per PCs és deficient (disminució de la relació entre l'àrea NG2⁺ i IB4⁺) (**Figura 4.16 E**), i hi ha un clar augment del nombre de ECs i ECs en proliferació (**Figura 4.16 F i G**) que causen l'expansió de l'àrea vascular IB4⁺ (**Figura 4.16 H**). La caracterització de l'inici del desenvolupament d'aquestes lesions ens permet per tant identificar el moment inicial de la patologia i determinar estratègies experimentals per a l'avaluació de possibles fàrmacs preclínics.

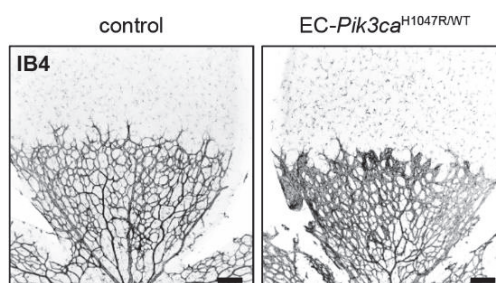


Figura 4.15. L'anàlisi de les retines *Pik3ca*^{H1047R} a P4 permet caracteritzar l'etapa inicial de les malformacions vasculars. Imatges representatives de retines EC-*Pik3ca*^{H1047R/WT} P4, induïdes a P1 amb 4-OHT 0,125 mg/kg i tenyides amb IB4. Escala = 150µm.

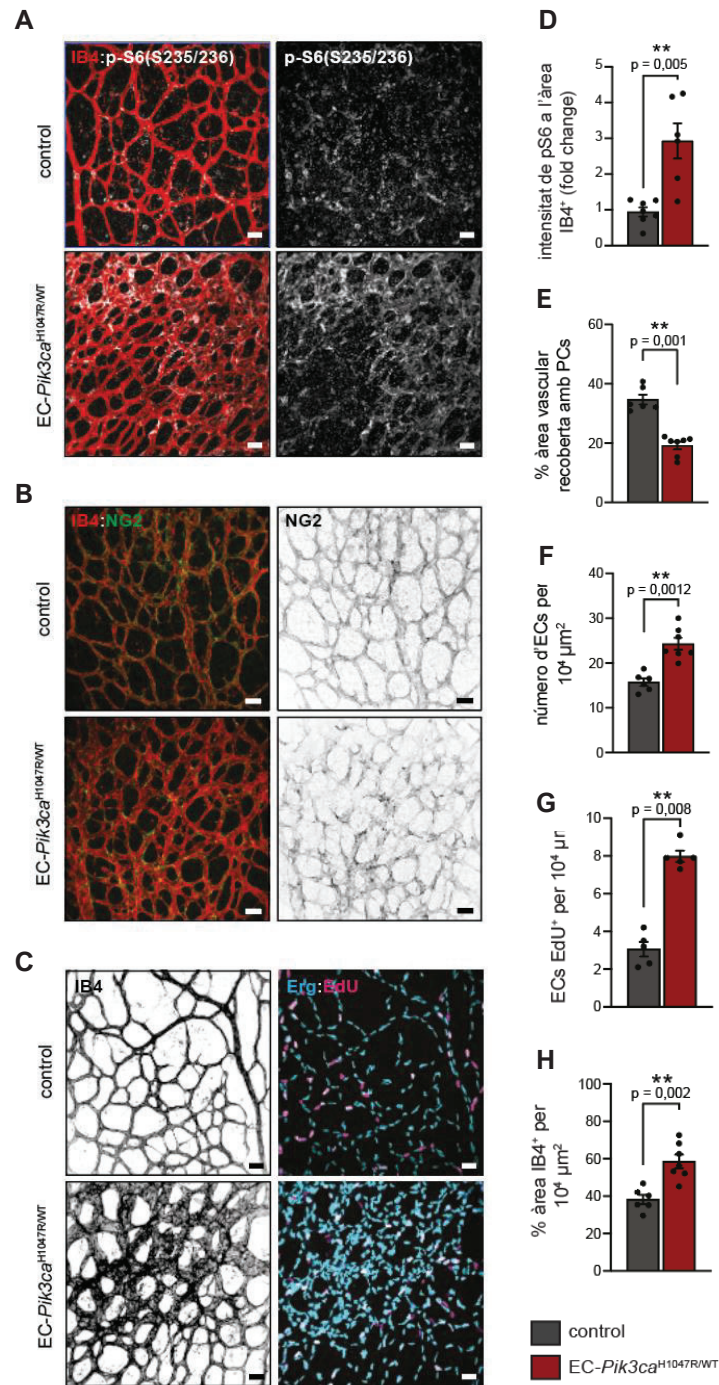


Figura 4.16. La caracterització de les retines *Pik3ca*^{H1047R} a P4 mostra l'inici del fenotip descrit a P6. (A-C) Imatges representatives de retines EC-*Pik3ca*^{H1047R/WT} P4, induïdes a P1 amb 4-OHT 0,125 mg/kg. Escala = 30μm. **D.** Quantificació de la intensitat relativa de p-S6 (Ser235/236) en comparar retines *Pik3ca*^{H1047R/WT} i control, expressat com a *fold change*. $n \leq 5$. **E.** Quantificació del % de cobertura mural, expressat com % àrea NG2⁺/IB4⁺ comparant retines *Pik3ca*^{H1047R/WT} i control. $n \leq 6$. **F.** Quantificació del nombre total de ECs per 10⁴ μm². $n \leq 6$. **G.** Quantificació del nombre absolut de ECs en proliferació ERG⁺EdU⁺ per 10⁴ μm². **H.** Quantificació l'àrea vascular (IB4⁺) per 10⁴ μm². Les retines usades com a control provenen d'animals negatius per *Pdgfr*-CreER^{T2}. $n \leq 6$.

En resum, hem demostrat que la inducció de la recombinació amb dosis baixes de 4-OHT en animals EC-*Pik3ca*^{H1047R/WT} dona lloc a l'expressió mosaica de la mutació durant el desenvolupament vascular postnatal de la retina i a l'aparició de lesions incipients aïllades. A més, aquest ha esdevingut un model clau per a l'estudi de les malformacions vasculars que recapitula de manera consistent aquells trets característics de la patologia humana. L'augment de la proliferació endotelial a causa de la sobreactivació de la via PI3K provoca l'aparició d'anormalitats vasculars hiperplàstiques, amb dèficit en el recobriment mural i específicament localitzades a venes i capil·lars. Aquest model per tant, es convertirà en una eina essencial per a l'estudi dels mecanismes cel·lulars i moleculars que condueixen l'aparició i formació de les lesions, tal i com veurem a les seccions vinents. Altrament, el modelatge de la patologia en un sistema *in vivo* ràpid i robust obre les portes al seu ús com a eina preclínica. La extensa caracterització mostrada en aquest treball permet utilitzar el model proposat per a l'avaluació de possibles tractaments farmacològics contra les malformacions vasculars causades per mutacions a *PIK3CA*.

2. Objectiu 2: Caracteritzar la patogenicitat de *Pik3ca*^{H1047R} en les malformacions vasculars prenent com a eix central d'estudi el llinatge endotelial on s'expressa la mutació.

2.1. *Pik3ca*^{H1047R} provoca el sobrecreixement de venes i capil·lars, però no afecta a les artèries.

La caracterització del model anterior ha confirmat que l'expressió de *Pik3ca*^{H1047R} dona lloc a lesions vasculars als capil·lars i a les venes, però no a les artèries. La segona part de la present tesi es centrarà en l'estudi detallat d'aquestes discrepàncies fenotípiques en els diferents tipus vasculars. En base als resultats de la secció anterior, vam utilitzar el mateix model animal per estudiar amb més detall el comportament de la EC *Pik3ca*^{H1047R}. Per fer-ho, vam partir de la mateixa estratègia genètica, però, en aquest cas, vam afegir l'al·lel mTmG a l'animal portador de la línia *Pdgfb*-CreER^{T2} i la mutació H1047R. Aquest model és l'anomenat EC-*Pik3ca*^{H1047R/WT}-mTmG (**Figura 4.17 A**). De forma similar als experiments anteriors, els neonats P1 van ser injectats amb 0,05 mg/kg de 4-OHT i les retines van ser aïllades a P6 (**Figura 4.17 B**). La presència d'aquests tres al·lels en un mateix animal ens ha permès visualitzar les cèl·lules recombinants (*Pik3ca*^{H1047R/WT}; GFP⁺) i determinar canvis en la seva distribució i expansió.

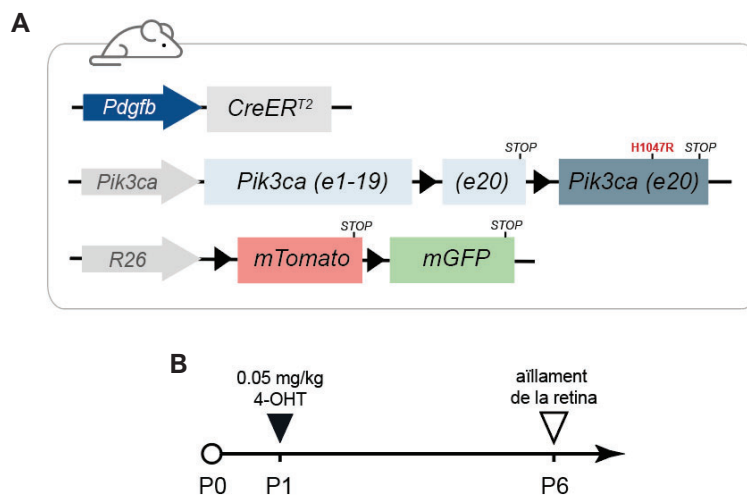


Figura 4.17. Model EC-*Pik3ca*^{H1047R/WT}-mTmG. **A.** A partir de l'administració de 4-OHT, la recombinasa CreER^{T2} es translocarà al nucli per recombinar dos al·lels dependents de Cre: l'exó 20 del gen *Pik3ca*, donant lloc a l'expressió de l'exó 20 portador de la mutació H1047R, i la seqüència *mTomato*, l'excisió de la qual donarà lloc a l'expressió de *mGFP*. La modificació genètica tindrà lloc a les ECs donat el control de Cre per el promotor de *Pdgfb*. **B.** Esquema del procediment experimental dut a terme en cadells postnats EC-*Pik3ca*^{H1047R/WT}-mTmG.

La caracterització en detall de la posició de les lesions a la vasculatura de la retina P6 va confirmar les nostres observacions anteriors. Venes i capil·lars presenten anormalitats en un gran percentatge dels vasos analitzats: el 86,8 i el 61,7 %, respectivament. Pel

contrari, cap de les artèries observades a les retines mutants (d'un total de 48) semblen desenvolupar trets patològics (**Figura 4.18 A i B**).

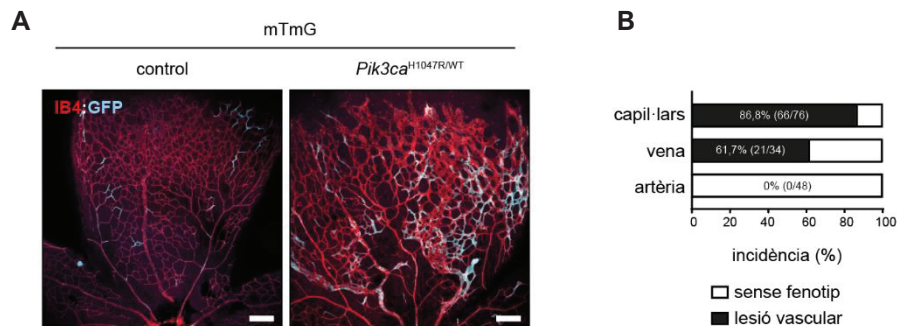


Figura 4.18. L'absència de lesions a artèries fa evident un biaix de la manifestació fenotípica de *Pik3ca*^{H1047R} a venes i capil·lars. **A.** Imatges representatives de retines P6 EC-*Pik3ca*^{H1047R/WT}-mTmG injectades amb 0,05 mg/kg de 4-OHT a P1. Utilitzades com a control retines *Pdgfb-CreERT2*; mTmG. Escala = 150µm. **B.** Quantificació de la incidència de lesions a capil·lars, venes i artèries, expressada com a % de vasos amb fenotip patològic respecte al total de vasos analitzats.

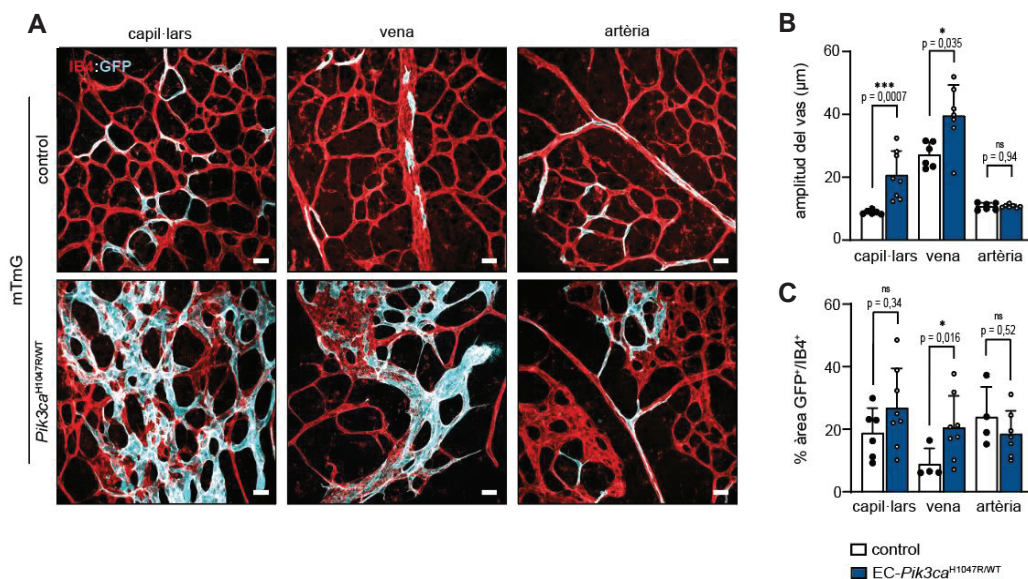


Figura 4.19. Les ECs *Pik3ca*^{H1047R} s'expandeixen preferentment a venes i capil·lars. **A.** Imatges representatives de retines P6 EC-*Pik3ca*^{H1047R/WT}-mTmG, injectades amb 0,05 mg/kg de 4-OHT a P1. Escala = 30µm. **B.** Quantificació de l'amplitud de capil·lars, venes i artèries en retines mutants i control (*Pdgfb-CreERT2*-mTmG)(µm). n ≥ 6. **C.** Quantificació del % d'àrea GFP+ respecte a l'àrea total del vas analitzat. n ≥ 4.

Imatges a major magnificació de capil·lars, venes i artèries de retines mutants i control (*Pdgfb-CreERT2*; mTmG) van permetre determinar amb més objectivitat les diferències en la manifestació fenotípica de la mutació activadora de *Pik3ca*. Mentre l'amplitud dels conductes arterials roman constant en retines mutants i control, venes i capil·lars demostren un dramàtic augment en el seu diàmetre (**Figura 4.19 A i B**). D'acord amb

l'expressió endotelial de *Pdgfb-CreER^{T2}*, les imatges dels diferents compartiments vasculars ens mostren la presència de cèl·lules recombinants (GFP⁺) a totes les subpoblacions endotelials (capil·lars, venes i artèries), pel que podríem assumir que l'expressió de la mutació ocorre estocàsticament en qualsevol dels vasos. El que és interessant però, és que a partir de la quantificació de la superfície vascular GFP⁺, podem determinar que, en retines mutants, les cèl·lules recombinants s'expandeixen preferentment en venes i zones capil·lars (**Figura 4.19 A i C**).

D'altra banda, és important destacar que en algunes d'aquestes imatges, podem observar àrees hiperplàstiques compostes per cèl·lules GFP⁺ (**Figura 4.19 A**, compartiment arterial *Pik3ca^{H1047R}*). Aquesta observació suggereix que el constructe *Pik3ca^{H1047R}* recombinava, inclús amb major eficàcia, que el gen reporter mTmG, i per tant, és possible trobar àrees no reportades per GFP però mutants per *Pik3ca* (falsos negatius). Aquestes diferències en l'eficàcia de recombinació entre el gen *Pik3ca* i mTmG ens condueixen a considerar que la majoria de cèl·lules GFP⁺ poden ser considerades *Pik3ca*-mutants.

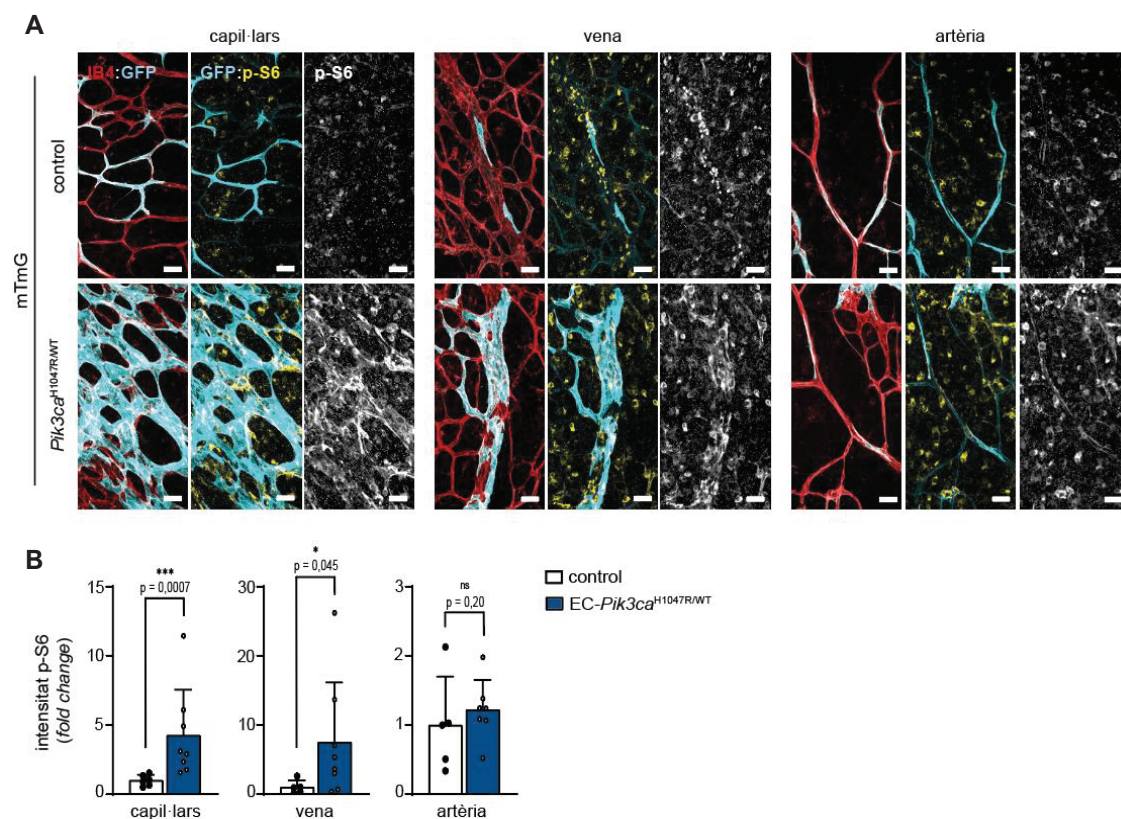


Figura 4.20. *Pik3ca^{H1047R}* induïx l'activació de PI3K a venes i capil·lars, però no a artèries. A. Imatges representatives de retines P6 EC-*Pik3ca^{H1047R/WT}*-mTmG, injectades amb 0,05 mg/kg de 4-OHT a P1. Escala = 30µm. **B.** Quantificació de la intensitat de la senyal de p-S6 en àrees GFP⁺ de capil·lars, venes o artèries. Valors relatius en comparar retines *Pik3ca^{H1047R/WT}* i control (*Pdgfb-CreER^{T2}*-mTmG) (fold change). n ≥ 5.

En detectar diferències fenotípiques entre les ECs venoses o capil·lars i les cèl·lules arterials, vam decidir analitzar els nivells d'activació de la via PI3K en cada una de les

estructures vasculars esmentades. La tinció de p-S6 (S235/236) en retines *Pik3ca*^{H1047R} i *Pik3ca*^{WT}, i la quantificació de la intensitat de la seva senyal en àrees GFP⁺ dels diferents tipus vasculars, va demostrar com, en concordança amb el fenotip observat, venes i capil·lars augmenten significativament l'activitat PI3K/AKT/mTOR, mentre les artèries no mostren diferències en aquest paràmetre (**Figura 4.20 A i B**).

En conjunt, aquestes dades ens condueixen a plantejar dues possibles hipòtesis. En primer lloc, és possible que la mutació activadora H1047R, tot i expressar-se en cèl·lules arterials, sigui contrarestada per mecanismes inherents a aquest tipus cel·lular, bloquejant així els efectors de la via PI3K i les corresponents conseqüències patogèniques. En segon lloc, tenint en compte que induïm l'expressió de la mutació en un estadi inicial del desenvolupament vascular de la retina, també seria possible que *Pik3ca*^{H1047R} estigués impulsant un biaix en el procés natural de la diferenciació endotelial. Es a dir, la sobreactivació de PI3K podria estar afavorint identitats cel·lulars venoses i capil·lars, evitant així l'expansió de cèl·lules mutants en posicions arterials. Sota aquest paradigma, vam enfocar el projecte amb l'objectiu de modelar aquests dos escenaris i determinar la seva implicació en el desenvolupament de les malformacions vasculars.

2.2. L'expressió de *Pik3ca*^{H1047R} a cèl·lules arterials diferenciades no és patogènica.

Donada l'absència de signes patogènics a les artèries sota l'expressió estocàstica de *Pik3ca*^{H1047R}, vam voler testar els efectes de la mutació específicament a les artèries. La línia Cre induïble *Bmx-CreER*^{T2} té activitat de manera específica en cèl·lules arterials diferenciades, tant a nivell fetal com en teixits adults. Així doncs, en el marc d'aquest projecte vam utilitzar *Bmx-CreER*^{T2} per caracteritzar l'impacte de la mutació H1047R específicament en vasos arterials.

Tant mateix, l'expressió de *Bmx* a les artèries de la retina postnatal no ha estat testada en l'etapa inicial del desenvolupament (P1-P14), pel que en primer lloc va ser necessari dur a terme la caracterització de la línia. Mitjançant el creuament de *Bmx-CreER*^{T2} amb l'al·lel reporter mTmG (model AEC-mTmG) (**Figura 4.21**), vam poder determinar els temps i lloc d'expressió de *Bmx* durant l'inici del desenvolupament vascular a la retina.

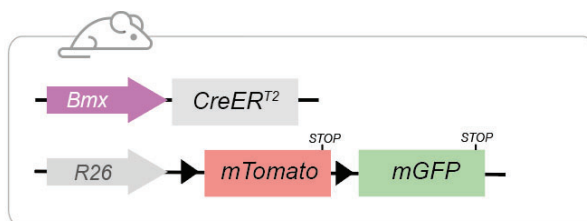


Figura 4.21. Model EC-mTmG. A. A partir de l'administració de 4-OHT, la recombinasa CreER^{T2} es translocarà al nucli per recombinar la seqüència *mTomato*, l'excisió de la qual donarà lloc a l'expressió de *mGFP*. La modificació genètica tindrà lloc específicament a ECs arterials (AECs) donat el control de Cre per el promotor de *Bmx*.

Per fer-ho, vam testar tres intervals de temps diferents a partir de l'administració de 4-OHT a P1, P3 i P14, i l'aïllament de les retines a P6, P8 o P16, respectivament. En aquest cas, i donada la baixa proporció de cèl·lules arterials en relació al total de l'endoteli, vam fer ús de dosis relativament altes de 4-OHT (10 mg/kg) amb l'objectiu d'assegurar el màxim nombre de cèl·lules recombinants. La tinció de les retines resultants va mostrar com *Bmx* no indueix la recombinació de l'al·lel mTmG fins el dia P3 (les retines injectades a P1 no mostren cèl·lules GFP⁺). Cal dir però que la inducció de l'activitat Cre a P3 tan sols mostra la recombinació de mTmG en un petit fragment inicial de l'artèria. En canvi, en testar l'activitat de *Bmx* en estadis més tardans (P14), podem trobar cèl·lules GFP⁺ al llarg de tota l'artèria i en algunes arterioles circumdants (**Figura 4.22**).

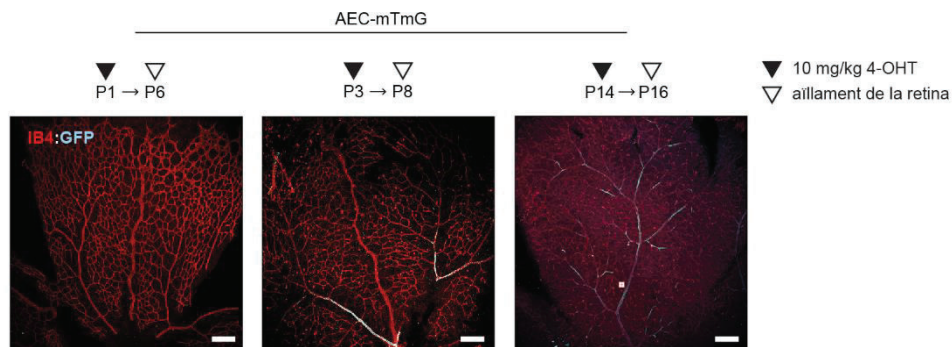


Figura 4.22. Caracterització de l'expressió de la línia *Bmx-CreER*^{T2} durant el desenvolupament postnatal de la retina. Imatges representatives de retines AEC-mTmG P6, P8 i P16, a partir de l'administració de 10 mg/kg de 4-OHT a P1, P3 i P14, respectivament. Escala = 150µm.

D'acord amb l'activitat reportada per *Bmx-CreER*^{T2}, vam utilitzar el model *Bmx-CreER*^{T2}-*Pik3ca*^{H1047R/WT}-mTmG (també anomenat AEC-*Pik3ca*^{H1047R/WT}-mTmG) (**Figura 4.23**) per avaluar els efectes de la mutació activadora de *Pik3ca* en dos moments diferents del desenvolupament postnatal de la retina.

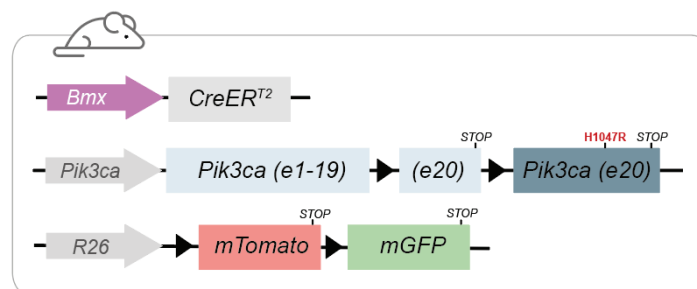


Figura 4.23. Model AEC-*Pik3ca*^{H1047R/WT}-mTmG. A partir de l'administració de 4-OHT, la recombinasa CreER^{T2} es translocarà al nucli per recombinar dos al·lels dependents de Cre: l'exó 20 del gen *Pik3ca*, donant lloc a l'expressió de l'exó 20 portador de la mutació H1047R, i la seqüència *mTomato*, l'excisió de la qual donarà lloc a l'expressió de *mGFP*. La modificació genètica tindrà lloc a les ECs arterials (AECs) donat el control de Cre per el promotor de *Bmx*.

En primer lloc, vam administrar 10 mg/kg de 4-OHT a ratolins postnats P3, els quals van ser analitzats a P8. Les artèries observades en aquestes retines no van presentar cap anormalitat aparent (**Figura 4.24 A**), i la quantificació del diàmetre o amplitud del vas va corroborar l'absència de fenotip en comparació amb els controls (*Bmx-CreER^{T2}-mTmG*) (**Figura 4.25 A i B**). Tot i així és cert que la quantitat de cèl·lules recombinants mitjançant el tractament a P3 tan sols indueix la recombinació a un petit nombre de AECs. Per aquest motiu, per tal d'assegurar-nos que la quantitat de cèl·lules recombinants fos suficient per induir un possible fenotip, vam analitzar un segon interval de temps. En aquest cas, a partir de l'administració de la mateixa dosi de 4-OHT a P7 i l'anàlisi dels vasos a P12. Tot i aconseguir la recombinació en un major nombre de cèl·lules arterials, el vasos mutants no van mostrar cap diferència respecte als vasos de les retines control (**Figura 4.24 B**). De la mateixa manera, l'anàlisi de l'amplitud del vas, de nou, va corroborar l'absència de fenotip a les artèries (**Figura 4.25 D i E**). A partir d'aquests resultats, podem afirmar que, inclús sota un context on l'expressió de *Pik3ca^{H1047R}* succeeix específicament a les ECs arterials, aquestes no mostren cap defecte en la seva vascular.

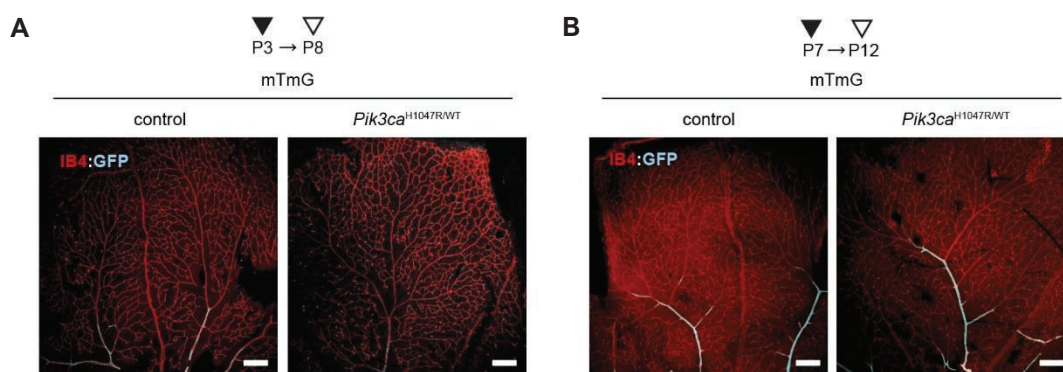


Figura 4.24. L'expressió de *Pik3ca^{H1047R}* específicament al compartiment arterial no causa anomalies vasculars. A. Imatges representatives de retines AEC-*Pik3ca^{H1047R/WT}-mTmG* P8, induïdes amb 10 mg/kg de 4-OHT a P3. Escala = 150µm. Els controls equivalen a retines AEC-mTmG. **B.** Imatges representatives de retines AEC-*Pik3ca^{H1047R/WT}-mTmG* P12, induïdes amb 10 mg/kg de 4-OHT a P7. Escala = 150µm. El triangle negre representa el moment de l'administració de 4-OHT, i el triangle blanc, el moment de l'aïllament i anàlisi de la retina.

En aquest mateix model, també vam poder determinar els nivells d'activació de la via PI3K a les àrees reportades de les artèries mutants *versus* controls. La intensitat de la senyal de p-S6 va resultar comparable entre artèries de retines P8 mutants i control (**Figura 4.25 A i C**). Pel contrari, la mateixa quantificació en retines P12, on hi ha un major nombre de cèl·lules GFP⁺, va revelar una notable disminució de la fosforilació de S6 a les artèries mutants (**Figura 4.25 D i F**). Aquest canvi, oposat a l'observat en venes i capil·lars, podria indicar un mecanisme específic de la cèl·lula arterial en vers a la senyalització de PI3K, el qual seria capaç de refractar la sobreactivació de la via.

Tot i la clara impossibilitat de les artèries a l'expressió de *Pik3ca^{H1047R}*, vam tenir la oportunitat de confirmar el fenotip observat amb una darrera estratègia genètica; iSuRe-

Cre. En resposta a l'administració de 4-OHT, la línia iSuRe-Cre és capaç d'expressar *mTomato* seguit de l'expressió addicional de Cre, garantint així la recombinació d'un segon al·lel dependent de Cre a la mateixa cèl·lula. Així doncs, l'ús de *Bmx-CreER^{T2}*, juntament amb la línia iSuRe-Cre i l'al·lel *Pik3ca^{H1047R}* (model AEC-*Pik3ca^{H1047R/WT}*-iSuRe-Cre) (**Figura 4.26**) va fer possible descartar deficiències durant la recombinació de la mutació a les ECs arterials reportades (*mTomato⁺*).

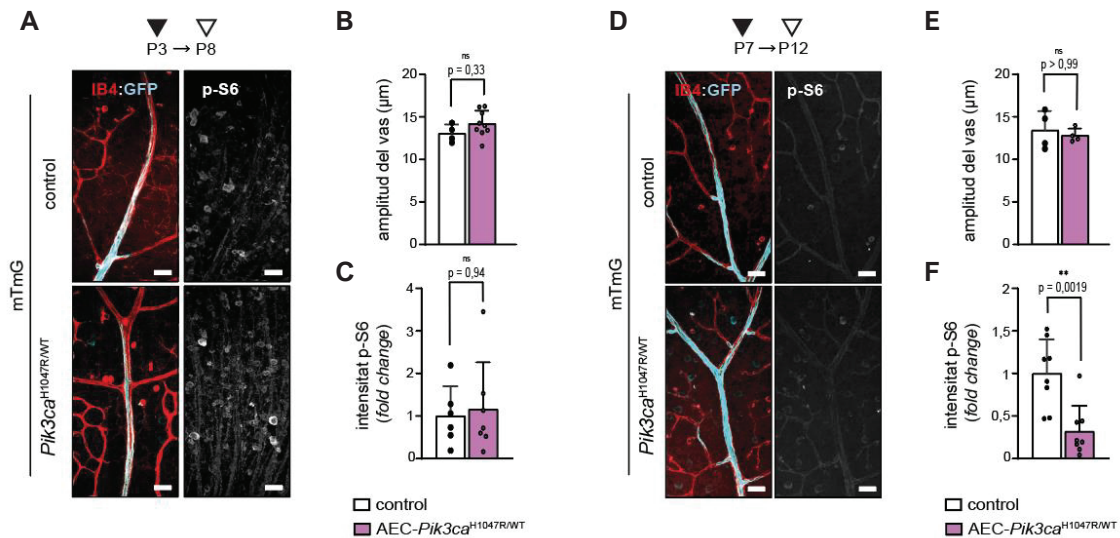


Figura 4.25. La mutació activadora *Pik3ca^{H1047R}* en cèl·lules arterials desencadena un mecanisme refractari de la via PI3K. **A.** Imatges representatives de retines AEC-*Pik3ca^{H1047R/WT}*-mTmG P8, induïdes amb 10 mg/kg de 4-OHT a P3. Escala = 30μm. **B.** Quantificació de l'amplitud de l'artèria de retines AEC-*Pik3ca^{H1047R/WT}*-mTmG P8 i els respectius controls. $n \geq 4$. **C.** Quantificació de la intensitat de la tinció p-S6 en àrees GFP⁺ de retines AEC-*Pik3ca^{H1047R/WT}*-mTmG P8 i els seus respectius controls. $n \geq 6$. **D.** Imatges representatives de retines AEC-*Pik3ca^{H1047R/WT}*-mTmG P12, induïdes amb 10 mg/kg de 4-OHT a P7. Escala = 30μm. **E.** Quantificació de l'amplitud de l'artèria de retines AEC-*Pik3ca^{H1047R/WT}*-mTmG P12 i els respectius controls. $n = 4$. **F.** Quantificació de la intensitat de la tinció p-S6 en àrees GFP⁺ de retines AEC-*Pik3ca^{H1047R/WT}*-mTmG P12 i els seus respectius controls. $n = 8$.

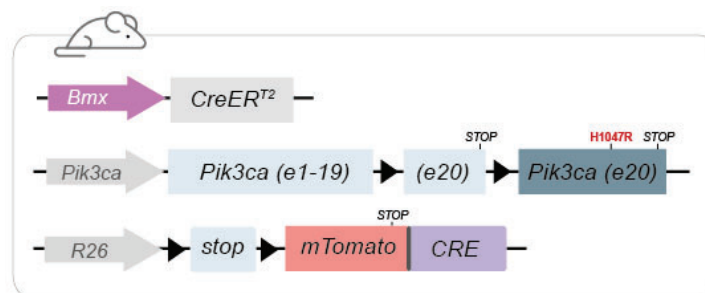


Figura 4.26. Model AEC-*Pik3ca^{H1047R/WT}*-iSuRe-Cre. A partir de l'administració de 4-OHT, la recombinasa CreER^{T2} es translocarà al nucli per recombinar els al·lells dependents de Cre. A la vegada, les cèl·lules recombinants per l'al·lel iSuRe-Cre donaran lloc a l'expressió de *mTomato* i Cre, garantint així la recombinació de l'al·lel *Pik3ca^{H1047R/WT}* en totes aquelles cèl·lules reportades. La modificació genètica tindrà lloc específicament a les AECs donat el control de Cre per el promotor de *Bmx*.

Confirmant els nostres resultats anteriors, les retines AEC-*Pik3ca*^{H1047R/WT}-iSuRe-Cre P12 (induides amb 10 mg/kg de 4-OHT a P7) van mostrar com, tot i presentar cèl·lules *mTomato*⁺ al llarg de les artèries, aquestes es mantenen fenotípicament indiferents (**Figura 4.27**).

L'absència d'una resposta de les cèl·lules arterials en vers a l'expressió de la mutació H1047R resulta especialment interessant i ens planteja qüestions en quant als principis que regeixen la biologia de la EC. Aquests resultats suggereixen que, durant la seva especialització, la EC adquireix diferents característiques que determinen la seva sensibilitat a certes fluctuacions moleculars, com és el cas de la senyalització de PI3K. Els mecanismes que regulen aquestes diferències encara són desconeguts, pel que el model descrit en aquesta tesi pot servir com a punt de partida per a la investigació dels trets moleculars responsables d'aquest fenomen.

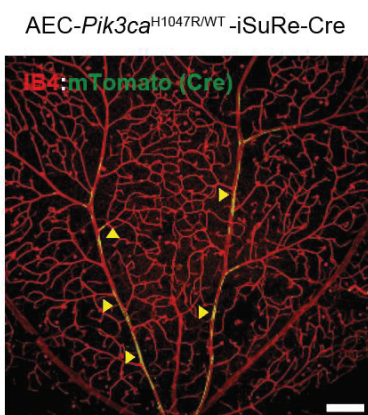


Figura 4.27. El model AEC-*Pik3ca*^{H1047R/WT}-iSuRe-Cre garanteix la recombinació de la mutació a AECs i confirma l'absència de patogenicitat a les artèries. Imatge representativa de retines AEC-*Pik3ca*^{H1047R/WT}-iSuRe-Cre P12, tractades amb 10 mg/kg de 4-OHT a P7. Escala = 150µm. Les fletxes indiquen cèl·lules *mTomato*⁺, situades al llarg de les artèries.

D'altra banda, l'absència de patogenicitat a les artèries *Pik3ca*^{H1047R} també podria explicar la raó per la qual no han estat diagnosticades malformacions arteriovenoses amb errors en aquest gen. La insensibilitat de la cèl·lula arterial a la sobreactivació de *Pik3ca* indica que aquest tipus cel·lular podria ser portador de la mutació sense mostrar cap manifestació clínica.

2.3. La sobreactivació de PI3K determina la identitat de la EC, afavorint la diferenciació venosa i capil·lar i evitant l'especificació arterial.

Certament, la EC mutant podria arribar a les artèries sense desenvolupar cap fenotip evident. Tot i així, i fent referència als resultats presentats a la secció 2.1, hem observat com la EC-*Pik3ca*^{H1047R} tendeix a expandir-se preferentment en venes i capil·lars (**Figura 4.19 C**). En considerar aquest escenari en un procés de desenvolupament i diferenciació endotelial, vam plantejar la possibilitat de que l'avantatge proliferativa en poblacions endotelials específiques podria repercutir sobre el procés de diferenciació. Es a dir, si

les cèl·lules mutants s'expandeixen i es diferencien majoritàriament en venes i capil·lars, és possible que no arribin a adquirir identitats arterials. És per aquest motiu que vam incloure l'ús d'una nova línia Cre a les nostres investigacions; *Esm1*-CreER^{T2}.

L'expressió específica d'*Esm1* a les cèl·lules *tip* del front angiogènic de la retina ha fet d'aquesta línia una opció molt recurrent per a l'estudi dels processos d'angiogènesi i migració endotelial. Tanmateix, les cèl·lules *tip* també han estat descrites com ECs compromeses a diferenciar-se en cèl·lules arterials. Estudis recents han demostrat com, després de competir al front angiogènic pel lideratge de la formació dels vasos, les cèl·lules *Esm1*⁺ adquireixen característiques arterials i migren en contra del flux sanguini per acabar formant part de l'artèria (72,73). Aquest estat de transició entre una identitat *tip* (pre-arterial) i una identitat plenament arterial, ha estat posada a prova en els següents experiments. Hem utilitzat la línia *Esm1*-CreER^{T2} amb l'objectiu d'expressar *Pik3ca*^{H1047R} a una població endotelial en transició a l'artèria, juntament amb l'al·lel reporter mTmG, per tal de visualitzar aquelles cèl·lules mutants (*Pik3ca*^{H1047R/WT}; *GFP*⁺). Aquest model és l'anomenat *Tip EC-Pik3ca*^{H1047R/WT}-mTmG (Figura 4.28).

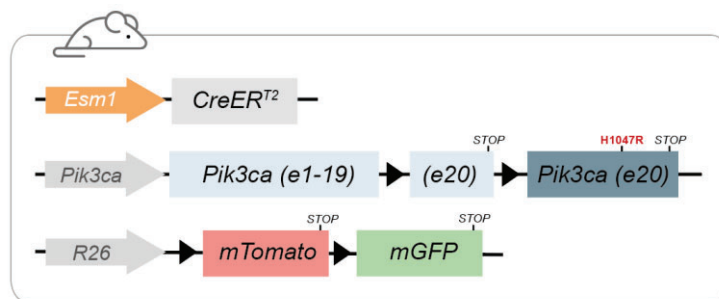


Figura 4.28. Model Tip EC-*Pik3ca*^{H1047R/WT}-mTmG. A partir de l'administració de 4-OHT, la recombinasa CreER^{T2} es translocarà al nucli per recombinar els al·lels dependents de Cre: l'exó 20 del gen *Pik3ca*, donant lloc a l'expressió de l'exó 20 portador de la mutació H1047R, i la seqüència *mTomato*, l'excisió de la qual donarà lloc a l'expressió de *mGFP*. La modificació genètica tindrà lloc a les ECs *tip* donat el control de Cre per el promotor d'*Esm1*.

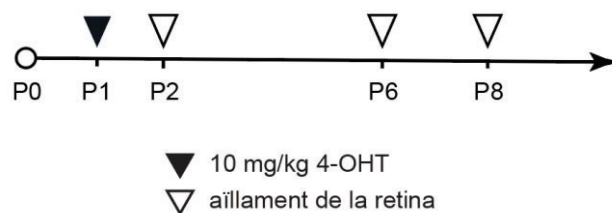


Figura 4.29. Esquema del procediment experimental per a l'estudi de la dinàmica de les ECs *tip* *Pik3ca*^{H1047R}. Inducció de la recombinació mitjançant l'administració de 10 mg/kg de 4-OHT a P1, i aïllament de la retina a P2, P6 i P8.

A fi de de traçar i analitzar el comportament de la EC *tip* al llarg de la seva transició a l'artèria, vam tractar ratolins postnats *Tip EC-Pik3ca*^{H1047R/WT}-mTmG a P1 amb 10 mg/kg de 4-OHT. A partir d'aquí, vam dur a terme aïllaments de la retina a P2, P6 i P8,

determinant l'evolució de la localització i expansió de les poblacions *tip* recombinades a P1 (**Figura 4.29**).

Les mostres analitzades a P2 mostren el punt de partida de les cèl·lules *tip* GFP⁺. La majoria de cèl·lules detectades 24 h després del tractament amb 4-OHT és mostren distribuïdes a prop del front angiogènic, en una proporció similar en el genotip mutant i el control (*Tip* EC-mTmG) (**Figura 4.30 A i B. Figura 4.31 A**). Aquestes observacions ens serveix com a referència i validen l'expressió de la mutació específicament a ECs *tip*. D'altra banda, l'anàlisi de les retines P6 i P8 va revelar un fenotip vascular clarament aberrant, mostrant grans hiperplàsies al front angiogènic (**Figura 4.30 A i B**), però també als llits capil·lars en remodelació i en la gran majoria de venes. Tot i la implicació de la cèl·lula *tip* en la diferenciació arterial, i d'acord amb els resultats dels models anteriors, les retines mutants en aquest cas tampoc mostren trets patològics a les artèries (**Figura 4.30 A i B**).

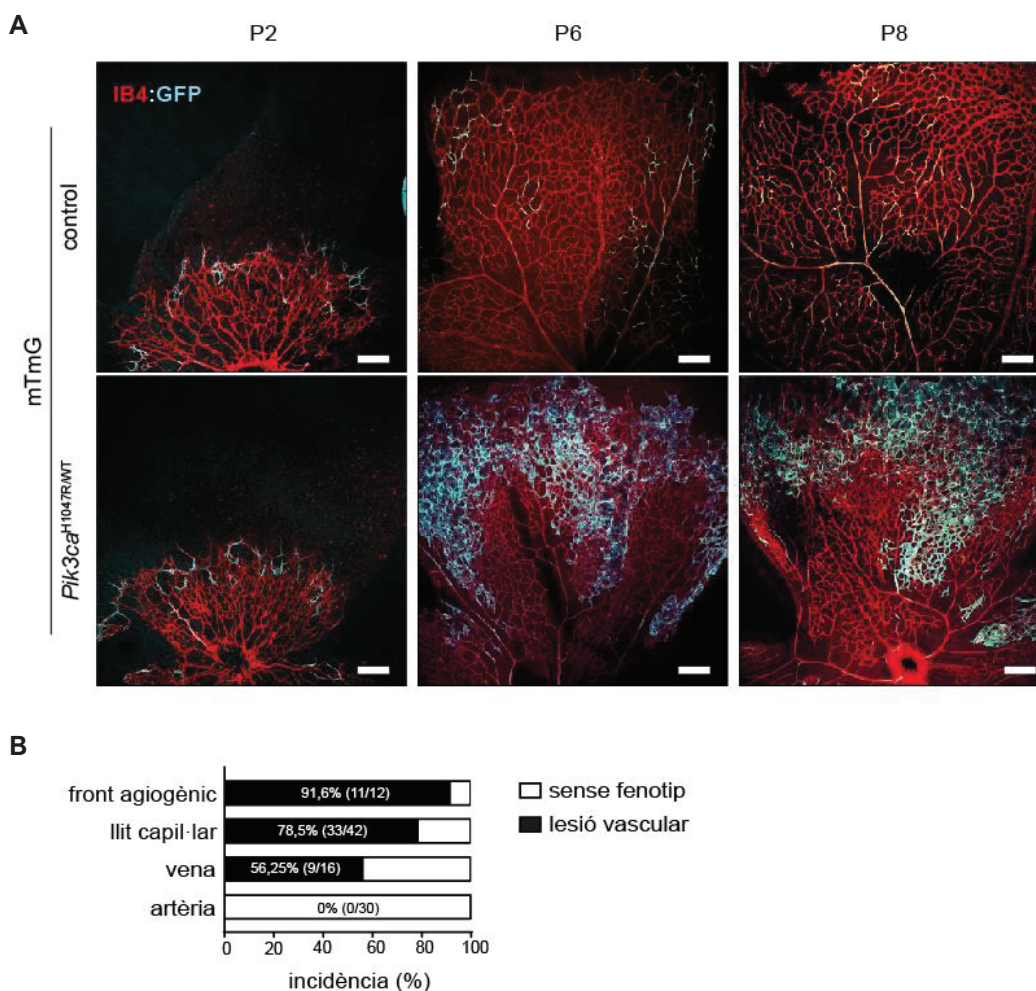


Figura 4.30. El seguiment de les cèl·lules *tip* EC-*Pik3ca*^{H1047R/WT}-mTmG revela la disrupció del procés d'especificació arterial. **A.** Imatges representatives de retines *Tip* EC-*Pik3ca*^{H1047R/WT}-mTmG P2, P6 i P8, tractades amb 10 mg/kg de 4-OHT a P1. Escala = 150μm. Utilitzades com a control retines *Tip* EC-mTmG. **B.** Quantificació de la incidència (%) de les lesions detectades en cada una de les zones vasculars analitzades (front angiogènic, llits capil·lars, venes i artèries).

Gràcies a la visualització de les cèl·lules GFP⁺, podem determinar que les cèl·lules mutants mostren una clara alteració en la seva distribució. En primer lloc, l'anàlisi del front angiogènic de retines P6 posa en evidència la disminució de cèl·lules GFP⁺ a les retines control (fruit de la seva migració als capil·lars periarterials i a l'artèria). Aquest fet s'oposa al comportament de les ECs mutants, les quals s'expandeix patològicament al front angiogènic desenvolupant grans lesions en aquesta localització (**Figura 4.31 A i B**).

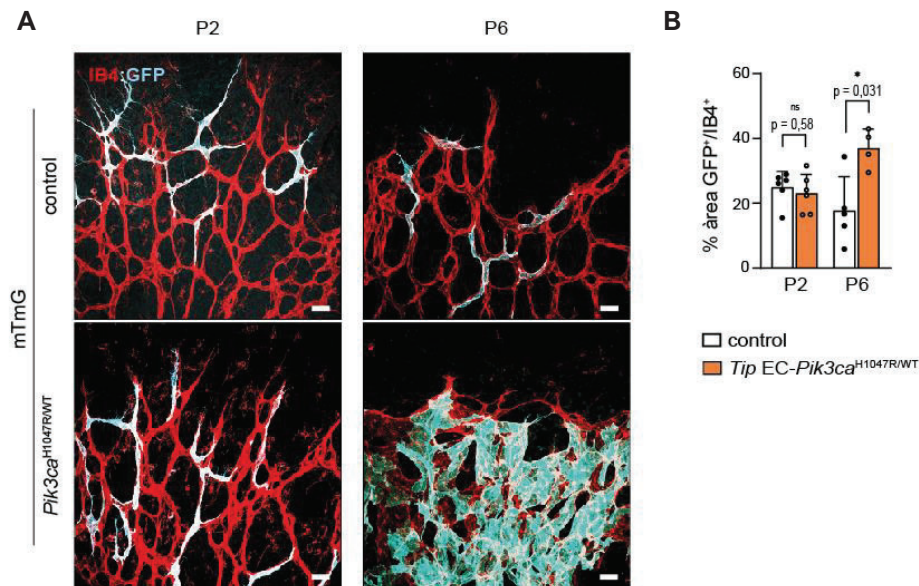


Figura 4.31. El model *Tip EC-Pik3ca^{H1047R/WT}-mTmG* s'expressa en ECs *tip* al front angiogènic i dona lloc a l'expansió clonal de les cèl·lules mutants. **A.** Imatges representatives de retines *Tip EC-Pik3ca^{H1047R/WT}-mTmG* P2 i P6, tractades amb 10 mg/kg de 4-OHT a P1. Escala = 30µm. **B.** Quantificació de l'expansió de les cèl·lules GFP⁺-*Pik3ca^{H1047R}* o GFP⁺-wt al front angiogènic en retines P2 i P6 (% àrea GFP⁺/IB4⁺). n ≥ 5.

En segon lloc, en comparar la dinàmica de les cèl·lules GFP⁺ en els diferents compartiments vasculars (capil·lars, venes o artèries) podem observar un clar contrast en els patrons de ECs *tip* *Pik3ca^{H1047R}* o control. Tal i com s'ha descrit al llarg de la literatura, a les retines P6 o P8 (tractades amb 4-OHT a P1) les cèl·lules GFP⁺ *Pik3ca^{WT}* es diferencien i ocupen artèries o capil·lars pròxims a les artèries i rarament les trobem localitzades a les venes. Pel contrari, en el cas de les cèl·lules GFP⁺ *Pik3ca^{H1047R}*, observem com aquestes canvien el seu destí endotelial i s'expandeixen patològicament a venes i capil·lars, evitant així arribar a les artèries (**Figura 4.30 A i Figura 32 A**). La quantificació de l'extensió de les cèl·lules GFP⁺ a capil·lars, venes o artèries posa en evidència la clara desregulació del procés de diferenciació. Tant a retines P6 com P8, les cèl·lules *tip* canvien per complet el seu comportament en funció de l'expressió de la mutació a *Pik3ca*, mostrant grans clons a venes i capil·lars i una significativa disminució de la seva presència en artèries (**Figura 4.32 B**).

D'altra banda, l'avaluació dels nivells de p-S6 en aquestes retines revela un augment significatiu de l'activació de PI3K/AKT/mTOR als capil·lars *Pik3ca^{H1047R}*, tant a P6 com a P8 (**Figura 4.33 A-C**). En definitiva, la sobreactivació de PI3K a les cèl·lules pre-arterials

canvia per complet el seu programa d'especificació endotelial i indueix l'expansió de les cèl·lules mutants exclusivament a venes i capil·lars.

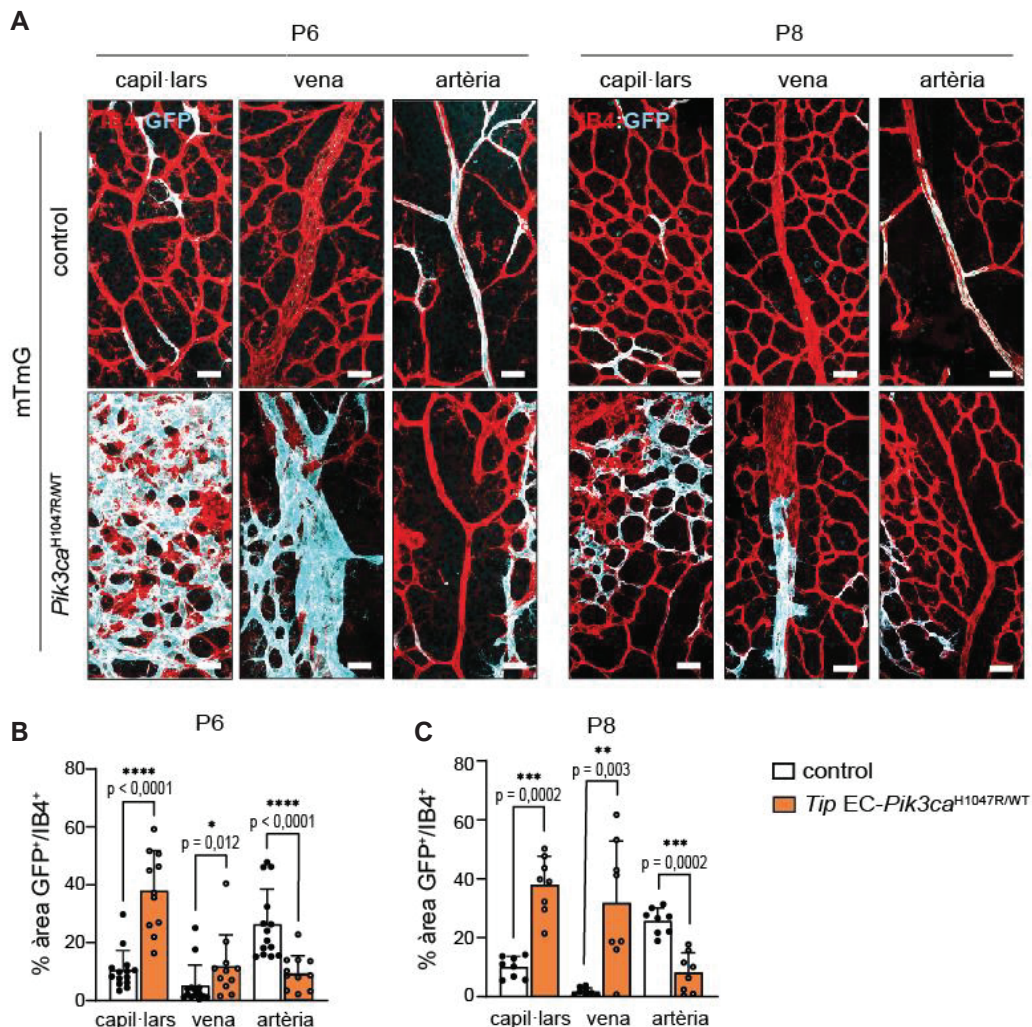


Figura 4.32. Les ECs *tip* *Pik3ca*^{H1047R} s'expandeixen patològicament a venes i capil·lars, però eviten la diferenciació a artèries. A. Imatges representatives de retines *Tip EC-Pik3ca*^{H1047R/WT}-mTmG P6 (panell esquerre) i P8 (panell dret), tractades amb 10 mg/kg de 4-OHT a P1. A cada un dels panells podem veure l'extensió de les cèl·lules GFP⁺ a cada una de les zones analitzades (capil·lars, vena o artèria). Escala = 30µm. **B.** Quantificació del % d'àrea GFP⁺ respecte al total de l'àrea IB4⁺ del vas analitzat (prenent zones capil·lars, venes o artèries concretes) en retines P6. n ≥ 11. **C.** Quantificació del % d'àrea GFP⁺ respecte al total de l'àrea IB4⁺ del vas analitzat (prenent zones capil·lars, venes o artèries concretes) en retines P8. n = 8.

D'acord amb el fenotip descrit assumim que, en retines *Pik3ca*^{H1047R}, hi haurà una disminució considerable en el nombre de cèl·lules *tip* capaces de contribuir a la formació arterial. Per aquest motiu, vam voler determinar els efectes de l'expressió de *Pik3ca*^{H1047R} a llarg termini, i especialment, les conseqüències per a la correcta formació de l'artèria. L'estudi de retines P21, tractades amb 4-OHT (10 mg/kg) a P1, va confirmar el canvi en el destí de la cèl·lula *tip*, mostrant, inclús en major proporció, l'antagonisme en la distribució de cèl·lules *Pik3ca*^{H1047R} i *Pik3ca*^{WT} (Figura 34 A i C). Tot i així, a P21, les artèries de les retines mutants presenten diàmetres comparables als dels controls i no

mostren evidències d'anormalitat estructural (**Figura 4.33 B**). Aquest fet ens indica per tant que, malgrat la modificació del destí de les ECs *tip*, les artèries són formades amb normalitat, probablement gràcies a la correcta diferenciació de les cèl·lules *tip wt* presents a la mateixa retina (no recombinants per *Pik3ca*^{H1047R}), i/o a altres subpoblacions capaces de contribuir a la formació de l'artèria.

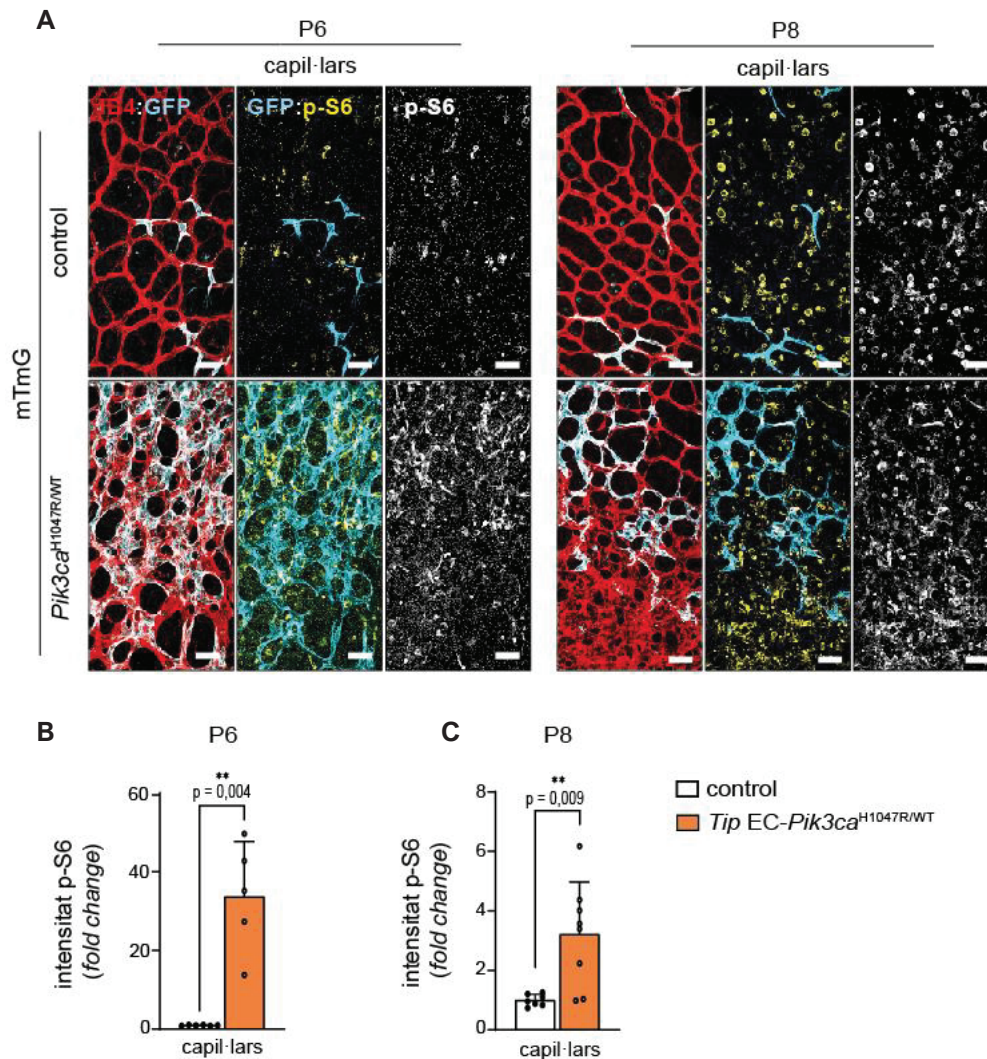


Figura 4.33. Les retines *Tip EC-Pik3ca*^{H1047R/WT}-mTmG mostren un augment en l'activació de PI3K als capil·lars. **A.** Imatges representatives dels capil·lars de retines *Tip EC-Pik3ca*^{H1047R/WT}-mTmG P6 (panell esquerre) i P8 (panell dret), tractades amb 10 mg/kg de 4-OHT a P1. A cada un dels panells podem veure la intensitat de la fosforilació de S6 específicament a les àrees GFP⁺. Escala = 30µm. **B.** Quantificació de la intensitat de p-S6 (S235/236) a l'àrea GFP⁺ de capil·lars de retines P6 *Pik3ca*^{H1047R/WT} respecte als corresponents controls (*Tip EC-mTmG*) (fold change). n ≥ 5. **C.** Quantificació de la intensitat de p-S6 (S235/236) a l'àrea GFP⁺ de capil·lars de retines P8 *Pik3ca*^{H1047R/WT} respecte als corresponents controls (*Tip EC-mTmG*) (fold change). n ≥ 7.

Finalment, per tal de corroborar que aquest fenotip és causat per l'augment de la proliferació endotelial, vam tenir retines P4 (induïdes a P1 amb 4-OHT 10 mg/kg) amb Ki67, un marcador de l'activitat del cicle cel·lular. L'aïllament de les mostres durant l'estadi inicial de la formació de les grans lesions observades a P6 o P8 ens va permetre

identificar un fenotip molt incipient, on la hiperplàsia endotelial no és tant prominent, però ja es detecta un augment significatiu de la proliferació de les cèl·lules $\text{GFP}^+ \text{Pik3ca}^{\text{H1047R}}$ (% d'ECs $\text{Ki67}^+ \text{ERG}^+$) (Figura 35 A i B).

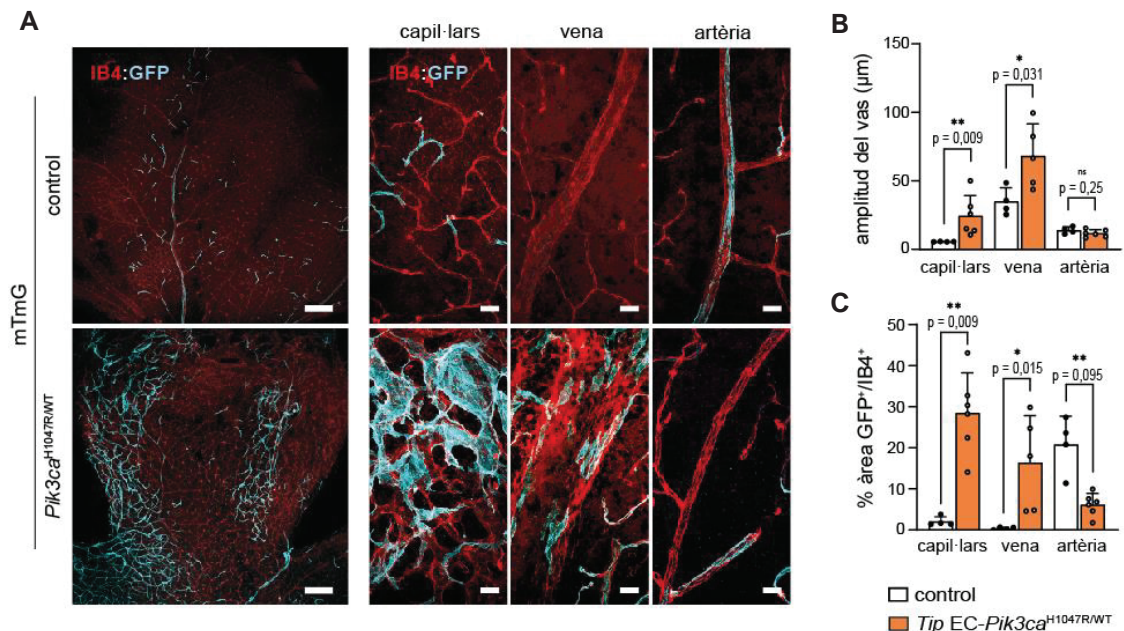


Figura 4.34. La formació de les artèries no es veu afectada per els canvis en el destí cel·lular de les ECs $\text{tip Pik3ca}^{\text{H1047R}}$. **A.** Imatges representatives de retines $\text{Tip EC-Pik3ca}^{\text{H1047R/WT}}$ -mTmG P21, tractades amb 10 mg/kg de 4-OHT a P1. Escala = 150 μm (panell esquerre), escala = 30 μm (panell dret) **B.** Quantificació de l'amplitud dels vasos (μm) en comparar retines $\text{Pik3ca}^{\text{H1047R}}$ i control (Tip EC-mTmG). $n \geq 4$. **C.** Quantificació del % d'àrea GFP^+ respecte al total de l'àrea IB4^+ del vas analitzat (prenent zones capil·lars, venes o artèries concretes) en retines P21. $n \geq 4$.

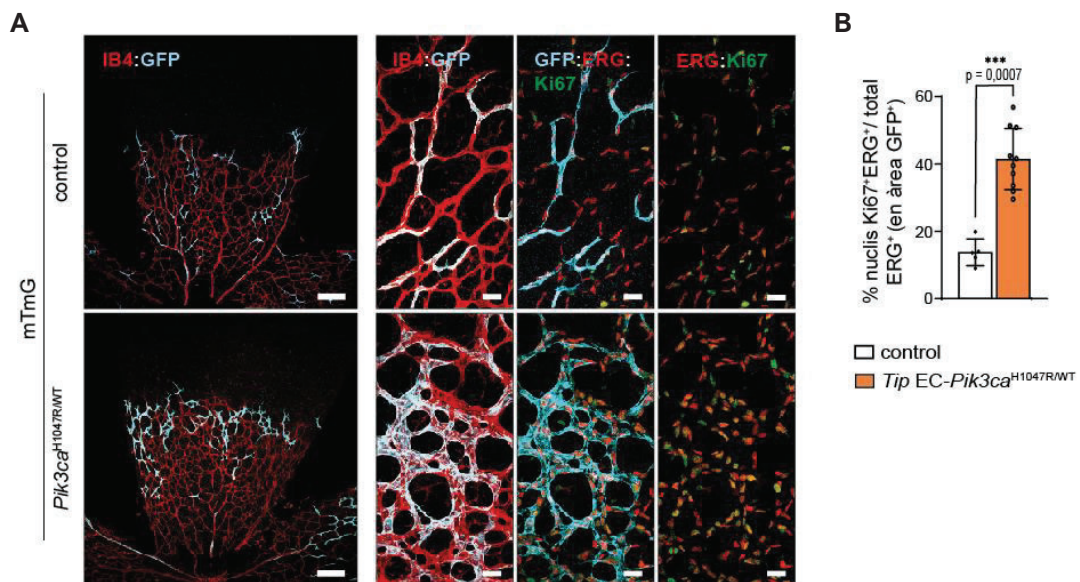


Figura 4.35. La sobreactivació de PI3K a ECs tip dona lloc a un augment de la proliferació, responsable de l'aparició de les posteriors malformacions vasculars. **A.** Imatges representatives de retines $\text{Tip EC-Pik3ca}^{\text{H1047R/WT}}$ -mTmG P4, tractades amb 10 mg/kg de 4-OHT a P1. Escala = 150 μm (panell esquerre), escala = 30 μm (panell dret). **B.** Quantificació del percentatge de cèl·lules $\text{Ki67}^+ \text{ERG}^+$ respecte al total d'ECs compreses en àrees GFP^+ . $n \geq 5$.

En resum, la sobreactivació de *Pik3ca* a la cèl·lula *tip*, una EC pre-arterial compromesa a migrar i diferenciar-se per contribuir a la formació de l'artèria, provoca un augment de la capacitat proliferativa que, a la vegada, condiciona el seu destí endotelial. Juntament amb l'augment de la proliferació, la cèl·lula mutant probablement pateix una reprogramació molecular que indueix la diferenciació a identitats venoses o capil·lars, mentre evita el seu destí endotelial predeterminat, la artèria.

2.4. Un nou i precís model per al traçat de ECs *Pik3ca*^{H1047R} corrobora la incompatibilitat de la mutació amb el procés de diferenciació arterial.

Fins al moment, hem utilitzat el gen reporter mTmG per visualitzar i traçar les cèl·lules mutants en els nostres estudis *in vivo*. Tant mateix, som conscients que aquesta aproximació experimental pot comportar algunes incongruències. La falta de correlació genètica entre la recombinació del nostre gen *Pik3ca*^{H1047R}, i la proteïna fluorescent de l'al·lel mTmG, fa que el model reporti cèl·lules on no ocorren ambdues recombinacions a la vegada. Tot i això, la gran eficiència de recombinació de l'al·lel *Pik3ca*^{H1047R} ens han permès assumir cert percentatge d'error en el nostre anàlisi (falsos positius i falsos negatius) mostrant diferències prou robustes en comparar genotips mutants i control.

A fi de validar els resultats anteriors i poder estudiar la dinàmica de les cèl·lules *tip* *Pik3ca*^{H1047R} amb major resolució i fidelitat, el nostre laboratori, en col·laboració amb el grup del doctor Rui Benedito, va desenvolupar un nou model murí: iFlu-Mosaic-*Pik3ca*^{H1047R} (**Figura 4.36 A**). A diferència del gen reporter anterior (mTmG), aquest nou model inclou l'expressió de la forma mutada de *Pik3ca* associada a l'expressió de la proteïna reportera. Per al seu disseny, es va introduir la seqüència genètica codificant per la seqüència del gen modificada (H1047R) al locus de Rosa26 (R26), sota el promotor CAG. La presència de dos parells de seqüències loxP, permet la recombinació aleatòria del primer parell (representat en vermell), el qual dona lloc a l'expressió de *nCherry* (indicant així l'absència d'expressió de *Pik3ca*^{H1047R}) (60%), o bé, a l'expressió de *Pik3ca*^{H1047R} seguida de l'expressió de *nGFP* (40%) (**Figura 36 A**). Aquesta estratègia permet el traçat de cèl·lules *Pik3ca* mutants (*nGFP*) i cèl·lules *wt* (*nCherry*) en un mateix teixit.

Cal esmentar que, en iniciar la caracterització d'aquest model, es van testar dosis de 4-OHT equiparables a les administrades en els models exposats anteriorment. Malauradament, l'eficiència de recombinació del constructe iFlu-Mosaic-*Pik3ca*^{H1047R} sembla ser més limitada, pel que vam haver d'augmentar la dosi de 4-OHT per induir la recombinació d'un número rellevant de ECs. Amb l'objectiu d'estudiar el comportament de les cèl·lules *tip* en presència o absència de la mutació activadora de *Pik3ca*, vam creuar el model iFlu-Mosaic-*Pik3ca*^{H1047R} amb la línia *Esm1-CreERT²* (model *Tip* EC-iFlu-Mosaic-*Pik3ca*^{H1047R}) (**Figura 4.36 A**) i vam analitzar les retines P8 resultants del tractament amb 50 mg/kg de 4-OHT a P1 i P2 (**Figura 4.36 B**).

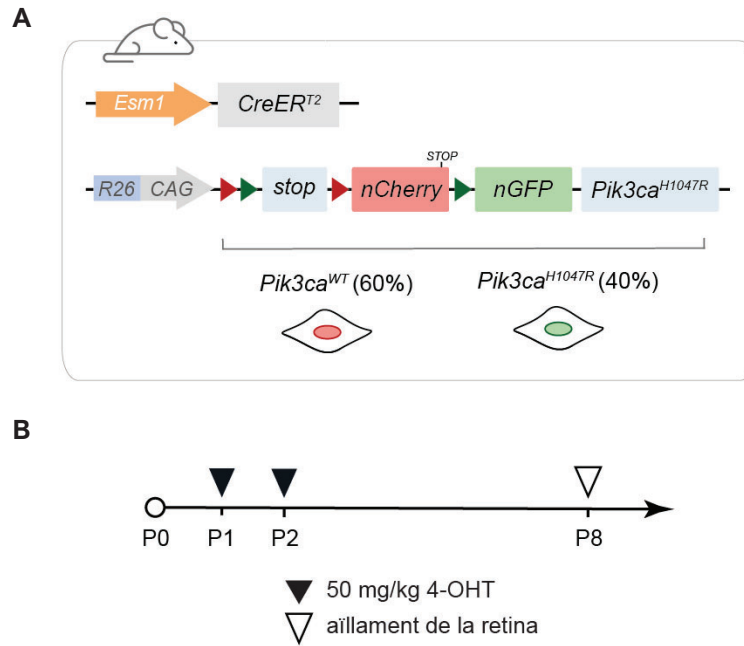


Figura 4.36. Model *Tip* EC-iFlu-Mosaic-*Pik3ca^{H1047R/WT}*. **A.** A partir de l'administració de 4-OHT, la recombinasa *CreER^{T2}* es translocarà al nucli per recombinar estocàsticament un dels dos parells de seqüències loxP indicades en verd o vermell. En un 60% dels casos, la recombinació donarà lloc a l'expressió de *Pik3ca^{WT}* i la proteïna reportera nuclear Cherry (*nCherry*). En el 40% restant, la recombinació resultarà en l'expressió de *Pik3ca^{H1047R}* i GFP nuclear (*nGFP*). En tot cas, la modificació genètica tindrà lloc a les ECs *tip* donat el control de Cre per el promotor d'*Esm1*. **B.** Esquema del procediment experimental per a l'estudi de la dinàmica de les ECs *tip* en el model iFlu-Mosaic-*Pik3ca^{H1047R/WT}*. Inducció de la recombinació mitjançant l'administració de 50 mg/kg de 4-OHT a P1 i P2, i aïllament de la retina a P8.

Les ECs de la retina postnatal *Tip* EC-iFlu-Mosaic-*Pik3ca^{H1047R}* formen nombroses malformacions vasculars al llarg del pètal (**Figura 4.37**), les quals van ser classificades com a grans o petites lesions (**Figura 4.38 A**). A diferència del model anterior (*Tip* EC-*Pik3ca^{H1047R/WT}*), el fenotip observat en aquest nou model és notablement menys agressiu, mostrant un gran nombre de lesions de menor abast, amb una morfologia més arrodonida (**Figura 4.37 i Figura 4.38 A**). Les diferències en la forma i la magnitud del fenotip observat en aquest model podrien estar associades a la disminució en el nombre de cèl·lules mutants (major mosaïcisme), així com a diferències en la regulació de l'expressió de *Pik3ca*. Respecte aquest últim punt, és important recordar que en el model iFlu-Mosaic-*Pik3ca^{H1047R}*, l'expressió de p110α no és troba controlada pel seu promotor endògen, sinó per CAG, un promotor sintètic. D'altra banda, la introducció del constructe en un locus diferent comporta que, a més a més de l'expressió de *Pik3ca* a R26, la mateixa cèl·lula mantingui també l'expressió de la proteïna endògena, un fet que podria provocar fluctuacions en els nivells de p110α determinants per al comportament endotelial.

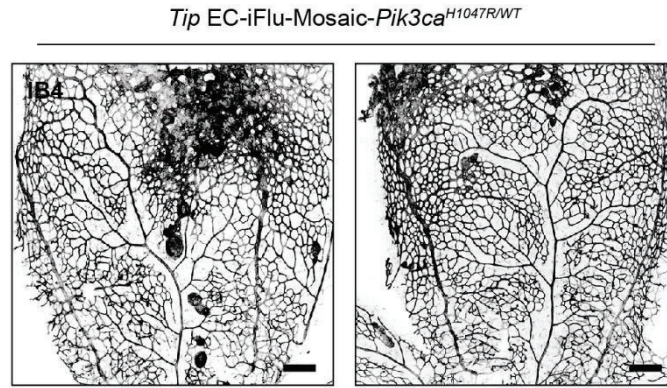


Figura 4.37. El model *Tip EC-iFlu-Mosaic-Pik3ca^{H1047R/WT}* desenvolupa nombroses malformacions al llarg del plexe vascular. Imatges representatives de retines *Tip EC-iFlu-Mosaic-Pik3ca^{H1047R/WT}* P8, injectades amb 50mg/kg de 4-OHT a P1 i P2.

La classificació de les malformacions d'acord amb la seva localització va revelar certa tendència a formar-se al front angiogènic, capil·lars, venes o al voltant de les artèries. Pel contrari, la presència de lesions al voltant de venes o a les mateixes artèries resulta anecdòtica (**Figura 4.38 B**).

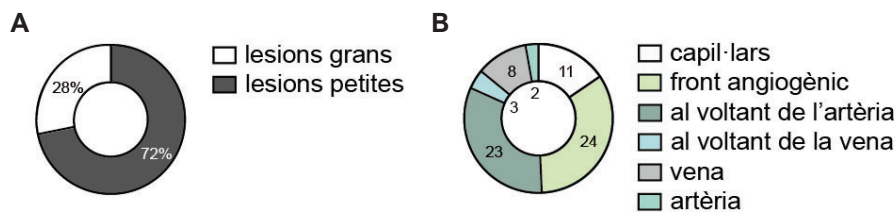


Figura 4.38. Les lesions vasculars de les retines *tip EC-iFlu-Mosaic-Pik3ca^{H1047R/WT}* són més petites i contingudes i es localitzen majoritàriament a capil·lars i al voltant de les artèries. (esquerre) Classificació de les lesions observades a les retines *Tip EC-iFlu-Mosaic-Pik3ca^{H1047R/WT}* P8, injectades amb 50mg/kg de 4-OHT a P1 i P2 en relació a la seva mida. (dreta) Classificació de les lesions d'acord amb la seva localització.

En quant a la dinàmica de les ECs, la gran resolució del model proposat en aquesta secció, va permetre identificar els nuclis de cèl·lules *Pik3ca^{WT}* (en vermell, *nCherry*) o *Pik3ca^{H1047R}* (en verd, *nGFP*). Tan sols les cèl·lules *wt* són capaces d'adquirir posicions arterials i, inclús expandir-se a les artèries. Pel contrari, les cèl·lules mutants són, majoritàriament, localitzades al fron angiogènic i a capil·lars propers a venes i artèries, formant part d'hiperplàsies clonals (**Figura 4.39**). És interessant com, tot i aconseguir apropar-se molt a les artèries, les cèl·lules *Pik3ca^{H1047R}* no són capaces d'entrar-hi i queden excloses d'aquests vasos.

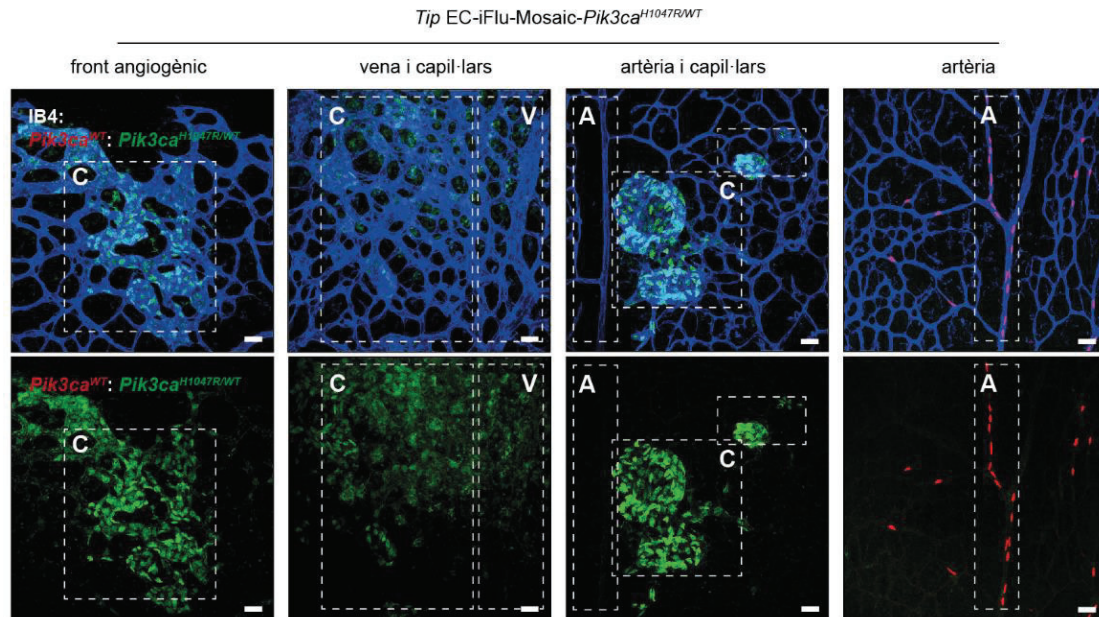


Figura 4.39. Només les EC *tip* *Pik3ca*^{WT} són capaces d'adquirir identitats arterials i contribuir a la formació de les artèries. **A.** Imatges representatives de retines *Tip* EC-iFlu-Mosaic-*Pik3ca*^{H1047R/WT} P8, injectades amb 50mg/kg de 4-OHT a P1 i P2. De dreta a esquerra, imatges del front angiogènic, vena i capil·lars circumdants, artèria i capil·lars circumdants, i artèria. Els requadres indiquen les zones amb presència de cèl·lules recombinants, on C indica capil·lars, A, artèria i V, vena. Escala = 30 μm.

En línia amb el fenotip observat, la quantificació de la posició de cada una de les cèl·lules reportades en aquestes retines determina una clara segregació en funció del genotip de *Pik3ca*. Les cèl·lules *Pik3ca*^{WT} arriben a ocupar posicions arterials en gairebé el 40% dels casos. Pel contrari, les ECs reportades com a *Pik3ca*^{H1047R} no són capaces d'adquirir identitats arterials, i tan sols un 1,5% han estat localitzades a les artèries (**Figura 4.40**). Aquestes dades confirmen la hipòtesis plantejada, la qual proposa que la sobreactivació de PI3K és determinant per a la decisió del destí endotelial, afavorint identitats venoses o capil·lars, però repel·lint l'especificació arterial predeterminada a les ECs *tip*.

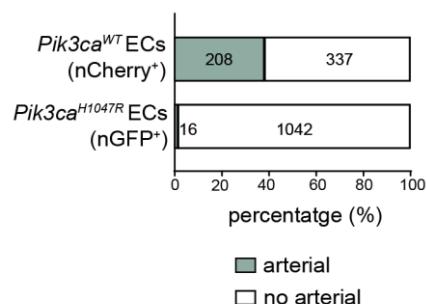


Figura 4.40. Les ECs portadores de la mutació *Pik3ca*^{H1047R} queden excloses de l'artèria i s'expandeixen patològicament en venes i capil·lars. Quantificació del percentatge de nuclis *Pik3ca*^{WT} (nCherry⁺) i *Pik3ca*^{H1047R} (nGFP⁺) en posicions arterial vs no arterials en retines *Tip* EC-iFlu-Mosaic-*Pik3ca*^{H1047R/WT} P8, induïdes amb 50mg/kg de 4-OHT a P1 i P2. n = 10 (incloent la quantificació d'un total de 576 ECs *Pik3ca*^{WT} i 1058 ECs *Pik3ca*^{H1047R}).

3. Objectiu 3: Desxifrar els mecanismes moleculars implicats en les diferències fenotípiques durant l'origen i especificació molecular dels mutants *Pik3ca*^{H1047R}.

3.1. L'expressió de COUP-TFII és regulada per l'activitat de PI3Kα

D'acord amb les nostres dades, l'expressió de la mutació *Pik3ca*^{H1047R} provoca una sobreactivació de la via PI3K específicament a venes i capil·lars. Aquesta repercuteix directament en la proliferació endotelial i condiona la diferenciació cel·lular, afavorint identitats venoses o capil·lars, i evitant l'especificació arterial. Estudis anteriors, suggereixen que COUP-TFII (codificat pel gen *NR2F2*) controla la diferenciació arteriovenosa, reprimint directament l'expressió gènica de l'artèria, activant un programa genètic venós i regulant directament la progressió del cicle cel·lular. Sota aquesta premissa, proposem COUP-TFII com un possible efector del desencadenament del fenotip induït per l'expressió de *Pik3ca*^{H1047R} a les cèl·lules endotelials. Donada la implicació d'aquest factor de transcripció en el control dels processos biològics identificats durant l'origen de les malformacions vasculars *Pik3ca*^{H1047R} (especificació arteriovenosa i proliferació), vam voler determinar els seus nivells d'expressió i traducció en cèl·lules mLEC *Pik3ca*^{H1047R/WT}.

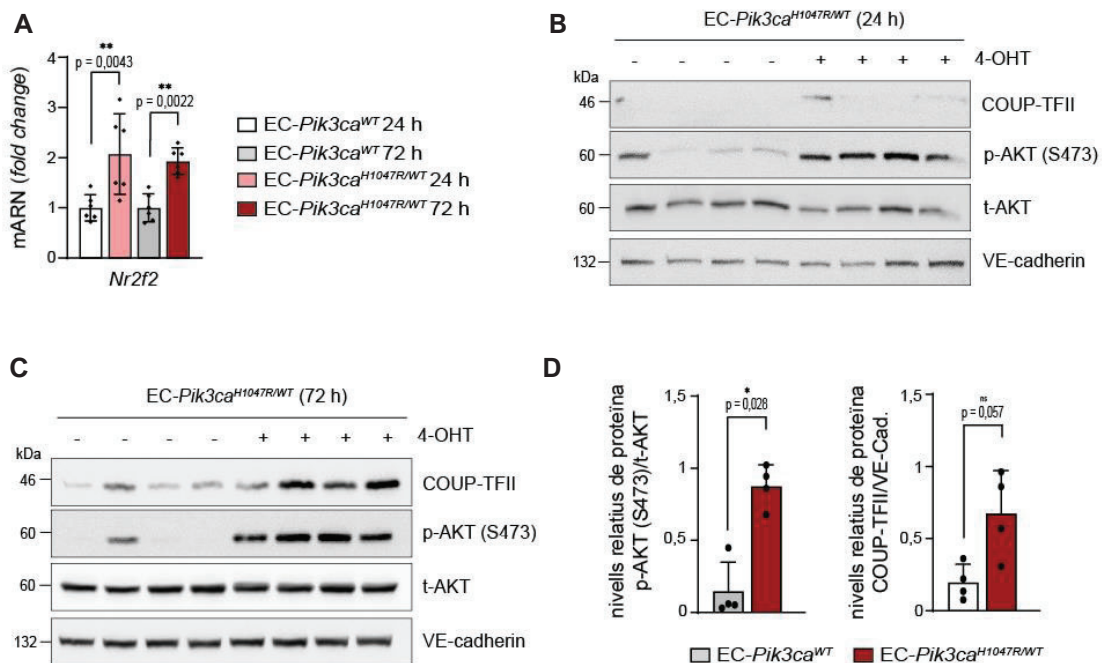


Figura 4.41. *Pik3ca*^{H1047R} induïx l'increment de COUP-TFII. **A.** PCR quantitativa per a l'anàlisi dels nivells de mARN de *Nr2f2* (COUP-TFII) a mLECs EC-*Pik3ca*^{H1047R/WT} 24 o 72 h després del tractament amb 4-OHT 2mM o etanol (control). **B i C.** Immunodetecció dels nivells d'activació de PI3K (p-AKT S473) i els nivells de COUP-TFII en lisats de mLECs EC-*Pik3ca*^{H1047R/WT} induïdes durant 6 h amb 4-OHT 2mM o etanol (control) i analitzades 24 o 72 h després. *n* = 4. **D.** Quantificació dels nivells relatius de proteïna 72 h després de la inducció amb 4-OHT o etanol. Els nivells de p-AKT (S473) i COUP-TFII han estat normalitzats per la senyal d'AKT total i VE-Cadherin, respectivament. *n* = 4.

L'expressió de *Pik3ca*^{H1047R} *in vitro* induïx un significatiu augment de l'expressió (mARN) de *Nr2f2*, tan sols 24 hores després de la inducció amb 4-OHT, i sostinguda almenys durant 72 hores (**Figura 4.41 A**). D'altra banda, tot i que els nivells proteics de COUP-TFII ja mostren un lleuger augment 24 hores després de l'expressió de *Pik3ca*^{H1047R} (**Figura 4.41 B**), és a les 72 hores quan detectem un augment significatiu d'aquest factor de transcripció (**Figura 4.41 C i D**). En base a aquests resultats podríem deduir que la sobreactivació de p110α desencadena un mecanisme molecular que induïx una major transcripció de *Nr2f2*, repercutint directament en els nivells de traducció i síntesi de COUP-TFII a la cèl·lula mutant.

Per tal de validar la relació entre la sobreactivació de PI3K i l'augment de COUP-TFII, vam tractar les ECs *Pik3ca*^{H1047R} amb Alpelisib (BYL719), un potent i específic inhibidor de p110α. Les mLECs EC-*Pik3ca*^{H1047R} (induïdes amb 4-OHT 2mM o etanol durant 6 hores) van ser tractades amb diferents dosis de BYL719 (0, 0,2, 1 i 5 μM) durant 66 h. La inhibició de p110α va provocar la disminució de la fosforilació dels efectors de la via, AKT i S6 en proporció a la dosi aplicada. Amb un patró similar, la presència de COUP-TFII augmenta en comparar cèl·lules control (etanol) i mutants (4-OHT) tractades amb vehicle. Tanmateix, les dosis més altes d'Alpelisib (1-5 μM) aconseguïen revertir el fenotip i restablir els nivells de COUP-TFII als observats en cèl·lules *Pik3ca*^{wt} (control) (**Figura 4.42 A**). En analitzar l'expressió de *Nr2f2* sota aquestes mateixes condicions, el tractament amb BYL719 5 μM va induir el rescat dels seus nivells basals, tant 24 com 72 h després de la inducció de la mutació (**Figura 4.42 B**). En conjunt, aquestes dades apunten a COUP-TFII com un possible efector de la via PI3K, ja que tant l'expressió com la traducció proteica d'aquest factor de transcripció sembla ser regulada d'acord amb les fluctuacions de l'activitat de p110α.

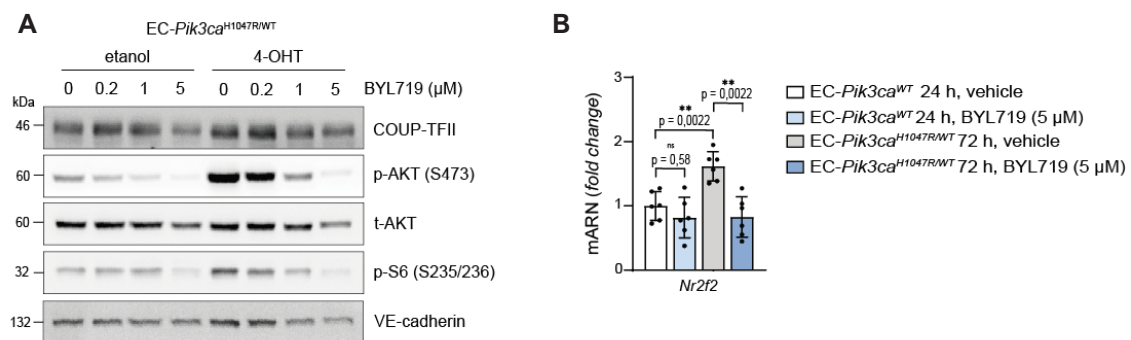


Figura 4.42. La inhibició de PI3Kα reverteix la sobreexpressió de COUP-TFII a les cèl·lules *Pik3ca*^{H1047R}. **A.** Immunodetecció dels nivells d'activació de PI3K (p-AKT S473 i pS6 S235/236) i els nivells de COUP-TFII en lisats de mLECs EC-*Pik3ca*^{H1047R/WT} induïdes durant 6 h amb 4-OHT 2mM o etanol (control) i tractades amb BYL719 0 (vehicle), 0,2, 1 o 5 μM durant 66 h. **B.** PCR quantitativa per a l'anàlisi dels nivells de mARN de *Nr2f2* en mLECs EC-*Pik3ca*^{H1047R/WT} induïdes amb 4-OHT o etanol (control) i tractades amb BYL719 5 μM o vehicle fins a les 24 o les 72 h posteriors a la inducció. n = 6.

3.2. Identificació del perfil transcripcional responsable de la regulació transcripcional de COUP-TFII mediada per PI3K α .

Donada la repercussió de la senyalització de PI3K sobre l'expressió de COUP-TFII, ens vam disposar a avaluar amb més profunditat els possibles canvis transcripcionals resultants de l'eix de senyalització PI3K/COUP-TFII. L'anàlisi transcriptòmic de les cèl·lules EC-*Pik3ca*^{H1047R/WT} (generat anteriorment al nostre laboratori) (276), així com dues signatures transcripcionals publicades per un altre grup de recerca (114), ens van permetre determinar una signatura genètica comú per a la sobreactivació de PI3K, la regulació transcripcional de COUP-TFII i el perfil transcriptòmic propi de la identitat venosa. Més concretament, vam comparar els gens diferencialment expressats en mLECs *Pik3ca*^{H1047R}, amb la signatura resultant de comparar HUAECs (hECs arterials) *versus* HUVECs (hECs venoses) i l'anàlisi transcriptòmic de HUVECs *NR2F2 knock-down* (KD) *versus* el pertinent control *NR2F2-wt* (**Figura 4.43**).



Figura 4.43. Representació gràfica de l'anàlisi transcripcional comparatiu per a l'obtenció de la signatura comú entre la senyalització de PI3K, COUP-TFII i la identitat endotelial venosa. Les bases de dades analitzades han estat obtingudes a partir de les publicacions de *Kobialka & Sabata et al. 2022* (*Pik3ca*^{H1047R} vs control) i *Sissaoi et al. 2017* (HUAECs vs HUVECs i *NR2F2-KD* vs control).

L'anàlisi comparatiu entre aquests 3 perfils genètics va determinar una signatura comú de 18 gens, 10 d'ells sobreexpressats a cèl·lules *Pik3ca*^{H1047R} i HUVECs, però reduïts en cèl·lules *NR2F2-KD*. La resta (8 gens) segueixen la trajectòria oposada, i per tant, disminueixen en vers a la sobreactivació de PI3K, es troben sobrerrepresentats en HUAECs i pateixen un increment en vers a la deleció de COUP-TFII (**Figura 4.44**). En base a la recerca bibliogràfica dels gens identificats, dos d'ells van resultar especialment interessants. Per una banda, *Ephb4* és considerat un receptor essencial per a la segregació arteriovenosa durant la diferenciació endotelial, orquestrant l'especificació venosa i mantenint-se com a marcador venós a l'endoteli madur. En concordança, *Ephb4* apareix sobreexpressat en mLECs *Pik3ca*-mutants, i disminuït en comparar HUAECs i HUVECs, així com en inhibir COUP-TFII. D'altra banda, *Cxcr4*, un conegut marcador arterial amb especial importància en el fenotip de la EC *tip*, segueix el patró oposat. L'evident implicació d'aquests dos gens en la regulació de la identitat endotelial, així com la seva reconeguda relació amb COUP-TFII, fan d'aquestes proteïnes dos interessants

components de la signatura descrita, amb potencial per esdevenir factors determinants en el context de les malformacions vasculars i el fenotip descrit a llarg de les seccions anteriors.

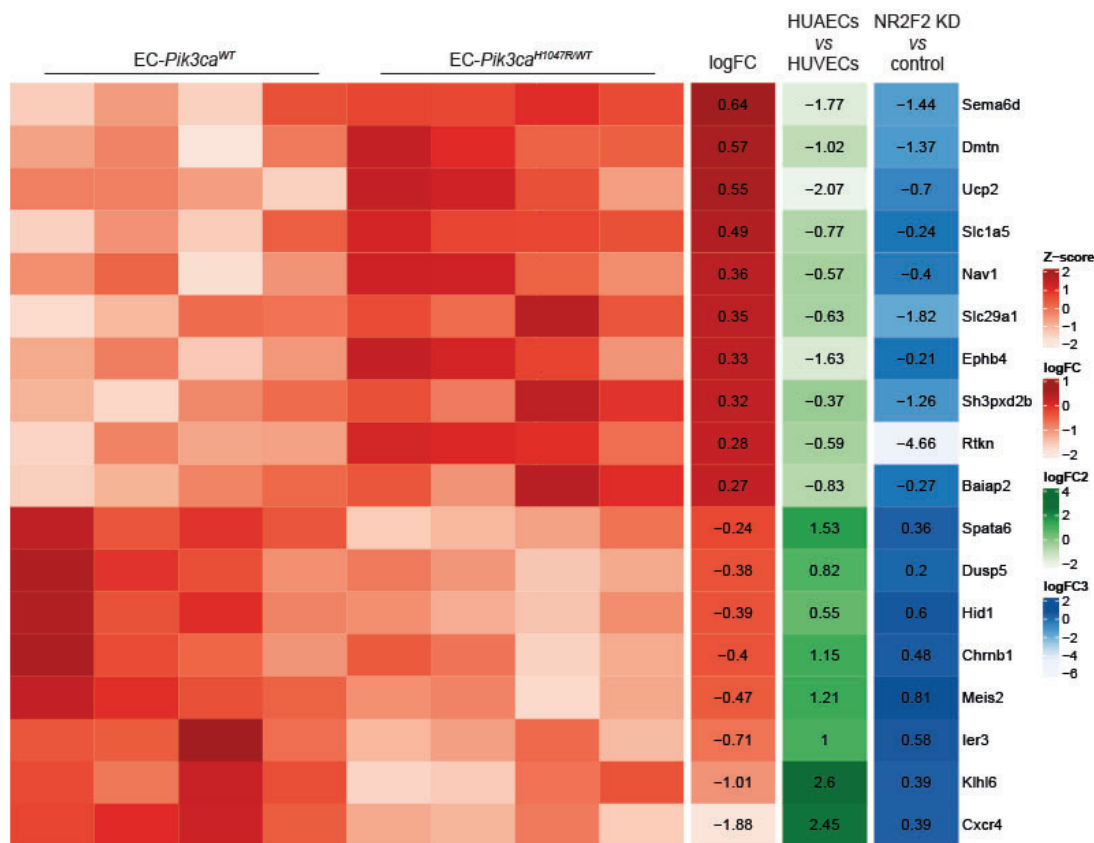


Figura 4.44. L'anàlisi transcripcional de la senyalització de PI3K, COUP-TFII i la identitat endotelial venosa dona lloc a una signatura comú. Els nivells transcripcionals dels gens per a cada una de les bases de dades analitzades es representen en tonalitats vermelles (*Pik3ca*^{H1047R/WT} vs control), verdes (HUAECs vs HUVECs) o blaves (HUVECs NR2F2 KD vs control). Els números indicats en cada una de les caselles corresponen al *log. Fold Change* de cada un dels gens.

L'expressió diferencial de *Ephb4* i *Cxcr4* en resposta a l'expressió de *Pik3ca*^{H1047R} va ser validada per PCR quantitativa en cèl·lules EC-*Pik3ca*^{H1047R} tractades amb 4-OHT o etanol 2 mM durant 6 h i cultivades durant 24 o 72 h. Els resultats van confirmar la ràpida i significativa sobreexpressió d'*Ephb4* i la inhibició de la transcripció de *Cxcr4* a les cèl·lules mutants (**Figura 4.45 A**). De la mateixa manera que COUP-TFII, el tractament amb Alpelisib (BYL719) 5 µM va ser capaç de revertir els nivells de transcripció d'*Ephb4* i *Cxcr4* a les cèl·lules mutants. En especial, *Cxcr4* ha demostrat una gran sensibilitat als canvis en l'activació de PI3K, augmentant considerablement la seva expressió en presència de l'inhibidor BYL719, tant en cèl·lules *Pik3ca*-mutants com *wt* (**Figura 4.45 B**).

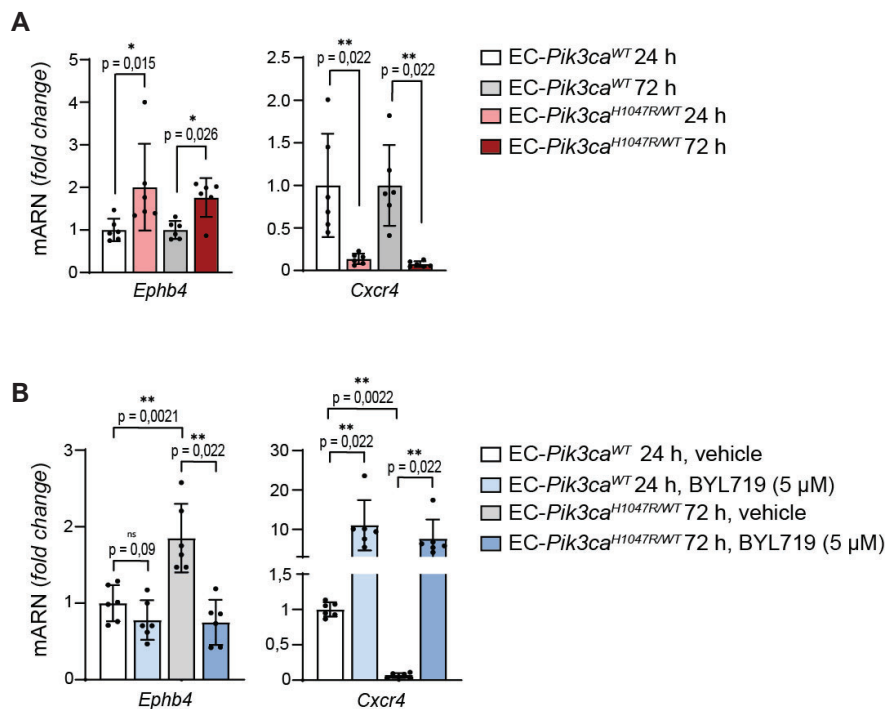


Figura 4.45. EPHB4 i CXCR4, dues proteïnes implicades en la identitat endotelial, formen part de la signatura de PI3K/COUP-TFII. **A.** PCR quantitativa per a l'anàlisi dels nivells de mRNA de *Ephb4* i *Cxcr4* en mLECs EC-*Pik3ca*^{H1047R/WT}, 24 o 72 h després del tractament amb 4-OHT 2mM o etanol (control). n = 6. **B.** PCR quantitativa per a l'anàlisi dels nivells de mRNA de *Ephb4* i *Cxcr4* en mLECs EC-*Pik3ca*^{H1047R/WT} induïdes amb 4-OHT 2mM o etanol (control) i tractades amb BYL719 5 µM o vehicle fins les 24 o les 72 h. n = 6.

3.3. La inhibició farmacològica de COUP-TFII podria limitar l'expansió patològica de les cèl·lules *Pik3ca*^{H1047R}.

Els resultats anteriors han aportat clares evidències de la relació entre l'activació de PI3K i l'expressió de COUP-TFII, i l'impacte d'aquest en la transcripció d'un conjunt de gens que podrien estar implicats en el fenotip patològic de *Pik3ca*^{H1047R}. Per comprovar l'impacte d'aquest factor de transcripció en el desenvolupament de les anormalitats vasculars descrites, vam voler testar la seva inhibició farmacològica *in vivo*.

CIA1 és un inhibidor al·lostèric de COUP-TFII, el qual s'uneix al domini d'unió a lligands, essencial per al reclutament d'altres reguladors transcripcionals, però que no afecta a la capacitat de COUP-TFII per unir-se a l'ADN. En base a l'efectivitat de CIA1 com agent antitumoral i antiangiogènica demostrada en anteriors estudis *in vivo* (283), vam utilitzar dosis similars a les publicades per avaluar l'efecte d'aquest inhibidor en el nostre model de retina *Tip* EC-*Pik3ca*^{H1047R/WT}-mTmG. Després de la inducció de la recombinació a P1 (10mg/kg de 4-OHT) els neonats van ser tractats amb CIA1 (2,6 mg/kg) o vehicle a P4 i P5, el període durant el que s'estableixen els defectes vasculars (**Figura 4.16 i Figura 4.35**). L'anàlisi de les retines es va dur a terme a P6 i a P8 (**Figura 4.46**).

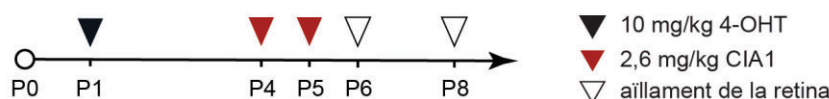


Figura 4.46. Esquema del procediment experimental per al rescat farmacològic de les lesions vasculars *Pik3ca*^{H1047R} mitjançant l'ús de l'inhibidor de COUP-TFII CIA1. Inducció de la recombinació mitjançant l'administració de 10 mg/kg de 4-OHT a P1, administració de 2,6 mg/kg del fàrmac CIA1 a P4 i P5, i aïllament de la retina a P6 o P8.

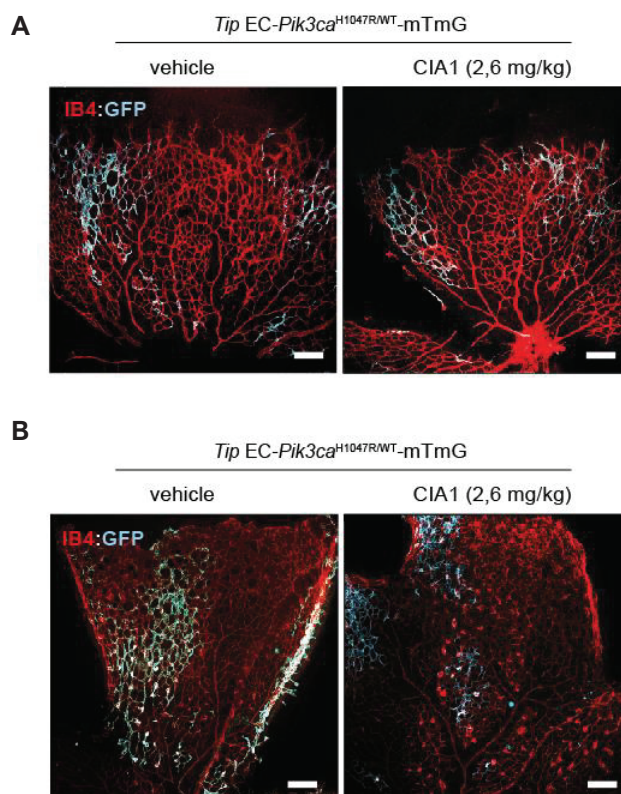


Figura 4.47. La inhibició farmacològica de COUP-TFII no és suficient per revertir el fenotip de *Pik3ca*^{H1047R}. Imatges representatives de retines Tip EC-*Pik3ca*^{H1047R/WT}-mTmG induïdes amb 10 mg/kg de 4-OHT a P1, tractades amb 2,6 mg/kg de CIA1 o vehicle a P4 i P5, i analitzades a P6 (A) o P8 (B). Escala = 150µm.

Les retines tractades amb CIA1, tant a P6 com a P8, van mostrar fenotips molt variables, sense evidències evidents de rescat fenotípic en comparació amb els controls mutants (*Tip EC-Pik3ca*^{H1047R}) tractats amb vehicle. No va ser possible detectar disminucions notables de la hiperplàsia vascular, ni vam poder detectar una recuperació de la migració de les cèl·lules GFP⁺ a les posicions arterials. Tot i així, els animals tractats amb el fàrmac semblen mostrar clons GFP⁺ més reduïts, especialment en les retines analitzades a P6. Caldrà augmentar la mida mostral de l'experiment per poder quantificar i determinar l'efecte de la inhibició farmacològica de COUP-TFII, així com considerar dosis més altes de CIA1 o una administració més continuada del fàrmac al llarg del desenvolupament vascular per tal garantir la correcta cinètica farmacològica del compost.

Per fer-ho, vam incorporar la línia COUP-TFII KO (*Nr2f2*^{flox/flox}) a la nostra colònia animal, la qual és portadora de l'al·lel codificant per COUP-TFII flanquejat per dues seqüències loxP, que, en recombinar, donen lloc a la deleció del gen, i per tant, a la absència de la proteïna. Per tal d'induir la deleció completa de COUP-TFII aquest al·lel ha estat mantingut en homozigosi i creuat al llarg de diverses generacions en combinació amb la resta de línies transgèniques que ens han permès constituir dos models d'estudi.

Per una banda, es va combinar *Nr2f2*^{flox/flox} amb el model *Tip-EC Pik3ca*^{H1047R/WT}-mTmG (**Figura 4.48 A**). La combinació de la línia *Esm1-CreER*^{T2} amb els tres al·lels induïbles per Cre (*Pik3ca*^{H1047R}, mTmG i *Nr2f2*^{flox/flox}) presenta certes limitacions. Les diferències en l'eficiència de recombinació dels diferents constructes que constitueixen el model poden comportar desequilibris en el nombre de cèl·lules recombinants per cada un d'ells. Tot i així, la robustesa del fenotip podria ser suficient per mostrar la prevenció parcial de la hiperplàsia vascular i la migració de part de les cèl·lules *Pik3ca*^{H1047R};COUP-TFII KO a posicions arterials.

D'altra banda, i tenint en ment les mancances del model anterior, també hem creuat la línia *Nr2f2*^{flox/flox} amb el model iFlu-Mosaic-*Pik3ca*^{H1047R} (**Figura 4.48 B**). En aquest cas, la gran resolució per a la visualització de les cèl·lules *Pik3ca*-mutants i *Pik3ca*-wt podria ser clau per a la detecció d'un rescat fenotípic. A més a més, el nombre d'al·lels dependents de Cre és menor i en una mateixa retina podem analitzar el comportament tant de cèl·lules mutants com de cèl·lules wt.

En qualsevol dels casos, caldrà explorar diverses opcions en quant al temps i les dosis de 4-OHT per tal d'optimitzar els models proposats i avaluar de manera efectiva la inhibició genètica de COUP-TFII. Ambdós models es troben actualment disponibles a la nostra colònia i les retines postnatales d'aquests animals seran analitzades molt aviat per comprovar l'impacte de COUP-TFII durant el desenvolupament de les malformacions vasculars i la segregació arteriovenosa de les ECs *Pik3ca*^{H1047R} *in vivo*.

4. Objectiu 4: Determinar el perfil metabòlic implicat en la patogènesi de les malformacions vasculars causades per *Pik3ca*^{H1047R} mitjançant l'anàlisi metabolòmic de les cèl·lules endotelials mutants.

4.1. Estudi metabolòmic de les ECs *Pik3ca*^{H1047R}.

Per al manteniment de l'homeòstasi vascular, les ECs han desenvolupat una xarxa metabòlica complexa, capaç d'adaptar-se al seu entorn i fer ús dels metabòlits per a la regulació de diverses funcions cel·lulars com la proliferació, la quiescència o la diferenciació cel·lular. En els últims anys, s'ha demostrat que la incorrecta adaptació o desregulació del metabolisme endotelial contribueix a la patologia d'una gran varietat de trastorns vasculars, conduint a la disfunció endotelial o el sobrecreixement angiogènic. En aquest escenari, el metabolisme de la EC ha pres gran importància en el camp de la biologia vascular i presenta noves oportunitats per a les teràpies dirigides.

Com sabem, l'origen de les malformacions vasculars derivades de mutants *PIK3CA*^{H1047R} rau en el sobrecreixement vascular, associat a l'increment de la proliferació endotelial. És per aquest motiu que creiem que la sustentació d'aquest fenotip requereix d'una important reprogramació metabòlica que alimenti i promogui el creixement de les lesions. Per determinar els canvis en perfil metabòlic resultant de l'expressió de *Pik3ca*^{H1047R} vam generar 4 replicats biològics de mLECs *Pik3ca*^{H1047R} (*Pdgfb-CreER*^{T2}; *Pik3ca*^{H1047R/WT}), els quals van ser tractats amb 4-OHT o etanol (control wt) 2mM durant 6 h i preparats per al seu anàlisi després de 48 h en cultiu. En col·laboració amb el laboratori del doctor Jason Locasale, els metabòlits extrets de cada mostra van ser analitzats per cromatografia líquida-espectrometria de masses (LC-MS). L'anàlisi bioinformàtic de l'estudi va identificar 153 metabòlits diferencialment representats en comparar cèl·lules *Pik3ca*^{H1047R} amb els respectius controls.

En classificar els metabòlits (la majoria d'ells sobre representats a les cèl·lules mutants) d'acord amb les vies metabòliques on prenen part, aquests van ser agrupats en 4 blocs diferents: síntesi de pirimidines i cicle de la urea, glicòlisi i cicle dels àcids tricarboxílics (TCA), metabolisme de la metionina i el glutatió, i síntesi d'hexosamines i via de les pentoses fosfat (**Figura 4.49**). En conjunt, aquestes dades suggereixen un augment generalitzat de l'activitat metabòlica de la cèl·lula mutant, i en concret, denoten cert increment en la síntesi de les principals macromolècules biològiques, probablement, per donar suport a l'augment de la proliferació, i per tant, a l'increment del desgast energètic i de biomassa.

4.2. Les ECs *Pik3ca*^{H1047R} presenten un augment del metabolisme del glutatió, un mecanisme essencial per al control de l'estrès oxidatiu.

Entre els resultats obtinguts a l'anàlisi metabolòmic destaca l'increment de metabòlits associats a la via del glutatió, com el propi glutatió (GSH) i la seva forma oxidada (GSSH), o formes precursors d'aquests composts, com la cisteinilglicina, la cistationina i el

glutamat, entre d'altres (**Figura 4.50 i 4.51**). Aquest són metabòlits essencials per a la biosíntesi de GSH i el funcionament de les vies metabòliques antioxidants, pel que el seu increment en vers a l'expressió de *Pik3ca*^{H1047R} podria suposar un mecanisme de protecció de la cèl·lula mutant en resposta a l'augment de l'estrès oxidatiu que comporta la proliferació endotelial descontrolada.

Síntesi de pirimidines i cicle de la urea	L-glutamine, Aspartate, N-Carbamoyl-L-aspartate,(S)-dihydroorotate, UMP, UDP, Deoxyuridine/dUMP, dTTP, UTP, CTP, CDP, Uracil, Cytosine, Cytidine, N(omega)-(L-Arginino)succinate, N(2)-acetyl-L-ornithine, Aspartate, Malate, Fumarate, Glutamate, Arginine (p val = 0.052)
Glicòlisi i cicle TCA	beta-D-Fructose 1,6-bisphosphate, Dihydroxyacetone phosphate, D-Glycerate 3-phosphate/D-Glycerate 2-phosphate, Phosphoenolpyruvate, Pyruvate, Lactate, -G6P/F6P, Malate(2-), Fumarate, Succinate(2-), Citrate/isocitrate
Metabolisme de la metionina i el glutatió	L-methionine, 5-Methylthioadenosine, Methionine sulfoxide, Adenosine L-cystathionine, L-serine, Vitamine B6, 5-oxoproline/L-1-Pyrroline-3-hydroxy-5-carboxylate, L-cysteinyglycine, Glutathione, GSSG, L-glutamate, S-Adenosyl-L-homocysteine, Taurine, Hypotaurine, L-serine
Biosíntesi de les hexosamines i via de les pentoses fosfat	L-Glutamine, G6P/F6P, D-Glucosamine 6-phosphate, UDP-N-acetyl-alpha-D-glucosamine/UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine, UTP, UDP-D-glucose/UDP-D-galactose, beta-1-4-mannose-N-acetylglucosamin, e, ADP-mannose/GDP-L-fucose/ADP alpha-D-glucoside, GDP-D-mannose, 6-Phosphogluconic acid, Ribose-phosphate, Sedoheptulose 7-phosphate, D-Erythrose 4-phosphate

Figura 4.49. Perfil metabòlic de les cèl·lules *Pik3ca*^{H1047R}. Representació i classificació dels metabòlits sobre-representats en cèl·lules *Pik3ca*^{H1047R/WT} respecte als controls wt.

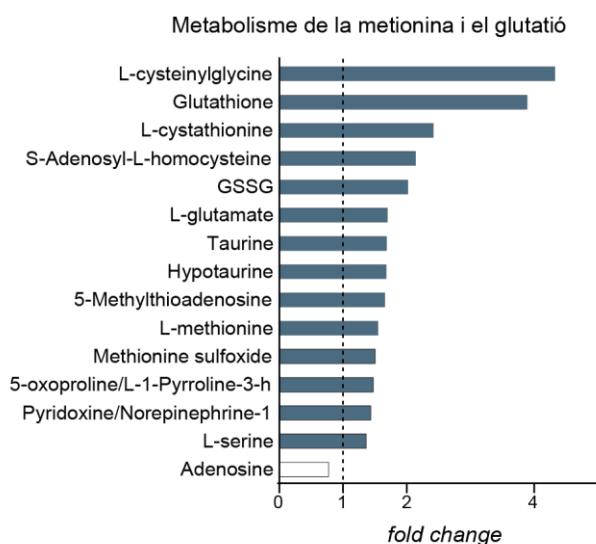


Figura 4.50. L'expressió de *Pik3ca*^{H1047R} provoca l'increment de nombrosos metabòlits de la via del glutatió. Representació gràfica dels valors *fold change* dels metabòlits implicats en la via de la metionina i el glutatió, diferencialment representats en els extractes metabòlics de les cèl·lules *Pik3ca*^{H1047R}.

Metabolisme de la metionina i el glutatió

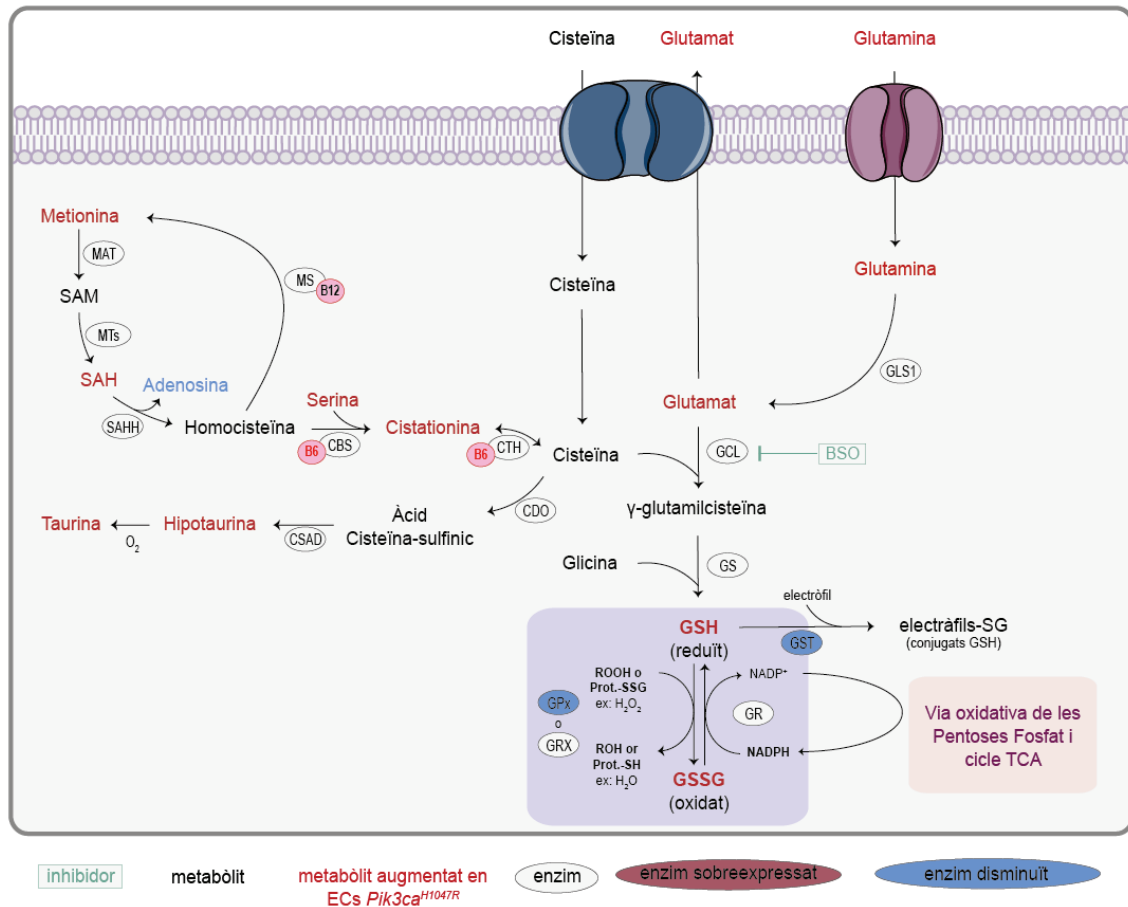


Figura 4.51. Representació gràfica de la via del glutatió i els metabòlits i enzims implicats en el fenotip de *Pik3ca*^{H1047R}. Els metabòlits i enzims incrementats en les mostres *Pik3ca*^{H1047R} es representen en vermell, mentre els enzims reduïts en les cèl·lules *Pik3ca*^{H1047R} són representats en blau.

Donada la importància de la regulació de l'estrès oxidatiu per a la supervivència cel·lular, els mutants *Pik3ca*^{H1047R} podrien haver desenvolupat una major dependència a la via del glutatió per garantir el balanç oxidatiu. Aquest tret podria suposar també una vulnerabilitat per a les cèl·lules mutants, pel que la seva inhibició comprometria el creixement i la supervivència de les malformacions *Pik3ca*^{H1047R}. Per provar aquesta hipòtesi, vam voler determinar si els canvis en el metabolisme del glutatió podrien ser causats per canvis en la regulació genètica dels enzims implicats en aquesta via. A partir de l'anàlisi transcriptòmic de les mateixes cèl·lules, vam descobrir que diversos dels enzims involucrats en el metabolisme del glutatió presenten desregulacions en comparar els seus nivells d'expressió en cèl·lules *Pik3ca*^{H1047R} i control. A la **Taula 4.1** trobem els valors per al *fold change* de cada un dels enzims de la via del glutatió diferencialment expressats a la seqüenciació de l'ARN cel·lular.

enzim		gen (muri)	adj. p val.	log2 FC
Biosíntesi del glutatió				
GCL	Glutamat cisteïna lligasa	Gclc	-	-
GS	Glutatió sintetasa	Gss	-	-
GLS	Glutaminasa	Gls	-	-
Balanç redox del glutatió				
GPX	Glutatió peroxidasa	Gpx8	0,0170	-0,5545
GRX	Glutaredoxina	Glrx	-	-
GR	Glutatió reductasa	Gsr	-	-
GST	Glutatió-S-transferasa	Gst (Mgst1)	0,0396	-0,4420
Cicle γ -glutamil				
GGT	γ -Glutamiltransferasa	Ggt1	-	-
GGCT	γ -Glutamilciclotransferasa	Ggct	0,0087	0,4954

Taula 4.1. Principals enzims implicats en la via metabòlica del glutatió. Enzims associats a la biosíntesi, la reacció d'oxidació-reducció i el reciclatge (cicle γ -glutamil) del glutatió i els valors (adj. P val. i log2FC) referents al perfil transcripcional de les cèl·lules EC-*Pik3ca*^{H1047R/WT}.

Per la validació d'aquestes dades es van mesurar els nivells de mARN a partir de noves mostres, aïllades 72 h després de la inducció amb 4-OHT 2mM o etanol durant 6 hores. La PCR quantitativa va confirmar les diferències transcripcionals observades en l'estudi transcriptòmic anterior, tot i que aquestes no van resultar estadísticament significatives (Figura 4.52).

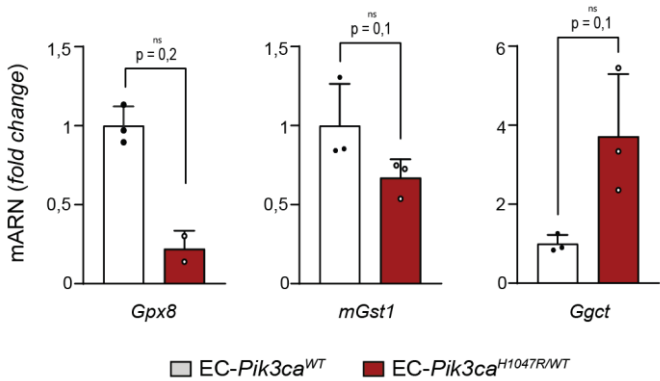


Figura 4.52. Enzims involucrats en la biosíntesi i oxidació del glutatió presenten desregulacions transcripcionals en cèl·lules *Pik3ca*^{H1047R}. PCR quantitativa per a l'anàlisi dels nivells de mARN dels gens codificants per als enzims GPX8, mGST1 i GGCT a partir de mostres de mLECs EC-*Pik3ca*^{H1047R} 72 h després del tractament amb 4-OHT 2mM o etanol (control). n ≥ 2.

Els enzims glutatió peroxidasa (GPX8) i glutatió S-transferasa microsomal (mGST1) participen en la reacció d'oxidació-reducció del glutatió per mantenir l'equilibri oxidatiu de la cèl·lula i evitar la presència d'espècies ROS (Figura 4.51). En el context *Pik3ca*^{H1047R}, la disminució de la seva expressió podria estar afavorint l'acumulació de

glutatió reduït (GSH), i per tant, el poder oxidatiu de la cèl·lula endotelial mutant. D'altra banda, GGCT (γ -glutamylciclotransferasa) és un dels principals enzims implicats en l'anomenat cicle γ -glutamil. Aquest procés metabòlic permet a la cèl·lula reutilitzar el glutatió a partir de la seva dissociació en glutamat, cisteïna i glicina, i la posterior reintroducció de γ -glutamil al citoplasma per ser transformat en 5-oxoprolina. 5-oxoprolina, sintetitzat per l'acció de GGCT, també ha estat identificat com un compost significativament augmentat a les cèl·lules *Pik3ca*^{H1047R}, el que concorda amb els nivells d'expressió de *Ggct*, el quals mostren una tendència a l'alça a l'endoteli mutant. Sota aquestes premisses, els nostres resultats suggereixen que la EC *Pik3ca*^{H1047R} podria prendre avantatge de l'increment del metabolisme del glutatió per suportar i protegir a la cèl·lula de l'estrès oxidatiu que comporta l'augment proliferatiu.

Per posar a prova la importància del metabolisme antioxidant del glutatió a les nostres cèl·lules mutants, vam dur a terme un assaig de viabilitat cel·lular (MTS) en cèl·lules tractades amb diferents dosis de l'inhibidor BSO. Aquest, inhibeix la síntesi de glutatió mitjançant el bloqueig de l'activitat de l'enzim glutamat-cisteïna lligasa (GCL) (**Figura 4.51**).

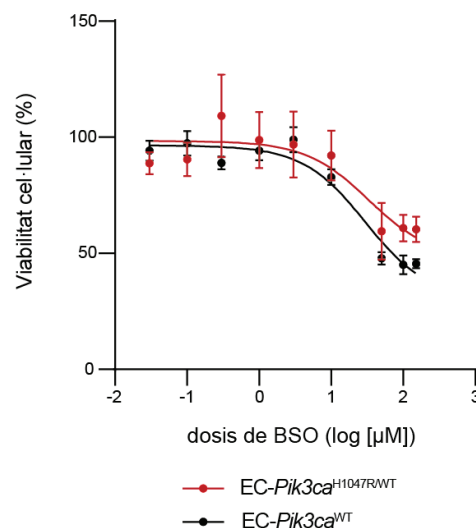


Figura 4.53. Les cèl·lules *Pik3ca*^{H1047R} no mostren major sensibilitat a la inhibició de la síntesi de glutatió. Assaig MTS de viabilitat cel·lular comparant mLECs EC- *Pik3ca*^{H1047R/WT} i wt en resposta al tractament amb diferents dosis de BSO (0, 0,03, 0,1, 0,3, 1, 3, 10, 50, 100, 150 μM) durant 72 h. Els resultats es mostren com al % de viabilitat en base al logaritme de la dosi de BSO com a corbes de regressió no lineal de pendent variable. n = 3.

Les ECs van resultar notablement resistents a l'inhibidor, ja que la seva viabilitat no es va veure compromesa fins estar exposades a dosis altes de BSO (50-150 μM). A més a més, en contra de les nostres expectatives, les cèl·lules *Pik3ca*^{H1047R} no van mostrar diferències significatives en resposta a l'inhibidor en comparació amb els controls. Fins i tot, podem veure com les cèl·lules tractades amb etanol (control) mostren una lleugera major sensibilitat al tractament amb BSO, el que suggereix que la reprogramació metabòlica induïda per la sobreactivació de *Pik3ca* podria posar certa resistència a la

falta de glutatió cel·lular (**Figura 4.53**). Aquestes dades ens podrien allunyar de la idea d'explorar la via del glutatió com una possible vulnerabilitat de la cèl·lula mutant, però, a la vegada, obre nombroses qüestions per a la comprensió dels canvis metabòlics mostrats en aquesta secció. És possible que la inhibició de la síntesi del glutatió no indueixi grans efectes sobre la viabilitat endotelial, però sí limiti el potencial proliferatiu de les cèl·lules *Pik3ca*^{H1047R}. Aquestes i altres hipòtesis caldran ser testades en futurs experiments.

4.3. L'augment de la glicòlisi com a força conductora de l'expansió de les cèl·lules *Pik3ca*-mutants.

La glicòlisi és el mecanisme primari per a la producció d'energia a les ECs. Tot i la coneguda "addicció" de l'endoteli a aquesta via metabòlica, va ser sorprenent identificar un increment significatiu en un gran nombre de metabòlits glicolítics a les nostres cèl·lules *Pik3ca*-mutants (**Figura 4.54**).

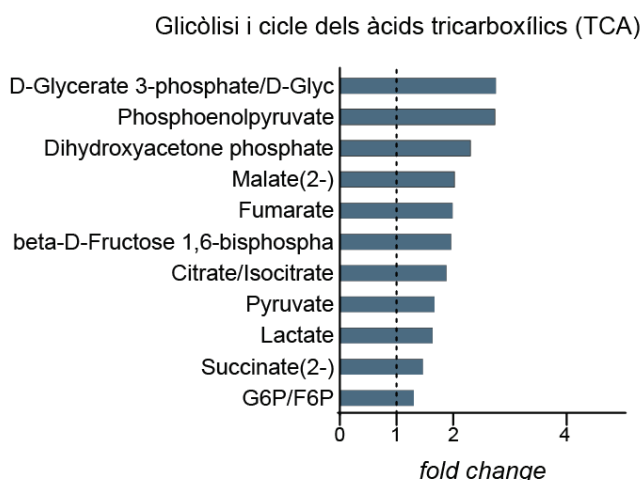


Figura 4.54. L'expressió de *Pik3ca*^{H1047R} provoca l'increment de nombrosos intermediaris de la glicòlisi i el cicle TCA. Representació gràfica del *fold change* dels metabòlits implicats en la via de la glicòlisi i el cicle TCA, diferencialment representats en els extractes metabòlics de les cèl·lules *Pik3ca*^{H1047R}.

L'increment d'intermediaris de la glicòlisi aeròbica i anaeròbica (glucosa-6P, fructosa 1-6P, glicerat-2P/3P, fosfoenolpiruvat, piruvat i lactat) apunten a l'augment de la via per suplir una major demanda energètica de la cèl·lula mutant. També, diversos components del cicle TCA van resultar incrementats en resposta a l'activació oncogènica de *Pi3kca*, com per exemple el succinat, el citrat o l'isocitrat, el malat i el fumarat (**Figura 4.55 i 4.55**).

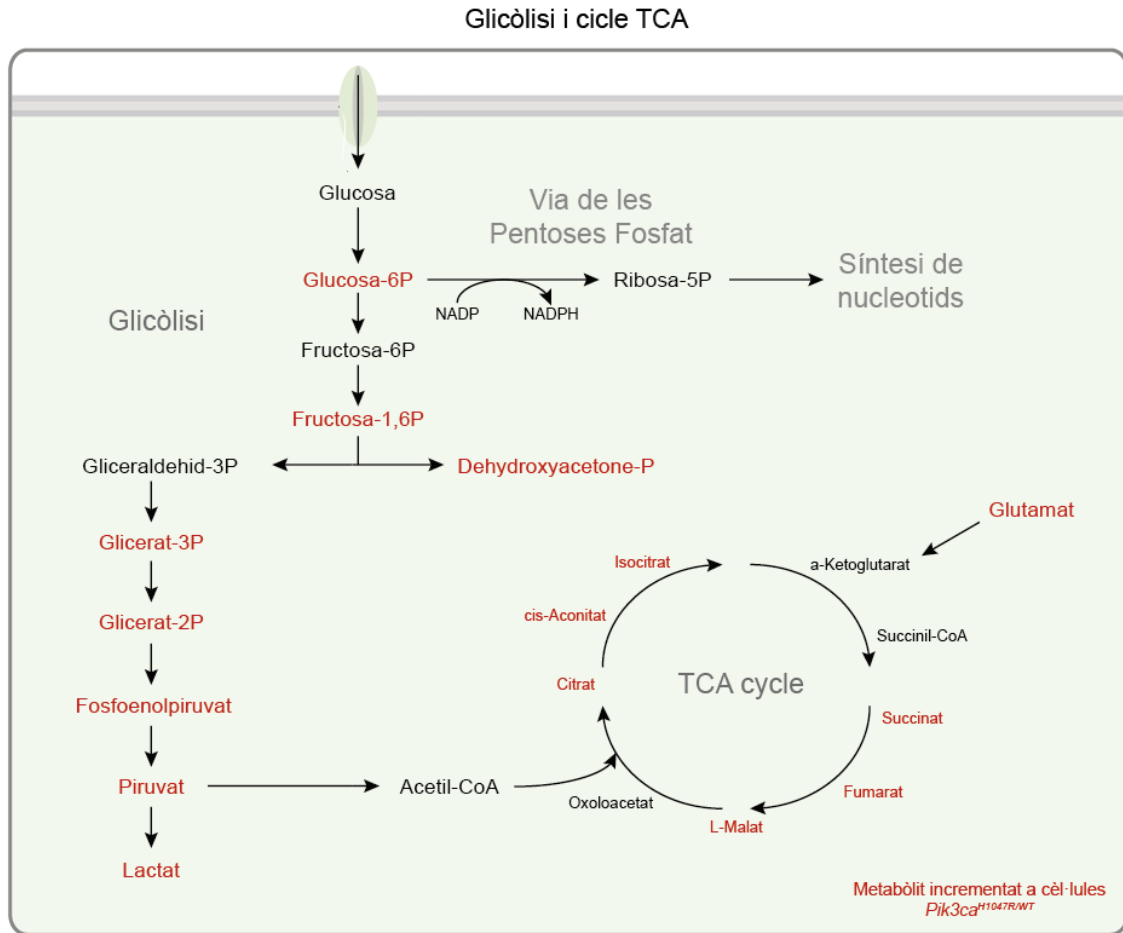


Figura 4.55. Representació gràfica dels canvis metabòlics sobre els intermediaris de la glicòlisi i el cicle TCA a causa de l'expressió de *Pik3ca^{H1047R}*. Els metabolites incrementats en les mostres *Pik3ca^{H1047R}* es representen en vermell.

Així doncs, l'augment generalitzat del procés glicolític a les cèl·lules mutants ens fa qüestionar el seu paper durant el desenvolupament de les malformacions vasculars. En aquest context, vam tenir l'oportunitat de col·laborar amb el laboratori de la doctora Katrien De Bock, especialitzat en la investigació del metabolisme endotelial. Aquest grup de recerca disposa d'un model animal portador de la deleció induïble per Cre de l'enzim fosfofructosa quinasa/fructosa bisfosfatasa 3 (PFKFB3). PFKFB3 és un activador de l'enzim fosfofructosa quinasa (PFK) i té un paper crucial en la regulació del flux glicolític, el qual ha estat descrit com un factor clau durant el procés angiogènic, especialment sota condicions patològiques (131). Donades aquestes característiques, la seva deleció en cèl·lules *Pik3ca^{H1047R}*, i per tan, la disminució del potencial glicolític de les mateixes, podria suposar un obstacle per assolir la demanda energètica que requereix la cèl·lula hiperproliferativa, i per tant, induir cert rescat fenotípic en el model de retina postnatal.

Els investigadors del grup col·laborador van creuar el nostre model *Tip* EC-*Pik3ca*^{H1047R/WT}-mTmG amb el seu al·lel *PFKFB3* KO. L'anàlisi de les retines P6 induïdes amb 10 mg/kg de 4-OHT a P1 i P2, no mostren diferències en l'àrea vascular total (**Figura 4.56 A i B**). Malgrat això, cal destacar que la quantificació de l'expansió dels clons endotelials GFP⁺ mostra una disminució considerable en aquells animals doble mutants: *PFKFB3* KO:*Pik3ca*^{H1047R/WT} (**Figura 4.56 A i C**). En qualsevol cas, la mida mostral encara és limitada per poder determinar un efecte robust de la inhibició de la glicòlisi sobre el fenotip de *Pik3ca*^{H1047R} i és probable que calgui avaluar altres estratègies experimentals per validar els resultats obtinguts en aquest experiment.

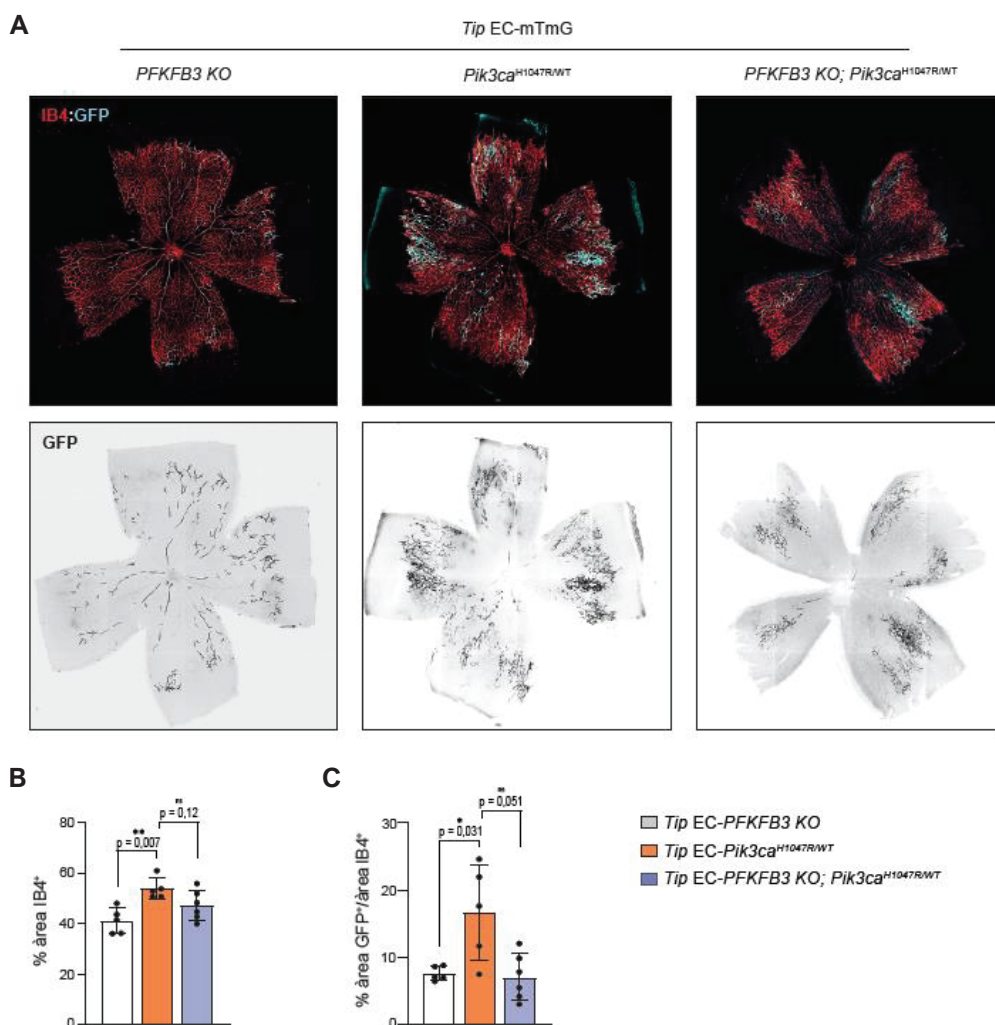


Figura 4.56. La repressió de la glicòlisi limita la capacitat d'expansió dels clons cel·lulars *Pik3ca*^{H1047R}. **A.** Imatges representatives de retines *Tip* EC-mTmG combinades amb els al·lells *PFKFB3*-KO, *Pik3ca*^{H1047R/WT} o *PFKFB3*-KO;*Pik3ca*^{H1047R/WT}. Les mostres van ser induïdes amb 10 mg/kg de 4-OHT a P1 i P2, i analitzades a P6. **B.** Quantificació del % d'àrea IB4⁺ respecte al total de l'àrea de la retina. **C.** Quantificació del % d'àrea GFP⁺ respecte a l'àrea total IB4⁺. n ≥ 2.

En conjunt, l'estudi metabolòmic presentat en aquesta tesi dona llum a una important reprogramació metabòlica causada per l'expressió endotelial de *Pik3ca*^{H1047R}. L'augment del metabolisme anabòlic i les vies per al control de l'estrès oxidatiu o l'abastiment

energètic ens indiquen l'adaptació de la cèl·lula a un estat patològicament proliferatiu. Com ja hem apuntat, aquestes diferències poden suposar dianes especialment atractives per al control o tractament de les lesions vasculars. De fet, a partir de la nostra recerca hem pogut demostrar l'impacte de la inhibició glicolítica sobre el fenotip vascular aberrant de les retines *Pik3ca*^{H1047R}, en concret, limitant l'expansió dels clons mutants.

DISCUSSIÓ

Durant les darreres dècades, la via PI3K ha estat descrita com una via de senyalització essencial per a la formació dels vasos. La modificació genètica de PI3K i diversos dels seus efectors en ratolins transgènics ha revelat la importància de la seva senyalització en múltiples funcions cel·lulars com ara el creixement, la proliferació, la supervivència, la migració, el tràfic vesicular o el metabolisme endotelial (218). Més concretament, la isoforma p110 α ha esdevingut un element clau per al control del comportament endotelial. Al 2016, mutacions activadores a PIK3CA van ser identificades com la causa genètica de diverses malformacions vasculars (255,256). Aquestes mutacions oncogèniques (H1047R, H1047L, E523K o E545K) prenen lloc de forma somàtica a l'endoteli i han estat associades exclusivament a l'origen de malformacions venoses i limfàtiques, així com a malformacions vasculars associades a síndromes de sobrecreixement complexes (*PIK3CA Related Overgrowth Syndromes*, PROS). Aquestes dolències apareixen de manera congènita, fruit del creixement descontrolat de la xarxa vascular, el que comporta la formació anòmala dels vasos amb episodis de desfiguració, sagnants recurrents, dolor i nombroses i variades complicacions clíniques en funció de l'abast de la lesió i el teixit afectat.

Es creu que, durant el desenvolupament embrionari, l'aparició espontània d'una mutació somàtica a *PIK3CA* en un progenitor mesodèrmic comporta l'augment de la seva capacitat proliferativa i la conseqüent expansió patològica. Tot i que la mutació té lloc de manera estocàstica en una EC progenitora, és curiós com la manifestació clínica de mutants *PIK3CA* només ha estat diagnosticada en malformacions venoses o limfàtiques, excloent d'aquest genotip totes aquelles anomalies arteriovenoses. Aquesta segregació entre el genotip i el fenotip de la patologia podria indicar la implicació de PI3K en el procés de diferenciació endotelial, condicionant així la localització i el subtipus cel·lular afectat.

Tot i els grans avenços en el diagnòstic genètic de les malformacions vasculars, la comprensió dels processos moleculars subjacents a aquestes mutacions encara requereixen una extensa investigació. Sota aquest pretext, aquesta tesi té l'objectiu de configurar un nou model per a l'estudi de les malformacions vasculars. L'expressió endotelial i mosaica de la forma mutant de *Pik3ca* (H1047R) i l'anàlisi de la retina postnatal de ratolí ens ha permès recapitular els trets distintius de les malformacions vasculars venoses, on la sobreactivació de PI3K dona lloc a la hiperproliferació i la hiperplàsia vascular, específicament en venes i capil·lars. Aquesta estratègia ha permès apropar-nos a l'origen etiològic de la malaltia i s'ha convertit en una eina clau per caracteritzar el context espai-temporal que desencadena la patogenicitat de *Pik3ca*^{H1047R}. Per fer-ho, el meu treball ha estat centrat en l'estudi de l'expressió de *Pik3ca*^{H1047R} en diversos contextos del desenvolupament vascular i en diferents subpoblacions endotelials.

La combinació de la mutació H1047R amb el gen reporter mTmG i les línies endotelials *Bmx-CreER*^{T2} i *Esm1-CreER*^{T2} han permès determinar clares diferències en la resposta

de les ECs arterials i ECs pre-arterials (ECs *tip*) a la sobreactivació de PI3K. Tot i el paper clau de p110 α durant la formació dels vasos, les evidències exposades aquí demostren que les cèl·lules arterials tenen la capacitat d'obviar l'expressió de *Pik3ca*^{H1047R}, un fet que concordaria amb la segregació mutacional detectada en el diagnòstic genètic de malformacions d'alt i baix flux. Tanmateix, *Pik3ca*^{H1047R} ha demostrat ser patogènic en ECs en transició a l'artèria. L'expressió de la mutació en cèl·lules *tip*, descrites com un subtipus endotelial evocat a la diferenciació arterial, ha evidenciat l'impacte de PI3K durant l'especificació dels vasos. A més d'un augment en la proliferació endotelial, l'expressió de *Pik3ca* en aquestes cèl·lules desencadena un brusc canvi en el patró de diferenciació, afavorint destins venosos i capil·lars i evitant la seva transició a l'artèria. En concordança, en resposta a l'activació aberrant de PI3K, les cèl·lules mutants pateixen un increment significatiu de COUP-TFII (un factor de transcripció essencial per a la diferenciació venosa). A la **secció 1** discutirem els avantatges i les limitacions dels models presentats al llarg de la tesi, així com les troballes referents a la fisiologia de la cèl·lula mutant en els diferents contextos on aquesta ha estat testada.

D'altra banda, el metabolisme de les ECs ha estat reconegut com una força determinant durant el procés angiogènic. L'endoteli presenta una extraordinària capacitat d'adaptació metabòlica en funció de les necessitats nutricionals i de creixement de cada teixit, amb especial importància durant el desenvolupament de certes patologies (130). Al present estudi, l'expressió de *Pik3ca*^{H1047R} a resultat causar una important reprogramació metabòlica que sustenta l'increment bioenergètic i macromolecular que la hiperproliferació endotelial requereix. Alguns dels trets metabòliques identificats a la cèl·lula mutant podrien ser mecanismes essencials per garantir la seva pròpia supervivència, i per tant, esdevenir atractius objectius terapèutics per al tractament de les malformacions vasculars. A la **secció 2** discutirem el perfil metabòlic obtingut i les possibles interpretacions i aplicabilitats de les característiques identificades a les ECs mutants.

1. Modelatge i caracterització del context espaietemporal de les malformacions vasculars causades per mutacions *Pik3ca*^{H1047R}

1.1. L'expressió mosaica de *Pik3ca*^{H1047R} constitueix un model únic per a l'estudi de l'origen i el creixement de les malformacions vasculars.

Les mutacions activadores de la via PI3K/AKT han estat descrites com una de les principals causes de l'origen de malformacions vasculars de baix flux (253,255,256,284). Tot i el clar diagnòstic genètic, el mecanisme precís responsable del desenvolupament vascular aberrant no està clar. Estudis previs del nostre laboratori han proporcionat les primeres evidències de que l'expressió endotelial de *Pik3ca*^{H1047R/WT} desencadena l'activació de programes moleculars lligats a la progressió del cicle cel·lular (256,276). A partir d'aquestes dades, aquest treball ha demostrat que l'expansió patològica de les ECs *Pik3ca*^{H1047R} es produeix preferentment en presència de factors de creixement. A les

cèl·lules mutants, tant l'activació de S6, un dels efectors de la via PI3K, com la progressió del cicle cel·lular, resulten selectivament potenciats en presència d'estímuls mitogènics. En aquesta línia, l'expressió de la mutació *in vivo* durant diferents etapes del desenvolupament postnatal, ha demostrat que un estat activament angiogènic és determinant per a l'aparició i el creixement de les malformacions. La correlació entre un context extracel·lular angiogènic i la patologia de les cèl·lules mutants també ha estat reportada en altres casos de malformacions vasculars, com ara en LMs, CCMs o AVMs associades a la síndrome HHT (261,285,286). El paper dels factors de creixement com a part essencial de l'impacte patològic de *Pik3ca*^{H1047R} també encaixa amb les dades clíniques. Les lesions de baix flux s'expandeixen proporcionalment amb el creixement de l'individu, però s'estableixen de manera quiescent en etapes adultes, on no hi ha pràcticament activitat angiogènica o creixement tissular (287). A més a més, s'han reportat nombrosos casos on la recurrència i/o reactivació de la lesió té lloc a partir d'episodis on una producció aguda d'estímuls precedeix al relapse de la malformació. Aquets és el cas d'etapes amb canvis hormonaals (com per exemple la pubertat), respostes regeneratives a la resecció quirúrgica de la lesió o ferides accidentals en la zona afectada (245,288). Aquest fet també explicaria perquè aquest tipus de lesions són caracteritzades, i diferenciades dels tumors vasculars, pel seu baix potencial proliferatiu (241). Tot i que l'origen de les VMs és ocasionat per la proliferació descontrolada de la EC, és probable que el diagnòstic i l'anàlisi histopatològic de les lesions en estadis de quiescència mostri una baixa taxa proliferativa. El conjunt d'aquestes observacions pren especial importància en considerar tractaments preventius adreçats al control de possibles repunts de l'estimulació angiogènica.

En les darreres publicacions, el modelatge de les lesions vasculars causades per *Pik3ca*^{H1047R} ha estat basat en la inducció de la mutació en una gran proporció de ECs, donant lloc a una hiperplàsia vascular massiva on no és possible diferenciar les estructures vasculars o definir lesions aïllades (256). De forma similar, en el present treball hem utilitzat la retina postnatal de ratolí per modelar les malformacions vasculars *Pik3ca*^{H1047R}. A diferència dels models anteriors, l'ús de dosis molt baixes de 4-OHT, i per tant, la recombinació mosaica de la mutació H1047R a l'endoteli, ens ha permès configurar una nova estratègia molt més propera a l'etiologia genètica de les malformacions humanes, on la mutació ocorre en un sola cèl·lula derivada del mesoderma, que s'expandeix donant lloc a lesions vasculars aïllades. Tot i la dràstica reducció en el nombre de cèl·lules mutants, aquestes mostren un clar impacte en la proliferació endotelial i l'expansió patogènica dels vasos, caracteritzats per la pèrdua de la cobertura mural i la sobreactivació de la via PI3K, recapitulant així els trets més significatius de la patologia.

Una altre observació important del nostre model es va centrar en la distribució de les lesions. Només venes, vènules i capil·lars es veuen afectats pel sobrecreixement endotelial, excloent les artèries d'aquest fenotip, les quals semblen impassibles a l'expressió de *Pik3ca*^{H1047R}. Aquest patró coincideix amb el diagnòstic de les malformacions vasculars humanes, on la sobreactivació de PIK3CA no ha estat diagnosticada en lesions d'alt flux (AVMs) (289). A partir d'aquestes evidències, el motiu per el qual les artèries no es veuen afectades i la comprensió de la segregació

mutacional entre malformacions d'alt i baix flux ha esdevingut un dels principals paradigmes estudiats en aquesta tesi, el qual serà discutit més endavant (**secció 1.2-1.3**).

El sistema proposat, ràpid i consistent, constitueix una prometedora eina per a l'avaluació de possibles teràpies dirigides. Aquest ha estat el cas de Miransertib, un inhibidor d'AKT dissenyat per al tractament oncològic, que, gràcies al model descrit, ha estat testat a nivell preclínic i ha demostrat un gran potencial curatiu i preventiu per al tractament de VMs (276). Les dades sorgides d'aquest estudi han contribuït de forma important al desenvolupament d'assajos clínics per a l'avaluació de Miransertib en pacients de la síndrome de Proteus (NCT02594215) o PROS (NCT03094832).

Tot i les nombroses avantatges, aquest model també presenta certes limitacions. Com hem vist, la manifestació clínica de les malformacions vasculars és molt variable i canvia en funció del teixit, el moment o la severitat de la patologia. En el nostre cas, el modelatge a la retina murina simplifica la complexitat i heterogeneïtat de la patologia i s'allunya de context tissular on aquestes lesions acostumen a aparèixer (la pell, els teixits adipós o el teixit muscular) (244). A més a més, l'endoteli ha demostrat tenir un paper determinant en la fisiologia dels teixits que envolta, tal i com s'ha demostrat en el múscul o el teixit adipós (290–292). Així doncs, no podem descartar que la malformació dels vasos pugui tenir implicacions en el comportament d'altres tipus cel·lulars i òrgans. També cal ser conscients que la nostre aproximació experimental aborda l'origen i la formació inicial de les lesions, un estadi probablement molt diferent al presentat en el moment del diagnòstic dels pacients. Els informes clínics i algunes investigacions incipients apunten a processos inflamatoris i de fibrosis durant la cronificació de les malformacions (293,294), pel que la consideració d'aquest escenari serà essencial per al desenvolupament de teràpies efectives en estadis més avançats de la patologia.

D'altra banda, la mutació H1047R, al domini quinasa de *PIK3CA*, és tan sols una de les diverses mutacions causants de les malformacions de baix flux, entre les que trobem altres modificacions *hotspot* (E542L o E545L, al domini helicoidal) o mutacions menys recurrents, com per exemple E453K/Q, o E726K. Aquestes últimes, les quals han demostrat una menor capacitat activadora de la via PI3K, semblen diagnosticar-se de manera més freqüent en patologies sindròmiques on, a banda de les malformacions vasculars, trobem afectacions en altres llinatges i teixits de l'organisme (295,296). La relació inversament proporcional entre la capacitat activadora de la mutació i la patogènesi en diversos tipus cel·lulars podria indicar que aquelles mutacions amb menor impacte sobre la via PI3K comporten una major compatibilitat amb la viabilitat i l'expansió de diversos teixits. Altrament, els mecanismes pels que aquestes mutacions indueixen l'activació de PI3K presenten naturaleses diferents. En definitiva, el tipus de mutació a *PIK3CA*, així com el moment, el tipus cel·lular i el context extracel·lular en el que aquesta ocorri, podrien condicionar de manera directe l'origen i l'impacte de l'afectació vascular. Per tant, entendre on, quan i com apareixen les malformacions vasculars ha esdevingut un aspecte clau per avançar en la seva investigació.

1.2. Les mutacions activadores a *Pik3ca* no són patogèniques a la cèl·lula arterial

Tot i que les ECs comparteixen un mateix origen mesodèrmic, la diferenciació en diferents subpoblacions fa possible la especificació de la cèl·lula i l'adquisició de diversos trets diferencials. Venes i artèries, els dos grans vasos principals del sistema sanguini, tenen funcions completament diferents, pel que no és estrany que la composició fisiològica dels conductes, així com les característiques moleculars de AECs i VECs, també mostrin diferències importants. En el cas de les artèries, les AECs es troben localitzades a la capa interna de vas de forma polaritzada i formant part d'una paret gruixuda amb un intens recobriment mural que els permet aguantar les altes forces hemodinàmiques a les que estan exposades. Recentment, diversos estudis han demostrat la baixa capacitat proliferativa de les AECs i, inclús, l'arrest del cicle cel·lular durant l'adquisició de la identitat arterial (112,113), oposant-se així al fenotip venós i capil·lar, els quals mantenen cert potencial proliferatiu.

Donades aquestes característiques i l'absència de fenotip a les artèries en expressar *Pik3ca*^{H1047R} de manera estocàstica a l'endoteli, vam voler determinar la patogènesis de la mutació específicament a l'artèria. L'expressió arterial de *Pik3ca*^{H1047R} (mitjançant l'ús de la línia *Bmx-CreER*^{T2}) va demostrar ser completament innòcua durant la formació d'aquests vasos. A més a més, l'activació prolongada de la via va mostrar una disminució en l'activació de S6, suggerint un mecanisme inherent a la cèl·lula arterial que contraresta l'efecte de la mutació.

Les diferències fenotípiques entre ECs venoses o capil·lars i ECs arterials *Pik3ca*^{H1047R} concorden amb els diagnòstics genètics associats als diversos tipus de malformacions vasculars. Com ja hem mencionat, VMs, LMs i CMs han estat extensament associades a modificacions oncogèniques de la via PI3K. En canvi, AVMs, lesions amb una implicació directe del compartiment arterial, han estat atribuïdes a l'aparició de mutacions de la via ERK/MAPK. Aquesta segregació podria estar relacionada amb diferències en l'activació d'ambdues branques de senyalització als respectius compartiments endotelials. De fet, durant el desenvolupament embrionari de ratolí, es va proposar que, a través de l'estimulació de VEGFR-2, la via MAPK és l'encarregada d'activar el programa transcripcional arterial, i l'activitat PI3K/AKT condueix a l'adquisició d'identitats venoses (115). A més a més, l'activació de PI3K suprimeix la via ERK/MEK, i el mateix passa en el sentit contrari (81). Per tant, aquests resultats ens sugereixen que, després de l'arterialització, l'activitat de PI3Kα podria estar bloquejada per l'augment de la via antagonista MAPK.

El comportament refractari de la cèl·lula arterial respecte a l'expressió de mutacions patogèniques també ha estat reportada en altres casos de malformacions vasculars. Aquest és el cas de la deleció d'ALK1, un receptor de lligands BMP identificat com una de les principals causes d'AVMs associades a HHT. La deleció d'ALK1 específicament a les artèries diferenciades tampoc indueix anomalies vasculars. En canvi, associen l'aparició de la lesió arteriovenosa a l'expressió de la mutació en venes o capil·lars i defectes en la polarització y migració d'aquests subtipus endotelials. Així doncs, és possible que el caràcter impassible de les artèries no estigui relacionat únicament amb

alteracions a PI3K, sinó que sigui una tret inherent a la cèl·lula arterial. En aquesta línia, diversos estudis apunten a diferències en el perfil d'accessibilitat de la cromatina al llarg de l'especificació arterial que podrien restringir o regular l'expressió gènica en aquest llinatge cel·lular. Per exemple, s'ha associat l'augment de la condensació i empaquetament de l'ADN amb mecanismes d'adaptació a l'increment del flux sanguini (297). Altres investigacions també han descrit marques epigenètiques associades a gens particularment implicats en la funció d'AECs i VECs (298,299). Segons aquestes dades, una regulació més restrictiva, o inclús el silenciament genètic al compartiment arterial podria explicar la indiferència a mutacions activadores de *PIK3CA* o altres alteracions genètiques. Un altre tret diferencial entre venes i artèries recau en la seva estructura i la exposició a diferents pressions sanguínies. Les cèl·lules arterials es troben en un ambient amb major estrès mecànic a raó d'una major força i fricció del flux sanguini i una pressió més elevada. La capacitat mecanosensorial de les AECs ha demostrat tenir la capacitat de controlar els nivells d'importants factors de transcripció, com ara KLF2 o KLF4, els quals contribueixen al manteniment de l'estat quiescent de les cèl·lules arterials (35,300,301). De fet, estudis recents mostren com la manipulació de la resposta transcripcional de KLF4 a l'estrès mecànic condueix a la pèrdua de l'arrest proliferatiu i la patogènesi de les AVMs (302). Notch és un altre factor activat pels estímuls del flux sanguini i a la vegada contribueix a la supressió de la proliferació endotelial. Per tant, és possible que, tot i la sobreactivació de PI3K, la AEC és trobi atrapada en un arrest proliferatiu induït per els estímuls mecànics causats pel flux, que la mantenen en un estat quiescent i la protegeixen de qualsevol desregulació de la senyalització.

Donades aquestes hipòtesis, la caracterització de l'expressió de *Pik3ca*^{H1047R} a l'artèria descrita en aquesta tesi és un excel·lent punt de partida per explorar i comprendre els mecanismes pels que les AECs presenten respostes tant diferents a la resta de l'endoteli. A partir d'aquest model caldria establir la metodologia per aïllar el nombre suficient de AECs i analitzar els diferents aspectes discutits en aquesta secció. Els avanços en l'optimització dels protocols de disgregació cel·lular i les tecnologies per a la seqüenciació de cèl·lules individuals a partir de la retina (303) ens permetrien, en un futur proper, analitzar l'expressió gènica, la fosforilació dels efectors de les vies de senyalització o l'accessibilitat de la cromatina, i així, comprendre millor la biologia de la cèl·lula arterial.

1.3. L'activació de PI3K determina el destí endotelial i la patogènesi vascular

Com hem vist, la sobreactivació de PIK3CA juga papers molt diferents en funció de la subpoblació endotelial on tingui lloc. La seva patogenicitat es veu clarament condicionada per el context i la identitat cel·lular, pel que després de comprovar la seva innocuïtat en cèl·lules arterials diferenciades, vam voler testar l'expressió de *Pik3ca*^{H1047R} en un estat previ. L'ús de la línia *Esm1*-CreER^{T2} ens va permetre focalitzar l'expressió de *Pik3ca*^{H1047R} a les ECs *tip*, una subpoblació endotelial especialitzada en liderar i guiar el front angiogènic durant la formació dels nous vasos, però predeterminada a adoptar identitats arterials. Estudis de traçat cel·lular han demostrat que, durant el desenvolupament de la vasculatura postnatal de la retina, la EC *tip* competeix transitòriament als brots angiogènics, a partir dels quals migra a través dels capil·lars per

ocupar finalment les artèries (73). A més, han relacionat la aquest tipus cel·lular amb l'expressió de diversos marcadors arterials, com per exemple *Cxcr4* o *Sox17* (72,304).

Tot i el seu estat transitori cap a una identitat arterial, la població *tip* va demostrar ser altament sensible a la sobreactivació de PI3K, donant lloc a la formació de grans lesions hiperplàstiques, amb un notori augment de la proliferació endotelial i l'activació de S6. En aquest model, la combinació de la mutació induïble amb el sistema reporter mTmG va facilitar el seguiment i l'anàlisi de les dinàmiques de les cèl·lules mutants. Lluny del que esperàvem, després de l'expressió de *Pik3ca*^{H1047R}, la cèl·lula *tip* canvia completament el seu patró migratori i inicia la seva expansió patogènica exclusivament a venes i capil·lars. La desregulació del patró de diferenciació arterial de les ECs *tip* mutants ens suggereix una important implicació de PI3Kα durant l'especificació endotelial.

Podríem atribuir aquesta alteració a un efecte inhibitori de la migració cel·lular, però l'observació de petites lesions properes a les artèries ens indica que, tot i ser capaces de migrar, les cèl·lules mutants son rebutjades per l'artèria. D'altra banda, donada la impossibilitat de les cèl·lules mutants per contribuir a la formació de l'artèria, vam voler determinar els efectes d'aquest biaix a llarg termini. Aquests estudis van demostrar que, tot i els canvis durant la diferenciació de les ECs *tip*, les artèries eren capaces de formar-se correctament, suggerint mecanismes compensatoris per part de les ECs *tip* no mutants o altres orígens de cèl·lules arterials.

A diferència de les cèl·lules arterials diferenciades, les ECs *tip* mantenen certs capacitats proliferativa (72). Aquesta característica podria determinar la resposta patogènica de la cèl·lula en vers a l'expressió de *Pik3ca*^{H1047R}, la qual induïx PI3K induïx l'augment de la proliferació cel·lular a la vegada que desencadena la reprogramació del procés de diferenciació endotelial preestablert a la EC *tip*. Com ja hem mencionat, la relació entre la identitat endotelial i l'estat proliferatiu de la cèl·lula ha estat exposada en diversos treballs, els quals apunten a una clara inhibició de la proliferació durant l'especificació arterial (112,113). Tant mateix, les conseqüències de la sobreactivació del cicle cel·lular durant la diferenciació endotelial i la implicació d'aquest procés durant el desenvolupament de les lesions vasculars han estat escassament descrits.

D'acord amb els nostres resultats, l'expressió de *Pik3ca*^{H1047R} i el conseqüent augment de la proliferació de la cèl·lula mutant durant el desenvolupament embrionari, afavoriria l'expansió i diferenciació de la mateixa a l'endoteli capil·lar o venós i evitaria la seva especialització arterial. La capacitat de la senyalització de PI3K per re-programar el destí cel·lular ha estat reportada en altres llinatges més enllà de l'endoteli (305–307). En el cas de les síndromes PROS, la mutació a *PIK3CA* sorgeix de manera estocàstica a progenitors embrionaris, però l'afectació dels diferents teixits involucrats en la síndrome també reflecteix un important biaix. Únicament teixits derivats del mesoderma i el neuroectoderma es presenten macroscòpicament afectats, mentre les estructures endodèrmiques no presenten fenotips aparents (296). De manera similar al procés observat a l'endoteli, l'activitat oncogènica de PI3K en altres teixits podria condicionar la selecció positiva o negativa de certs llinatges cel·lulars. En aquest context, els models genètics *Pik3ca*^{H1047R} i els sistemes per al traçat cel·lular utilitzats en aquesta tesi podrien

ser de gran utilitat per testar la dinàmica d'altres progenitors embrionaris *Pik3ca*^{H1047R}-mutants durant el desenvolupament murí.

Durant gran part d'aquest estudi, el seguiment de les cèl·lules mutants i l'anàlisi del seu comportament s'ha basat en la visualització del gen reporter mTmG (dependent de Cre). No obstant, l'absència de correlació genètica entre la recombinació de la mutació a *Pik3ca* i la proteïna reportera GFP (localitzades en dos constructes genètics independents) podria donar lloc a errors (falsos positius o falsos negatius). Altrament, la detecció de lesions vasculars en cèl·lules no reportades suggereix que *Pik3ca* recombina amb major eficàcia que mTmG, un fet que ha permès assumir l'expressió de la mutació en, almenys, una gran proporció de ECs GFP⁺.

Amb l'objectiu de validar els resultats anteriors i dur a terme un estudi més precís de la dinàmica de la EC mutant, el nostre grup, juntament amb el laboratori de doctor Rui Benedito, va desenvolupar un nou animal per al modelatge de *Pik3ca*^{H1047R}. L'estratègia genètica de l'anomenat iFlu-Mosaic-*Pik3ca*^{H1047R} ens va permetre seguir i estudiar el comportament de les EC *tip* *Pik3ca*^{WT} i *Pik3ca*^{H1047R} de manera fidedigne. A arrel d'aquest resultat, vam confirmar el clar biaix de la cèl·lula *tip* *Pik3ca*^{H1047R} durant la diferenciació arterial, evidenciant que tan sols les cèl·lules *wt* són capaces d'adquirir posicions arterials, mentre les mutants, desenvolupen hiperplàsies vasculars a venes i capil·lars. A diferència del model anterior, l'eficiència de recombinació d'aquest nou constructe resulta ser notablement baixa, pel que requereix majors dosis de 4-OHT per induir la recombinació a unes poques *tip* ECs. *A priori*, aquesta podria suposar una limitació important del sistema, però en canvi, la recombinació d'un nombre limitat de cèl·lules ha fet possible modelar un major mosaïcisme i detectar l'evolució de la proliferació i la migració de clons provinents, molt probablement, d'una sola cèl·lula recombinant. Gràcies a aquesta característica també podem caracteritzar millor els efectes intrínsecs a l'expressió de la mutació i minimitzar els possibles efectes de l'expressió col·lectiva de la mateixa.

En aquest nou constructe, l'expressió de *Pik3ca* es troba al *locus* de Rosa26, un gen constitutiu. Per aquest motiu, la transcripció de p110α perd la regulació endògena, el que podria repercutir directament en els nivells d'expressió i l'activitat de la via. A més a més, la presència d'aquest al·lel en un *locus* diferent implica el manteniment de *Pik3ca* endògen, i per tant, la introducció d'una copia extra del gen. Aquestes diferències es veuen reflectides al fenotip vascular, on les lesions desenvolupades presenten una morfologia notòriament diferent (esfèriques, menys extenses) a les presentades al model anterior.

En definitiva, els dos models usats al llarg de la tesi (*Pik3ca*^{H1047R}-mTmG i iFlu-Mosaic-*Pik3ca*^{H1047R}) per a l'expressió i el seguiment dels mutants *Pik3ca* presenten nombroses avantatges però també certes limitacions que cal tenir en compte. Tantmateix, l'estudi mitjançant ambdues estratègies genètiques ens ha permès validar un fenotip clar i robust, demostrant com l'expressió de la mutació H1047R determina la identitat endotelial i limita la seva expansió als llits venosos i capil·lars de la xarxa vascular.

1.4. *Pik3ca*^{H1047R} indueix la sobreexpressió de COUP-TFII

La interacció entre les molècules de senyalització i els factors de transcripció són essencials per a l'especialització de les ECs en els diferents llinatges vasculars. D'acord amb el biaix observat durant el procés de diferenciació en els models *in vivo*, l'activació de PI3K mitjançant l'expressió oncogènica de *Pik3ca* *in vitro* ha demostrat regular a l'alça la transcripció i l'expressió de COUP-TFII. Aquest és un factor de transcripció àmpliament expressat durant la organogènesi i la diferenciació de diversos teixits, amb un paper especialment important durant la diferenciació venosa i limfàtica. L'expressió de COUP-TFII es redueix dràsticament en teixits adults. No obstant, l'augment patològic dels nivells de COUP-TFII ha estat identificat en nombroses patologies, incloent el càncer de pròstata, insuficiències cardíques o la distròfia muscular (283). En el nostre cas, l'expressió endotelial de H1047R provoca un increment, primer del transcrit de *Nr2f2*, i més tard, dels nivells proteics de COUP-TFII. De la mateixa manera, el tractament de les cèl·lules mutants amb l'inhibidor de p110α BYL719 reverteix el fenotip i retorna els nivells basals de *Nr2f2*.

En concordança amb el nostre fenotip, diversos estudis també apunten a COUP-TFII com a un factor directament implicat en progressió del cicle cel·lular. Més concretament, ha estat associat a l'estimulació de l'angiogènesi mitjançant la senyalització de VEGFR-2/VEGF i a l'augment de l'expressió de E2F1, el qual regula la transició entre les fases de la proliferació cel·lular (308). COUP-TFII també ha estat identificat com a repressor de la senyalització de Notch, i per tant, repressor de l'arrest proliferatiu que aquesta comporta. Tot i les múltiples implicacions de COUP-TFII en la fisiologia i la identitat endotelial, els mecanismes subjacents a aquestes funcions encara són poc coneguts. En base a aquestes troballes, al llarg d'aquesta tesi proposem a COUP-TFII com un dels principals mecanismes moleculars durant la reprogramació de la identitat endotelial de les cèl·lules *Pik3ca*^{H1047R/WT}.

Amb l'objectiu de definir el perfil molecular desencadenat per *Pik3ca*^{H1047R} i COUP-TFII, la comparació dels estudis transcripcionals de cèl·lules *Pik3ca*^{H1047R}, COUP-TFII-KD i cèl·lules venoses o arterials ens ha permès dibuixar una signatura molecular associada al fenotip descrit. Entre altres, trobem un augment d'*Ephb4* i una disminució de *Cxcr4* a les cèl·lules *Pik3ca*-mutants, dues proteïnes associades a la identitat venosa i arterial, respectivament. La deleció d'*Ephb4* ha estat identificada com a causant de malformacions arteriovenoses en desordres HHT i estudis recents l'han relacionat amb la inhibició de la via RAS-MAPK (309). Així doncs, els nivells d'*Ephb4* en AVMs s'oposen als identificats en els nostres experiments, on l'augment de l'activitat de p110α dona lloc a una sobreexpressió significativa d'*Ephb4*. De nou, la contraposició de la via MAPK i PI3K demostra signatures contràries, consistents amb les diferències en els desenvolupament patològic vascular de malformacions d'alt i baix flux. D'altra banda, *Cxcr4*, una proteïna estretament associada a la morfogènesi arterial, ha demostrat ser extremadament sensible a les fluctuacions de la senyalització de PI3K. La sobreactivació de la via provoca la disminució dràstica de l'expressió de *Cxcr4*, en concordança amb l'exclusió del destí arterial. Mutacions deletèries al gen *Cxcr4* desencadenen errors en la capacitat migratòria de la EC *tip* i la correcta alineació a l'artèria (100,310). D'altra

banda, alguns estudis postulen *Cxcr4* com a modulador essencial de la integritat arterial (311) i del recobriment mural per vSMCs a les artèries (312). Donada la important funció d'aquesta proteïna per al desenvolupament arterial, no és estrany que la disminució de *Cxcr4* (mediada per COUP-TFII) contribueixi a evitar l'especialització arterial de la cèl·lula *Pik3ca*-mutant.

La relació entre la sobreactivació de PI3K i COUP-TFII no està ben definida. Les úniques evidències existents relacionen la senyalització de TIE2 amb l'estabilització i el manteniment prolongat de la proteïna COUP-TFII mitjançant AKT (116). Tan mateix, els nostres resultats apunten a un augment de la transcripció de *Nr2f2* precedent a l'augment proteic, pel que és possible que els efectors de PI3Kα també actuïn sobre la regulació de l'expressió de COUP-TFII. La regulació del promotor de COUP-TFII, així com el control dels potenciadors o *enhancers* lligats a la seva transcripció és complexa i ha estat poc explorada. En aquestes regions s'han identificat nombrosos motius d'unió a factors de transcripció ETS, entre els que destaquen ERG, FLI1, ETS-1, BRG-1 o ETV1. Aquests factors han demostrat regular les regions potenciadores de l'expressió de diversos gens associats a la diferenciació arteriovenosa, incloent COUP-TFII. Tanmateix, la gran abundància de diferents membres ETS a l'endoteli, juntament amb la gran redundància que han demostrat alguns d'ells compliquen la identificació de patrons clars en la seva funció (313). Tot i que la comprensió de les dinàmiques dels factors ETS és un repte, seria especialment interessant explorar el rol de PI3K en la regulació d'aquestes proteïnes i la conseqüent regulació dels nivells d'expressió de COUP-TFII. Donant consistència a aquesta hipòtesi, l'activació de la senyalització PI3K/AKT ja ha estat associada a la regulació dels factors ERG (314) o ETS-1 (315).

La inhibició farmacològica de COUP-TFII en el nostre model animal no ha mostrat efectes significatius en el rescat del fenotip. No obstant, les dosis testades estan basades en l'administració per al tractament antitumoral prolongat en ratolins adults (283), pel que cap la possibilitat que no siguin les idònies per al tractament de la vasculatura de la retina postnatal. En paral·lel, hem importat el model genètic per a la deleció induïble de COUP-TFII i l'hem creuat amb els nostres models *Pik3ca*^{H1047R} per tal d'establir la combinació al·lèlica que ens permeti testar l'impacte de la pèrdua genètica de *Nr2f2* durant el desenvolupament de les malformacions vasculars. A diferència del tractament amb l'inhibidor de COUP-TFII, aquesta segona estratègia ens presenta la oportunitat de bloquejar l'expressió de la proteïna específicament a l'endoteli, pel que evitem possibles efectes en altres teixits i una acció més focalitzada a les malformacions vasculars. Tot i que aquests experiments encara es troben en un estadi molt preliminar, a partir dels les estratègies plantejades aquí esperem poder determinar la importància de COUP-TFII durant la segregació arteriovenosa descrita en aquestes lesions i desxifrar el mecanisme molecular que vincula la senyalització patogènica de PI3K i la sobreexpressió de *Nr2f2*. Finalment, el descobriment recent d'una molecular capaç d'activar PI3Kα de manera al·lostèrica (anomenat 1938) (316), ens proporciona una excel·lent eina química per al modelatge de la mutació H1047R en sistemes cel·lulars humans. Tot i que aquest nou compost encara no ha estat caracteritzat específicament en cultius endotelials, el seu descobriment ens obre les portes per a la validació del perfil molecular associat a COUP-TFII en cultius cel·lulars humans de diferents orígens i llinatges, com ara HUVECs o

HAECs. Aquest prometedor compost ens permetrà confirmar les nostres troballes prèvies en cèl·lules murines i determinar els efectes de la sobreactivació de PI3K en els dos grans compartiments vasculars, VECs i AECs.

2. Estudi metabolòmic de les ECs *Pik3ca*^{H1047R}

2.1. L'expressió endotelial de *Pik3ca*^{H1047R} desencadena una reprogramació metabòlica que sustenta l'augment proliferatiu i l'estrès oxidatiu

Durant la última dècada, els avanços en la investigació del metabolisme endotelial han determinat que aquest tipus cel·lular depèn directament del funcionament i l'adaptació metabòlica per garantir la correcta formació i el manteniment dels vasos. A més, l'endoteli presenta característiques metabòliques úniques i diferents a altres tipus cel·lulars, que han fet d'aquest tret diferencial una atractiva diana terapèutica a considerar. La maladaptació o la pertorbació de certes vies metabòliques són suficients per induir defectes patològics en la vasculatura, com per exemple el sobrecreixement dels vasos en un context oncogènic, o la malformació dels mateixos en malalties oculars (317).

Tradicionalment, les teràpies antiangiogèniques han estat centrades en el bloqueig dels factors de creixement, dels receptors de membrana o de les cascades de senyalització derivades, com és el cas dels inhibidors de VEGF. Tot i haver demostrat certa eficàcia, aquests compostos desencadenen nombroses toxicitats, i sovint, es veuen contrarestats per mecanismes compensatoris de la pròpia cèl·lula (317). És per aquest motiu que la investigació ha evolucionat cap al desenvolupament de tractaments antiangiogènics alternatius, molts d'ells focalitzats en modular el metabolisme endotelial. Aquesta estratègia proposa teràpies per normalitzar el metabolisme endotelial, i així, retornar la cèl·lula a un estat quiescent que no contribueixi a l'activitat angiogènica (318). En el camp de les malformacions vasculars la reprogramació metabòlica subjacent a l'activació i proliferació patològica de l'endoteli ha estat un aspecte escassament explorat.

La xarxa de senyalització PI3K/AKT té diversos efectes sobre el metabolisme cel·lular, ja sigui a partir de la regulació directa dels transportadors de nutrients i els enzims metabòlics, o el control dels factors de transcripció que regulen l'expressió dels components clau de les vies metabòliques. Més concretament, l'activació oncogènica de la via PI3K a les cèl·lules canceroses reprograma el metabolisme cel·lular amb l'objectiu d'incrementar la capacitat d'alimentar les elevades demandes anabòliques i el creixement aberrant del tumor (319). L'activació d'AKT ha demostrat potenciar el flux glicolític mitjançant l'actuació sobre el transportador de glucosa GLUT1, o l'activació d'enzims com HK2, PFKFB2. L'efecte d'AKT també ha estat relacionat amb l'augment de l'activitat de TKT, un enzim involucrat en la via no oxidativa de les pentoses fosfat i la producció de nucleòtids, així com amb l'activació de NRF2, el qual potencia les vies per al manteniment del balanç oxidatiu. Aquests són només alguns exemples de la implicació

de PI3K en la regulació del metabolisme, els quals han conduït a considerar la inhibició farmacològica de diversos enzims metabòlics induïts per la senyalització oncogènica de PI3K/AKT (319).

És per aquest motiu que un dels principals objectius d'aquesta tesi ha estat definir els canvis metabòlics desencadenats per l'expressió endotelial de *Pik3ca*^{H1047R}. L'anàlisi metabolòmic de ECs *Pik3ca*^{H1047R} ha demostrat que nombrosos metabòlits implicats en vies per a la producció d'ATP com la glicòlisi o el cicle dels àcids tricarboxílics es troben augmentats a les cèl·lules mutants. Es coneix que la glicòlisi té un paper crític a l'endoteli, ja que, a diferència de la majoria de teixits, la EC produeix la major part de l'energia mitjançant glicòlisi anaeròbica. De fet, diversos estudis han demostrat que la inhibició glicolítica indueix quiescència i inhibeix la proliferació endotelial (131). Donada la importància d'aquesta via per mantenir la despesa energètica i contribuir a l'estat angiogènic, els canvis identificats en la capacitat glicolítica de les cèl·lules *Pik3ca*^{H1047R} suggereixen un possible mecanisme cel·lular per sustentar la proliferació patogènica. Al llarg del nostre projecte hem tingut la oportunitat de testar la implicació de la glicòlisi en el desenvolupament de les lesions vasculars mitjançant l'ús del nostre model *in vivo*. Gràcies a la col·laboració del laboratori de la doctora De Bock, hem combinat el nostre model *Tip EC-Pik3ca*^{H1047R}-mTmG amb la deleció genètica de PFKFB3 (un important enzim regulador de la glicòlisi). Els anàlisis de la vasculatura postnatal de la retina denoten una disminució en la mida dels clons mutants, pel que la inhibició de la glicòlisi podria estar limitant la capacitat d'expansió d'aquestes cèl·lules. Tot i així, la hiperplàsia vascular no es veu rescatada en aquests animals, un fet que podria estar justificat per diferències en l'eficiència de recombinació de l'al·lel *Pik3ca*^{H1047R} (extraordinàriament eficient) i la deleció de PFKFB3. El bloqueig genètic de PFKFB3 ja ha demostrat el seu potencial antiangiogènic en tractaments antitumorals (320). De manera similar, la inhibició farmacològica d'aquest enzim (mitjançant l'inhibidor 3PO) també ha resultat millorar l'eficiència de tractaments per a la inhibició de VEGFR2 en casos de retinopaties vasculars (321). Així doncs, la inhibició de la glicòlisi durant el desenvolupament de les lesions induïdes per *Pik3ca*^{H1047R}, o inclús en situacions amb alt risc de relapse, podria esdevenir una opció prometedora per atenuar el creixement aberrant dels vasos.

El creixement i la divisió endotelial patogènica també requereixen l'augment de la síntesi de macromolècules biològiques. En el nostre anàlisi observem un increment de nombrosos metabòlits implicats en branques circumdants a la glicòlisi. La síntesi de pirimidines o la via de les pentoses fosfat contribueixen de manera directa a la constitució de nucleòtids i àcids nucleics. En la mateixa línia, la glutamina, també incrementada a les cèl·lules mutants, pren especial importància durant els processos anabòlics, i la seva depleció ha demostrat inhibir la proliferació endotelial (151). Per tant, creiem que aquest augment en el potencial anabòlic de la cèl·lula mutant és, en part, una peça clau per al creixement patològic dels vasos. D'altra banda, una major proliferació implica fer front a un major estrès oxidatiu. L'estudi presentat en aquest treball ha determinat un fort impacte en el metabolisme del glutatí i les vies d'oxidació-reducció de les cèl·lules *Pik3ca*^{H1047R}, suportat per l'augment transcripcional d'alguns dels enzims de la via. Tal i com s'ha vist en altres contextos patològics (322), aquestes evidències suggereixen que en front a l'excés oxidatiu, l'endoteli mutant es capaç de sobreactivar els mecanismes

per garantir la homeòstasi, i per tant, l'augment de la proliferació cel·lular. Tot i que la inhibició de la síntesi de glutatí no va resultar significativament efectiva en comparar la viabilitat de ECs *Pik3ca*^{H1047/WT} i control, és possible que la capacitat antioxidativa de la cèl·lula mutant adquireixi especial importància en condicions d'estrès, on la supervivència cel·lular i la proliferació es vegin realment compromeses. Per tant, seria convenient avaluar les conseqüències de la inhibició de la síntesi de glutatí en paral·lel a la inducció del desequilibri oxidatiu (mitjançant el tractament amb H₂O₂, per exemple) (322).

A banda dels aspectes discutits anteriorment, l'ampli anàlisi metabòlic de les cèl·lules *Pik3ca*^{H1047R} ha revelat altres vies significativament alterades. Aquest és el cas del cicle de la urea, una via amb especial importància per al manteniment dels nivells d'arginina i la producció sostinguda de NO, el qual es considera un potent modulador de l'angiogènesi relacionat amb diverses patologies vasculars (157,323).

En conclusió, el metabolisme endotelial, i en concret, el perfil metabòlic identificat sota l'expressió de la mutació activadora de *Pik3ca*, mostra un ampli espectre de canvis metabòlics que, en conjunt, alimenten el sobrecreixement endotelial. A partir d'aquests resultats caldrà explorar el potencial terapèutic d'aquestes vies i investigar en profunditat els mecanismes moleculars que connecten l'activació constitutiva de PI3K amb cada una d'elles.

3. Observacions finals

L'expressió mosaica de *Pik3ca*^{H1047R} a l'endoteli ens ha permès modelar l'origen de les malformacions vasculars a la retina postnatal de ratolí. A partir d'aquest model i la combinació de diverses estratègies genètiques, al llarg d'aquest treball hem pogut demostrar que els estímuls mitogènics presents en un context angiogènicament actiu actuen com a catalitzador del sobrecreixement dels vasos *Pik3ca*-mutants. A més a més del context extracel·lular, la subpoblació endotelial (capil·lar, vena o artèria) on tingui lloc la mutació també ha resultat ser determinant per a la manifestació clínica de les lesions. Mentre les cèl·lules endotelials arterials han demostrat ser refractàries a l'expressió de *Pik3ca*^{H1047R}, la inducció de la mateixa mutació en cèl·lules *tip* (cèl·lules endotelials pre-determinades a esdevenir part de les artèries) dona lloc a grans hiperplàsies vasculars. A més a més, la distribució i expansió patològica de les cèl·lules *tip* canvia per complet el seu patró de diferenciació, ja que l'augment de l'activitat PI3K i la conseqüent hiperproliferació afavoreixen identitats venoses i capil·lars que eviten l'especificació arterial de la cèl·lula. COUP-TFII, un important factor de transcripció implicat en la diferenciació venosa i involucrat en la progressió del cicle cel·lular, ha esdevingut un interessant enllaç entre l'expressió oncogènica de *Pik3ca* i el fenotip observat. *Pik3ca*^{H1047R} ha demostrat augmentar els nivells transcripcionals i proteics de COUP-TFII, causant l'expressió diferencial d'alguns dels seus objectius transcripcionals (*Ephb4* i *Cxcr4*). Finalment, l'estudi metabòlic d'aquestes mateixes cèl·lules ha revelat un perfil altament anabòlic i glicolític, un fet que podria estar directament relacionat amb la

sustentació dels elevats nivells de proliferació de la cèl·lula *Pik3ca*^{H1047R}. Concretament, en aquest projecte hem posat a prova la inhibició glicolítica durant la formació de les lesions, demostrant el seu impacte en la reducció de l'expansió clonal de les cèl·lules mutants.

En definitiva, en la present tesi hem pogut caracteritzar l'origen i el creixement de les malformacions vasculars causades per mutacions activadores al gen *Pik3ca*, evidenciant els canvis en la dinàmica de les cèl·lules mutants i les alteracions moleculars i metabòliques resultants de la sobreactivació de la via de senyalització PI3K. Els resultats sorgits d'aquest treball proporcionen evidències per comprendre amb major profunditat els processos biològics responsables de l'aparició de les lesions vasculars, tant mateix, també obren nombroses qüestions que caldrà seguir investigant. Afortunadament, l'emergència de noves i sofisticades tecnologies per a la seqüenciació de les cèl·lules a nivell individual podrien donar resposta als mecanismes moleculars subjacents als canvis observats. De la mateixa manera, l'ús del model proposat per a l'estudi fosfoproteòmic o l'estudi de la cromatina dels mutants *Pik3ca*^{H1047R} podrien ser clau per entendre les diferències descrites entre la resposta de cèl·lules arterials i cèl·lules venoses a la sobreactivació de PI3K. Per últim, la utilització de biòpsies provinents de lesions *PIK3CA*-mutants humanes serà essencial per validar els resultats obtinguts i així, poder considerar la aplicabilitat del coneixement generat per al disseny de teràpies moleculars dirigides.

CONCLUSIONS

Objectiu 1

- El desenvolupament de les malformacions vasculars causades per mutacions activadores a *Pik3ca* depèn de l'estimulació mitogènica present al teixit.
- La inducció de l'expressió endotelial de *Pik3ca*^{H1047R} amb dosis baixes de 4-OHT permet el modelatge del mosaïcisme genètic responsable de l'aparició de les malformacions vasculars.
- El model proposat recapitula les característiques més remarcables de les malformacions vasculars: hiperplàsia vascular, hiperproliferació endotelial, augment de la senyalització de la via PI3K i disminució del recobriment mural dels vasos.

Objectiu 2

- Les ECs *Pik3ca*^{H1047R} desenvolupen defectes vasculars exclusivament a venes i capil·lars, però no afecten a les artèries.
- Les cèl·lules arterials són refractàries a l'expressió de *Pik3ca*^{H1047R}.
- L'expressió de *Pik3ca*^{H1047R} en cèl·lules *tip* (pre-arterials) reprograma el destí de la cel·lula afavorint la seva expansió en venes i capil·lars i evitant l'especificació arterial.
- El model per al traçat de cèl·lules *tip* *Pik3ca*^{WT} i *Pik3ca*^{H1047R} iFlu-Mosaic-*Pik3ca*^{H1047R} demostra que tansols aquelles cèl·lules *Pik3ca*^{WT} són capaces de contribuir a la formació de les artèries, mentre les cèl·lules mutants desenvolupen lesions a venes i capil·lars.

Objectiu 3

- L'expressió endotelial de *Pik3ca*^{H1047R} i la corresponent sobreactivació de PI3K desencadena un augment del factor de transcripció COUP-TFII, tant a nivell transcripcional com a nivell proteic.
- L'augment de l'activitat PI3K i l'increment de COUP-TFII indueixen un perfil transcripcional que inclou la desregulació de gens directament implicats en la diferenciació arteriovenosa: *Ephb4* i *Cxcr4*.
- La inhibició farmacològica de PI3Kα en cèl·lules *Pik3ca*^{H1047R} reestableix els nivells de *Nr2f2* (COUP-TFII), *Ephb4* i *Cxcr4*.

Objectiu 4

- L'anàlisi metabolòmic de ECs *Pik3ca*^{H1047R} evidencia un augment del metabolisme anabòlic, les vies per a la síntesi d'ATP i el metabolisme redox.
- La sobreactivació endotelial de PI3K indueix l'augment de l'expressió de diversos enzims implicats en la síntesi i la metabolització del glutatió, així com els nivells de nombrosos metabòlits implicats en aquesta mateixa via.
- La sobreactivació endotelial de PI3K indueix l'augment de nombrosos metabòlits implicats en la glicòlisi.
- La inhibició genètica de la via de la glicòlisi en combinació amb el model *in vivo* de malformacions vasculars *Pik3ca*^{H1047R} mostra un rescat fenotípic limitant la capacitat d'expansió de les cèl·lules mutants.

REFERÈNCIES

1. Stratman AN, Yu JA, Mulligan TS, Butler MG, Sause ET, Weinstein BM. Principles of Developmental Genetics. Blood Vessel Formation. Princ Dev Genet Second Ed. 2015 Jan 1;421–49.
2. Plein A, Fantin A, Denti L, Pollard JW, Ruhrberg C. Erythro-myeloid progenitors contribute endothelial cells to blood vessels. *Nature* [Internet]. 2018 Oct 11 [cited 2023 Apr 5];562(7726):223. Available from: [/pmc/articles/PMC6289247/](https://pmc/articles/PMC6289247/)
3. Nikolova G, Lammert E. Interdependent development of blood vessels and organs. *Cell Tissue Res* [Internet]. 2003 Oct 1 [cited 2023 Feb 17];314(1):33–42. Available from: <https://link-springer-com.sire.ub.edu/article/10.1007/s00441-003-0739-8>
4. Makanya AN, Hlushchuk R, Djonov VG. Intussusceptive angiogenesis and its role in vascular morphogenesis, patterning, and remodeling. *Angiogenesis* [Internet]. 2009 Jun 5 [cited 2023 Apr 5];12(2):113–23. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10456-009-9129-5>
5. Hlushchuk R, Ehrbar M, Reichmuth P, Heinemann N, Styp-Rekowska B, Escher R, et al. Decrease in VEGF expression induces intussusceptive vascular pruning. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* [Internet]. 2011 Dec [cited 2023 Apr 5];31(12):2836–44. Available from: <https://www.ahajournals.org/doi/abs/10.1161/ATVBAHA.111.231811>
6. Hlushchuk R, Riesterer O, Baum O, Wood J, Gruber G, Pruschy M, et al. Tumor Recovery by Angiogenic Switch from Sprouting to Intussusceptive Angiogenesis after Treatment with PTK787/ZK222584 or Ionizing Radiation. *Am J Pathol* [Internet]. 2008 [cited 2023 Apr 5];173(4):1173. Available from: [/pmc/articles/PMC2543084/](https://pmc/articles/PMC2543084/)
7. Gerhardt H. VEGF and Endothelial Guidance in Angiogenic Sprouting. 2013 [cited 2023 Apr 5]; Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK6141/>
8. Akeson A, Herman A, Wiginton D, Greenberg J. Endothelial cell activation in a VEGF-A gradient: relevance to cell fate decisions. *Microvasc Res* [Internet]. 2010 Jul [cited 2023 Apr 5];80(1):65. Available from: [/pmc/articles/PMC2882073/](https://pmc/articles/PMC2882073/)
9. Abhinand CS, Raju R, Soumya SJ, Arya PS, Sudhakaran PR. VEGF-A/VEGFR2 signaling network in endothelial cells relevant to angiogenesis. *J Cell Commun Signal* [Internet]. 2016 Dec 1 [cited 2023 Mar 12];10(4):347. Available from: [/pmc/articles/PMC5143324/](https://pmc/articles/PMC5143324/)
10. Carmeliet P, Ferreira V, Breier G, Pollefeyt S, Kieckens L, Gertsenstein M, et al. Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nat* 1996 3806573 [Internet]. 1996 Apr 4 [cited 2023 Mar 12];380(6573):435–9. Available from: <https://www.nature.com/articles/380435a0>
11. Blancas AA, Wong LE, Glaser DE, McCloskey KE. Specialized Tip/Stalk-Like and Phalanx-Like Endothelial Cells from Embryonic Stem Cells. *Stem Cells Dev* [Internet]. 2013 May 5 [cited 2023 Mar 11];22(9):1398. Available from: [/pmc/articles/PMC3629848/](https://pmc/articles/PMC3629848/)
12. Benedito R, Rocha SF, Woeste M, Zamykal M, Radtke F, Casanovas O, et al. Notch-dependent VEGFR3 upregulation allows angiogenesis without VEGF–VEGFR2 signalling. *Nat* 2012 4847392 [Internet]. 2012 Mar 18 [cited 2023 Mar 12];484(7392):110–4. Available from: <https://www.nature.com/articles/nature10908>
13. Ho VC, Duan LJ, Cronin C, Liang BT, Fong GH. Elevated VEGF Receptor-2 Abundance Contributes to Increased Angiogenesis in VEGF Receptor-1 Deficient Mice. *Circulation* [Internet]. 2012 Aug 8 [cited 2023 Mar 12];126(6):741. Available from: [/pmc/articles/PMC3442373/](https://pmc/articles/PMC3442373/)
14. Tammela T, Zarkada G, Wallgard E, Murtomäki A, Suchting S, Wirzenius M, et al. Blocking VEGFR-3 suppresses angiogenic sprouting and vascular network formation. *Nat* 2008 4547204 [Internet]. 2008 Jun 25 [cited 2023 Mar 12];454(7204):656–60. Available from: <https://www.nature.com/articles/nature07083>
15. Heinolainen K, Karaman S, D'Amico G, Tammela T, Sormunen R, Eklund L, et al. VEGFR3 Modulates Vascular Permeability by Controlling VEGF/VEGFR2 Signaling. *Circ Res* [Internet]. 2017 Apr 28 [cited 2023 Mar 12];120(9):1414–25. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28298294/>
16. Korhonen EA, Murtomäki A, Jha SK, Anisimov A, Pink A, Zhang Y, et al. Lymphangiogenesis requires Ang2/Tie/PI3K signaling for VEGFR3 cell-surface expression. *J Clin Invest* [Internet]. 2022 Aug 8

- [cited 2023 Apr 6];132(15). Available from: [/pmc/articles/PMC9337826/](#)
17. Fischer A, Schumacher N, Maier M, Sendtner M, Gessler M. The Notch target genes Hey1 and Hey2 are required for embryonic vascular development. *Genes Dev* [Internet]. 2004 Apr 4 [cited 2023 Mar 8];18(8):901. Available from: [/pmc/articles/PMC395849/](#)
18. Eble J, Niland S. The Extracellular Matrix of Blood Vessels. *Curr Pharm Des*. 2009 Mar 31;15(12):1385–400.
19. Krueger J, Liu D, Scholz K, Zimmer A, Shi Y, Klein C, et al. Flt1 acts as a negative regulator of tip cell formation and branching morphogenesis in the zebrafish embryo. *Development* [Internet]. 2011 May 5 [cited 2023 Apr 5];138(10):2111–20. Available from: [/pmc/articles/PMC3082310/](#)
20. Serra H, Chivite I, Angulo-Urarte A, Soler A, Sutherland JD, Arruabarrena-Aristorena A, et al. PTEN mediates Notch-dependent stalk cell arrest in angiogenesis. *Nat Commun* [Internet]. 2015 Jul 31 [cited 2023 Mar 6];6. Available from: [/pmc/articles/PMC5426521/](#)
21. Krebs LT, Deftos ML, Bevan MJ, Gridley T. The Nrarp Gene Encodes an Ankyrin-Repeat Protein That Is Transcriptionally Regulated by the Notch Signaling Pathway. *Dev Biol*. 2001 Oct 1;238(1):110–9.
22. Phng LK, Potente M, Leslie JD, Babbage J, Nyqvist D, Lobov I, et al. Nrarp coordinates endothelial Notch and Wnt signaling to control vessel density in angiogenesis. *Dev Cell* [Internet]. 2009 Jan 20 [cited 2023 Mar 5];16(1):70–82. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19154719/>
23. Jakobsson L, Franco CA, Bentley K, Collins RT, Ponsioen B, Aspalter IM, et al. Endothelial cells dynamically compete for the tip cell position during angiogenic sprouting. *Nat Publ Gr*. 2010;
24. Leslie JD, Ariza-McNaughton L, Bermange AL, McAdow R, Johnson SL, Lewis J. Endothelial signalling by the Notch ligand Delta-like 4 restricts angiogenesis. *Development* [Internet]. 2007 Mar 1 [cited 2023 Feb 17];134(5):839–44. Available from: <https://journals.biologists.com/dev/article/134/5/839/43604/Endothelial-signalling-by-the-Notch-ligand-Delta>
25. Hellström M, Phng LK, Hofmann JJ, Wallgard E, Coultas L, Lindblom P, et al. Dll4 signalling through Notch1 regulates formation of tip cells during angiogenesis. *Nat* 2006 445:129 [Internet]. 2007 Jan 28 [cited 2023 Feb 17];445(7129):776–80. Available from: <https://www.nature.com/articles/nature05571>
26. Bentley K, Franco CA, Philippides A, Blanco R, Dierkes M, Gebala V, et al. The role of differential VE-cadherin dynamics in cell rearrangement during angiogenesis. *Nat Cell Biol*. 2014;16(4):309–21.
27. Phng LK, Gerhardt H. Angiogenesis: A Team Effort Coordinated by Notch. *Dev Cell*. 2009 Feb 17;16(2):196–208.
28. Potente M, Gerhardt H, Carmeliet P. Basic and Therapeutic Aspects of Angiogenesis. *Cell* [Internet]. 2011 Sep 16 [cited 2023 Mar 6];146(6):873–87. Available from: <http://www.cell.com/article/S0092867411010099/fulltext>
29. Del Toro R, Prahst C, Mathivet T, Siegfried G, Kaminker JS, Larrivee B, et al. Identification and functional analysis of endothelial tip cell-enriched genes. *Blood* [Internet]. 2010 Nov 11 [cited 2023 Mar 12];116(19):4025–33. Available from: <https://ashpublications.org/blood/article/116/19/4025/28074/Identification-and-functional-analysis-of>
30. Fantin A, Vieira JM, Gestri G, Denti L, Schwarz Q, Prykhodzhiy S, et al. Tissue macrophages act as cellular chaperones for vascular anastomosis downstream of VEGF-mediated endothelial tip cell induction. *Blood* [Internet]. 2010 Aug 8 [cited 2023 Mar 6];116(5):829. Available from: [/pmc/articles/PMC2938310/](#)
31. Iruela-Arispe ML, Davis GE. Cellular and molecular mechanisms of vascular lumen formation. *Dev Cell* [Internet]. 2009 Feb 17 [cited 2023 Mar 5];16(2):222–31. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19217424/>
32. Charpentier MS, Conlon FL. Cellular and molecular mechanisms underlying blood vessel lumen formation. *Bioessays* [Internet]. 2014 Mar [cited 2023 Mar 5];36(3):251. Available from: [/pmc/articles/PMC4187360/](#)
33. Zeeb M, Strilic B, Lammert E. Resolving cell–cell junctions: lumen formation in blood vessels. *Curr Opin Cell Biol*. 2010 Oct 1;22(5):626–32.
34. Jain RK. Molecular regulation of vessel maturation. *Nat Med* 2003 9:685 [Internet]. 2003 Jun 1 [cited 2023 Mar 6];9(6):685–93. Available from: <https://www.nature.com/articles/nm0603-685>
35. Dekker RJ, Van Soest S, Fontijn RD, Salamanca S, De Groot PG, VanBavel E, et al. Prolonged fluid

- shear stress induces a distinct set of endothelial cell genes, most specifically lung Krüppel-like factor (KLF2). *Blood*. 2002 Sep 1;100(5):1689–98.
36. Dyer LA, Patterson C. Development of the Endothelium: An Emphasis on Heterogeneity. *Semin Thromb Hemost* [Internet]. 2010 [cited 2023 Mar 6];36(3):227. Available from: [/pmc/articles/PMC3328212/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1981212/)
37. Lampugnani MG. Endothelial Cell-to-Cell Junctions: Adhesion and Signaling in Physiology and Pathology. *Cold Spring Harb Perspect Med* [Internet]. 2012 [cited 2023 Mar 8];2(10). Available from: [/pmc/articles/PMC3475402/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23475402/)
38. Haddad-Tóvolli R, Dragano NRV, Ramalho AFS, Velloso LA. Development and function of the blood-brain barrier in the context of metabolic control. *Front Neurosci*. 2017 Apr 21;11(APR):224.
39. Kniesel U, Risau W, Wolburg H. Development of blood-brain barrier tight junctions in the rat cortex. *Dev Brain Res*. 1996 Oct 23;96(1–2):229–40.
40. Giannotta M, Trani M, Dejana E. VE-Cadherin and Endothelial Adherens Junctions: Active Guardians of Vascular Integrity. *Dev Cell* [Internet]. 2013 Sep 16 [cited 2023 Mar 8];26(5):441–54. Available from: <http://www.cell.com/article/S1534580713005078/fulltext>
41. Carmeliet P, Lampugnani MG, Moons L, Breviaro F, Compernelle V, Bono F, et al. Targeted deficiency or cytosolic truncation of the VE-cadherin gene in mice impairs VEGF-mediated endothelial survival and angiogenesis. *Cell* [Internet]. 1999 Jul 23 [cited 2023 Mar 8];98(2):147–57. Available from: <http://www.cell.com/article/S0092867400810107/fulltext>
42. Yamazaki T, Mukouyama YS. Tissue Specific Origin, Development, and Pathological Perspectives of Pericytes. *Front Cardiovasc Med* [Internet]. 2018 Jun 27 [cited 2023 Mar 8];5:78. Available from: [/pmc/articles/PMC6030356/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3030356/)
43. Ozerdem U, Grako KA, Dahlin-Huppe K, Monosov E, Stallcup WB. NG2 proteoglycan is expressed exclusively by mural cells during vascular morphogenesis. *Dev Dyn* [Internet]. 2001 Oct 1 [cited 2023 Mar 8];222(2):218–27. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/dvdy.1200>
44. Winkler EA, Bell RD, Zlokovic B V. Pericyte-specific expression of PDGF beta receptor in mouse models with normal and deficient PDGF beta receptor signaling. *Mol Neurodegener* [Internet]. 2010 [cited 2023 Mar 8];5(1):32. Available from: [/pmc/articles/PMC2936891/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1936891/)
45. Nehls V, Drenckhahn D. Heterogeneity of microvascular pericytes for smooth muscle type alpha-actin. *J Cell Biol* [Internet]. 1991 Apr 4 [cited 2023 Mar 8];113(1):147. Available from: [/pmc/articles/PMC2288926/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1936891/)
46. Nehls V, Denzer K, Drenckhahn D. Pericyte involvement in capillary sprouting during angiogenesis in situ. *Cell Tissue Res* [Internet]. 1992 [cited 2023 Mar 8];270(3):469–74. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1283113/>
47. Carmeliet P. Angiogenesis in health and disease. *Nat Med* 2003 96 [Internet]. 2003 Jun 1 [cited 2023 Feb 15];9(6):653–60. Available from: <https://www.nature.com/articles/nm0603-653>
48. Gaengel K, Genové G, Armulik A, Betsholtz C. Endothelial-Mural Cell Signaling in Vascular Development and Angiogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* [Internet]. 2009 May 1 [cited 2023 Mar 8];29(5):630–8. Available from: <https://www.ahajournals.org/doi/abs/10.1161/ATVBAHA.107.161521>
49. Hellström M, Kalén M, Lindahl P, Abramsson A, Betsholtz C. Role of PDGF-B and PDGFR-β in recruitment of vascular smooth muscle cells and pericytes during embryonic blood vessel formation in the mouse. *Development* [Internet]. 1999 Jul 15 [cited 2023 Mar 8];126(14):3047–55. Available from: <https://journals.biologists.com/dev/article/126/14/3047/40378/Role-of-PDGF-B-and-PDGFR-in-recruitment-of>
50. Hirschi KK, Rohovsky SA, Beck LH, Smith SR, D'Amore PA. Endothelial Cells Modulate the Proliferation of Mural Cell Precursors via Platelet-Derived Growth Factor-BB and Heterotypic Cell Contact. *Circ Res* [Internet]. 1999 Feb 19 [cited 2023 Mar 8];84(3):298–305. Available from: <https://www.ahajournals.org/doi/abs/10.1161/01.res.84.3.298>
51. Lindahl P, Johansson BR, Leveén P, Betsholtz C. Pericyte Loss and Microaneurysm Formation in PDGF-B-Deficient Mice. *Science* (80-) [Internet]. 1997 Jul 11 [cited 2023 Mar 8];277(5323):242–5. Available from: <https://www.science.org/doi/10.1126/science.277.5323.242>
52. Augustin HG, Young Koh G, Thurston G, Alitalo K. Control of vascular morphogenesis and homeostasis through the angiopoietin–Tie system. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2009 103 [Internet]. 2009 Mar [cited 2023 Mar 8];10(3):165–77. Available from: <https://www.nature.com/articles/nrm2639>

REFERÈNCIES

53. Huang H, Bhat A, Woodnutt G, Lappe R. Targeting the ANGPT–TIE2 pathway in malignancy. *Nat Rev Cancer* 2010 108 [Internet]. 2010 Aug [cited 2023 Mar 8];10(8):575–85. Available from: <https://www.nature.com/articles/nrc2894>
54. Mongiat M, Andreuzzi E, Tarticchio G, Paulitti A. Extracellular Matrix, a Hard Player in Angiogenesis. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2016 Nov 1 [cited 2023 Mar 11];17(11). Available from: </pmc/articles/PMC5133823/>
55. Neve A, Cantatore FP, Maruotti N, Corrado A, Ribatti D. Extracellular Matrix Modulates Angiogenesis in Physiological and Pathological Conditions. *Biomed Res Int* [Internet]. 2014 [cited 2023 Mar 11];2014. Available from: </pmc/articles/PMC4052469/>
56. Senger DR, Davis GE. Angiogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Biol* [Internet]. 2011 Aug 1 [cited 2023 Mar 11];3(8):a005090. Available from: <http://cshperspectives.cshlp.org/content/3/8/a005090.full>
57. Korn C, Augustin HG. Mechanisms of Vessel Pruning and Regression. *Dev Cell* [Internet]. 2015 Jul 6 [cited 2023 Mar 11];34(1):5–17. Available from: <http://www.cell.com/article/S1534580715003937/fulltext>
58. Franco CA, Jones ML, Bernabeu MO, Geudens I, Mathivet T, Rosa A. Dynamic Endothelial Cell Rearrangements Drive Developmental Vessel Regression. *PLoS Biol* [Internet]. 2015 [cited 2023 Mar 11];13(4):1002125. Available from: <http://www.mapper-project.eu/>,
59. Chen Q, Jiang L, Li C, Hu D, Bu J-W. Haemodynamics-Driven Developmental Pruning of Brain Vasculature in Zebrafish. *PLoS Biol* [Internet]. 2012 [cited 2023 Mar 11];10(8):1001374. Available from: www.plosbiology.org
60. Udan RS, Vadakkan TJ, Dickinson ME. Dynamic responses of endothelial cells to changes in blood flow during vascular remodeling of the mouse yolk sac. *Dev* [Internet]. 2013 Oct 1 [cited 2023 Mar 11];140(19):4041–50. Available from: </pmc/articles/PMC3775417/>
61. Domigan CK, Warren CM, Antanesian V, Happel K, Ziyad S, Lee S, et al. Autocrine VEGF maintains endothelial survival through regulation of metabolism and autophagy. *J Cell Sci* [Internet]. 2015 Jun 1 [cited 2023 Mar 11];128(12):2236–48. Available from: </pmc/articles/PMC4487014/>
62. Scharpfenecker M, Fiedler U, Reiss Y, Augustin HG. The Tie-2 ligand angiopoietin-2 destabilizes quiescent endothelium through an internal autocrine loop mechanism. *J Cell Sci*. 2005 Feb 15;118(4):771–80.
63. Ricard N, Bailly S, Guignabert C, Simons M. The quiescent endothelium: signalling pathways regulating organ-specific endothelial normalcy. *Nat Rev Cardiol* 2021 188 [Internet]. 2021 Feb 24 [cited 2023 Mar 12];18(8):565–80. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41569-021-00517-4>
64. Cunha SI, Magnusson PU, Dejana E, Lampugnani MG. Deregulated TGF- β /BMP Signaling in Vascular Malformations. *Circ Res* [Internet]. 2017 Sep 1 [cited 2023 Mar 12];121(8):981–99. Available from: <https://www.ahajournals.org/doi/abs/10.1161/CIRCRESAHA.117.309930>
65. Red-Horse K, Siekmann AF. Veins and Arteries Build Hierarchical Branching Patterns Differently: Bottom-Up versus Top-Down. *BioEssays* [Internet]. 2019 Mar 1 [cited 2023 Mar 23];41(3):1800198. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/bies.201800198>
66. Red-Horse K, Ueno H, Weissman IL, Krasnow MA. Coronary arteries form by developmental reprogramming of venous cells. *Nature* [Internet]. 2010 Mar 3 [cited 2023 Mar 23];464(7288):549. Available from: </pmc/articles/PMC2924433/>
67. Bussmann J, Wolfe SA, Siekmann AF. Arterial-venous network formation during brain vascularization involves hemodynamic regulation of chemokine signaling. *Development* [Internet]. 2011 May 1 [cited 2023 Mar 23];138(9):1717–26. Available from: <https://journals.biologists.com/dev/article/138/9/1717/44977/Arterial-venous-network-formation-during-brain>
68. Hou S, Li Z, Dong J, Gao Y, Chang Z, Ding X, et al. Heterogeneity in endothelial cells and widespread venous arterialization during early vascular development in mammals. *Cell Res* [Internet]. 2022 Apr 25 [cited 2023 Mar 23];32(4):333. Available from: </pmc/articles/PMC8975889/>
69. Rhee S, Wu JC. Vein to artery: the first arteriogenesis in the mammalian embryo. *Cell Res* 2022 324 [Internet]. 2022 Feb 14 [cited 2023 Mar 23];32(4):325–6. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41422-022-00629-7>
70. Kalucka J, de Rooij LPMH, Goveia J, Rohlenova K, Dumas SJ, Meta E, et al. Single-Cell Transcriptome Atlas of Murine Endothelial Cells. *Cell* [Internet]. 2020 Feb 20 [cited 2023 Mar

- 23];180(4):764-779.e20. Available from: <http://www.cell.com/article/S0092867420300623/fulltext>
71. Paik DT, Tian L, Williams IM, Rhee S, Zhang H, Liu C, et al. Single-cell RNA-seq Unveils Unique Transcriptomic Signatures of Organ-Specific Endothelial Cells. *Circulation* [Internet]. 2020 Nov 11 [cited 2023 Mar 23];142(19):1848. Available from: [/pmc/articles/PMC7658053/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33000000/)
72. Xu C, Hasan SS, Schmidt I, Rocha SF, Pitulescu ME, Bussmann J, et al. Arteries are formed by vein-derived endothelial tip cells. *Nat Commun* [Internet]. 2014 [cited 2023 Mar 23];5. Available from: [/pmc/articles/PMC4275597/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25000000/)
73. Pitulescu ME, Schmidt I, Giaimo BD, Antoine T, Berkenfeld F, Ferrante F, et al. Dll4 and Notch signalling couples sprouting angiogenesis and artery formation. *Nat Cell Biol* [Internet]. 2017 Aug 1 [cited 2023 Mar 23];19(8):915–27. Available from: <https://escholarship.org/uc/item/7hc1r9g2>
74. Wang HU, Chen ZF, Anderson DJ. Molecular distinction and angiogenic interaction between embryonic arteries and veins revealed by ephrin-B2 and its receptor Eph-B4. *Cell* [Internet]. 1998 May 29 [cited 2023 Mar 14];93(5):741–53. Available from: <http://www.cell.com/article/S0092867400814361/fulltext>
75. Adams RH, Wilkinson GA, Weiss C, Diella F, Gale NW, Deutsch U, et al. Roles of ephrinB ligands and EphB receptors in cardiovascular development: demarcation of arterial/venous domains, vascular morphogenesis, and sprouting angiogenesis. *Genes Dev* [Internet]. 1999 Feb 2 [cited 2023 Mar 14];13(3):295. Available from: [/pmc/articles/PMC316426/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10000000/)
76. Reed KE, Westphale EM, Larson DM, Wang HZ, Veenstra RD, Beyer EC. Molecular cloning and functional expression of human connexin37, an endothelial cell gap junction protein. *J Clin Invest* [Internet]. 1993 [cited 2023 Mar 14];91(3):997. Available from: [/pmc/articles/PMC288052/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/13000000/)
77. Bruzzone R, Haefliger JA, Gimlich RL, Paul DL. Connexin40, a component of gap junctions in vascular endothelium, is restricted in its ability to interact with other connexins. *Mol Biol Cell* [Internet]. 1993 [cited 2023 Mar 14];4(1):7. Available from: [/pmc/articles/PMC300896/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/13000000/)
78. Shutter JR, Scully S, Fan W, Richards WG, Kitajewski J, Deblandre GA, et al. Dll4, a novel Notch ligand expressed in arterial endothelium. *Genes Dev* [Internet]. 2000 Jun 6 [cited 2023 Mar 14];14(11):1313. Available from: [/pmc/articles/PMC316657/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11000000/)
79. Herzog Y, Kalcheim C, Kahane N, Reshef R, Neufeld G. Differential expression of neuropilin-1 and neuropilin-2 in arteries and veins. *Mech Dev*. 2001 Nov 1;109(1):115–9.
80. Lawson ND, Scheer N, Pham VN, Kim CH, Chitnis AB, Campos-Ortega JA, et al. Notch signaling is required for arterial-venous differentiation during embryonic vascular development. *Development* [Internet]. 2001 Oct 1 [cited 2023 Mar 14];128(19):3675–83. Available from: <https://journals.biologists.com/dev/article/128/19/3675/41372/Notch-signaling-is-required-for-arterial-venous>
81. You LR, Lin FJ, Lee CT, DeMayo FJ, Tsai MJ, Tsai SY. Suppression of Notch signalling by the COUP-TFII transcription factor regulates vein identity. *Nat* 2005 4357038 [Internet]. 2005 May 5 [cited 2023 Mar 2];435(7038):98–104. Available from: <https://www.nature.com/articles/nature03511>
82. Saint-Geniez M, Argence CB, Knibiehler B, Audigier Y. The msr/apj gene encoding the apelin receptor is an early and specific marker of the venous phenotype in the retinal vasculature. *Gene Expr Patterns*. 2003 Aug 1;3(4):467–72.
83. Claxton S, Fruttiger M. Oxygen modifies artery differentiation and network morphogenesis in the retinal vasculature. *Dev Dyn* [Internet]. 2005 Jul 1 [cited 2023 Apr 6];233(3):822–8. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/dvdy.20407>
84. Masumura T, Yamamoto K, Shimizu N, Obi S, Ando J. Shear Stress Increases Expression of the Arterial Endothelial Marker EphrinB2 in Murine ES Cells via the VEGF-Notch Signaling Pathways. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* [Internet]. 2009 Dec 1 [cited 2023 Mar 15];29(12):2125–31. Available from: <https://www.ahajournals.org/doi/abs/10.1161/ATVBAHA.109.193185>
85. Yang C, Guo Y, Jadowiec CC, Li X, Lv W, Model LS, et al. VEGF-A inhibits EphB4 and stimulates dll4 expression in adult endothelial cells. *J Surg Res* [Internet]. 2013 Jul [cited 2023 Mar 15];183(1):478. Available from: [/pmc/articles/PMC3661748/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23000000/)
86. Wolf K, Hu H, Isaji T, Dardik A. Molecular identity of arteries, veins and lymphatics. *J Vasc Surg* [Internet]. 2019 Jan 1 [cited 2023 Mar 14];69(1):253. Available from: [/pmc/articles/PMC6309638/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30000000/)
87. Pitulescu ME, Adams RH. Regulation of signaling interactions and receptor endocytosis in growing blood vessels. *Cell Adh Migr* [Internet]. 2014 Jul 1 [cited 2023 Mar 14];8(4):366. Available from:

- /pmc/articles/PMC4594521/
88. Davis S, Gale NW, Aldrich TH, Maisonpierre PC, Lhotak V, Pawson T, et al. Ligands for EPH-Related Receptor Tyrosine Kinases that Require Membrane Attachment or Clustering for Activity. *Science* (80-) [Internet]. 1994 [cited 2023 Apr 8];266(5186):816–9. Available from: <https://www.science.org/doi/10.1126/science.7973638>
 89. Poliakov A, Cotrina ML, Pasini A, Wilkinson DG. Regulation of EphB2 activation and cell repulsion by feedback control of the MAPK pathway. *J Cell Biol* [Internet]. 2008 Dec 12 [cited 2023 Apr 8];183(5):933. Available from: /pmc/articles/PMC2592822/
 90. Hashimoto T, Tsuneki M, Foster TR, Santana JM, Bai H, Wang M, et al. Membrane-Mediated Regulation of Vascular Identity. *Birth Defects Res C Embryo Today* [Internet]. 2016 Mar 1 [cited 2023 Apr 8];108(1):65. Available from: /pmc/articles/PMC5310768/
 91. Mertens-Walker I, Fernandini BC, Maharaj MSN, Rockstroh A, Nelson CC, Herington AC, et al. The tumour-promoting receptor tyrosine kinase, EphB4, regulates expression of Integrin- β 8 in prostate cancer cells. *BMC Cancer* [Internet]. 2015 Mar 22 [cited 2023 Mar 14];15(1). Available from: /pmc/articles/PMC4389669/
 92. Nakayama A, Nakayama M, Turner CJ, Höing S, Lepore JJ, Adams RH. Ephrin-B2 controls PDGFR β internalization and signaling. *Genes Dev* [Internet]. 2013 Dec 12 [cited 2023 Mar 14];27(23):2576. Available from: /pmc/articles/PMC3861671/
 93. Polvani S, Pepe S, Milani S, Galli A. COUP-TFII in Health and Disease. *Cells* [Internet]. 2020 Jan 1 [cited 2023 Mar 23];9(1). Available from: /pmc/articles/PMC7016888/
 94. Naka-Kaneda H, Nakamura S, Igarashi M, Aoi H, Kanki H, Tsuyama J, et al. The miR-17/106-p38 axis is a key regulator of the neurogenic-to-gliogenic transition in developing neural stem/progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2014 Jan 28 [cited 2023 Mar 23];111(4):1604–9. Available from: <https://www.pnas.org/doi/abs/10.1073/pnas.1315567111>
 95. Corada M, Morini MF, Dejana E. Signaling pathways in the specification of arteries and veins. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* [Internet]. 2014 Nov 1 [cited 2023 Mar 12];34(11):2372–7. Available from: <https://www.ahajournals.org/doi/abs/10.1161/ATVBAHA.114.303218>
 96. Swift MR, Pham VN, Castranova D, Bell K, Poole RJ, Weinstein BM. SoxF factors and Notch regulate nr2f2 gene expression during venous differentiation in zebrafish. *Dev Biol* [Internet]. 2014 Jun 6 [cited 2023 Mar 15];390(2):116. Available from: /pmc/articles/PMC4104406/
 97. Chen X, Qin J, Cheng CM, Tsai MJ, Tsai SY. COUP-TFII Is a Major Regulator of Cell Cycle and Notch Signaling Pathways. *Mol Endocrinol* [Internet]. 2012 Aug 1 [cited 2023 Mar 15];26(8):1268. Available from: /pmc/articles/PMC3404301/
 98. Aranguren XL, Beerens M, Coppiello G, Wiese C, Vandersmissen I, Nigro A Lo, et al. COUP-TFII orchestrates venous and lymphatic endothelial identity by homo- or hetero-dimerisation with PROX1. *J Cell Sci* [Internet]. 2013 Mar 1 [cited 2023 Mar 15];126(5):1164–75. Available from: <https://journals.biologists.com/jcs/article/126/5/1164/54245/COUP-TFII-orchestrates-venous-and-lymphatic>
 99. Petit FG, Salas R, Tsai MJ, Tsai SY. The regulation of COUP-TFII gene expression by Ets-1 is enhanced by the steroid receptor co-activators. *Mech Ageing Dev* [Internet]. 2004 Oct [cited 2023 Mar 23];125(10–11):719–32. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15541767/>
 100. Li W, Liu C, Burns N, Hayashi J, Yoshida A, Sajja A, et al. Alterations in the spatiotemporal expression of the chemokine receptor CXCR4 in endothelial cells cause failure of hierarchical vascular branching. *Dev Biol*. 2021 Sep 1;477:70–84.
 101. Siekmann AF, Standley C, Fogarty KE, Wolfe SA, Lawson ND. Chemokine signaling guides regional patterning of the first embryonic artery. *Genes Dev* [Internet]. 2009 Oct 10 [cited 2023 Mar 23];23(19):2272. Available from: /pmc/articles/PMC2758748/
 102. Tachibana K, Hirota S, Iizasa H, Yoshida H, Kawabata K, Kataoka Y, et al. The chemokine receptor CXCR4 is essential for vascularization of the gastrointestinal tract. *Nat* 1998 393:6685 [Internet]. 1998 Jun 11 [cited 2023 Mar 15];393(6685):591–4. Available from: <https://www.nature.com/articles/31261>
 103. Zhang Y, Ortsater H, Martinez-Corral I, Makinen T. Cdh5-lineage-independent origin of dermal lymphatics shown by temporally restricted lineage tracing. *Life Sci Alliance* [Internet]. 2022 Nov 1 [cited 2023 Mar 15];5(11). Available from: /pmc/articles/PMC9375154/
 104. Srinivasan RS, Dillard ME, Lagutin O V., Lin FJ, Tsai S, Tsai MJ, et al. Lineage tracing demonstrates the venous origin of the mammalian lymphatic vasculature. *Genes Dev* [Internet]. 2007 Oct 10 [cited 2023 Mar 15];21(19):2422. Available from: /pmc/articles/PMC1993873/

105. Wigle JT, Oliver G. Prox1 function is required for the development of the murine lymphatic system. *Cell* [Internet]. 1999 Sep 17 [cited 2023 Mar 15];98(6):769–78. Available from: <http://www.cell.com/article/S0092867400815111/fulltext>
106. François M, Caprini A, Hosking B, Orsenigo F, Wilhelm D, Browne C, et al. Sox18 induces development of the lymphatic vasculature in mice. *Nat* 2008 4567222 [Internet]. 2008 Dec 1 [cited 2023 Mar 15];456(7222):643–7. Available from: <https://www.nature.com/articles/nature07391>
107. Dumont DJ, Jussila L, Taipale J, Lymboussaki A, Mustonen T, Pajusola K, et al. Cardiovascular Failure in Mouse Embryos Deficient in VEGF Receptor-3. *Science* (80-) [Internet]. 1998 Oct 30 [cited 2023 Mar 15];282(5390):946–9. Available from: <https://www.science.org/doi/10.1126/science.282.5390.946>
108. Kukk E, Lymboussaki A, Taira S, Kaipainen A, Jeltsch M, Joukov V, et al. VEGF-C receptor binding and pattern of expression with VEGFR-3 suggests a role in lymphatic vascular development. *Development* [Internet]. 1996 Dec 1 [cited 2023 Mar 15];122(12):3829–37. Available from: <https://journals.biologists.com/dev/article/122/12/3829/39083/VEGF-C-receptor-binding-and-pattern-of-expression>
109. Deng Y, Zhang X, Simons M. Molecular controls of lymphatic VEGFR3 signaling. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* [Internet]. 2015 Feb 2 [cited 2023 Mar 15];35(2):421. Available from: </pmc/articles/PMC4304921/>
110. Trimm E, Red-Horse K. Vascular endothelial cell development and diversity. *Nat Rev Cardiol* 2022 203 [Internet]. 2022 Oct 5 [cited 2023 Mar 15];20(3):197–210. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41569-022-00770-1>
111. Fang JS, Coon BG, Gillis N, Chen Z, Qiu J, Chittenden TW, et al. Shear-induced Notch-Cx37-p27 axis arrests endothelial cell cycle to enable arterial specification. *Nat Commun* 2017 81 [Internet]. 2017 Dec 15 [cited 2023 Mar 15];8(1):1–14. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41467-017-01742-7>
112. Luo W, Garcia-Gonzalez I, Fernández-Chacón M, Casquero-Garcia V, Sanchez-Muñoz MS, Mühleder S, et al. Arterialization requires the timely suppression of cell growth. *Nature* [Internet]. 2021 Jan 1 [cited 2023 Mar 15];589(7842):437. Available from: </pmc/articles/PMC7116692/>
113. Chavkin NW, Genet G, Poulet M, Jeffery ED, Marziano C, Genet N, et al. Endothelial cell cycle state determines propensity for arterial-venous fate. *Nat Commun* 2022 131 [Internet]. 2022 Oct 6 [cited 2023 Mar 15];13(1):1–17. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41467-022-33324-7>
114. Sissaoui S, Yu J, Yan A, Li R, Yukselen O, Kucukural A, et al. Genomic Characterization of Endothelial Enhancers Reveals a Multifunctional Role for NR2F2 in Regulation of Arteriovenous Gene Expression. *Circ Res* [Internet]. 2020 Mar 3 [cited 2023 Mar 15];126(7):875. Available from: </pmc/articles/PMC7212523/>
115. Hong CC, Kume T, Peterson RT. Role of Cross Talk between PI3-Kinase and ERK/MAP Kinase Pathways in Artery-Vein Specification. *Circ Res* [Internet]. 2008 Sep 9 [cited 2023 Mar 30];103(6):573. Available from: </pmc/articles/PMC2768581/>
116. Chu M, Li T, Shen B, Cao X, Zhong H, Zhang L, et al. Angiopoietin receptor Tie2 is required for vein specification and maintenance via regulating COUP-TFII. *Elife*. 2016 Dec 22;5(DECEMBER2016).
117. Ren B, Deng Y, Mukhopadhyay A, Lanahan AA, Zhuang ZW, Moodie KL, et al. ERK1/2-Akt1 crosstalk regulates arteriogenesis in mice and zebrafish. *J Clin Invest*. 2010 Apr 1;120(4):1217–28.
118. Hong CC, Peterson QP, Hong JY, Peterson RT. Artery/Vein Specification Is Governed by Opposing Phosphatidylinositol-3 Kinase and MAP Kinase/ERK Signaling. *Curr Biol* [Internet]. 2006 Jul 7 [cited 2023 Mar 15];16(13):1366. Available from: </pmc/articles/PMC1930149/>
119. Martin-Almedina S, Ogmen K, Sackey E, Grigoriadis D, Karapoulou C, Nadarajah N, et al. Janus-faced EPHB4-associated disorders: novel pathogenic variants and unreported intrafamilial overlapping phenotypes. *Genet Med* [Internet]. 2021 Jul 1 [cited 2023 Mar 30];23(7):1315. Available from: </pmc/articles/PMC8257501/>
120. Lyons O, Walker J, Seet C, Ikram M, Kuchta A, Arnold A, et al. Mutations in EPHB4 cause human venous valve aplasia. *JCI Insight* [Internet]. 2021 Sep 9 [cited 2023 Mar 30];6(18). Available from: </pmc/articles/PMC8492339/>
121. Yu J De, Streicher JL, Medne L, Krantz ID, Yan AC. EPHB4 Mutation Implicated in Capillary Malformation–Arteriovenous Malformation Syndrome: A Case Report. *Pediatr Dermatol* [Internet]. 2017 Sep 1 [cited 2023 Mar 30];34(5):e227–30. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/pde.13208>

REFERÈNCIES

122. Amyere M, Revencu N, Helaers R, Pairet E, Baselga E, Cordisco M, et al. Germline loss-of-function mutations in EPHB4 cause a second form of capillary malformation-arteriovenous malformation (CM-AVM2) deregulating RAS-MAPK signaling. *Circulation* [Internet]. 2017 Sep 1 [cited 2023 Mar 30];136(11):1037–48. Available from: <https://www.ahajournals.org/doi/abs/10.1161/CIRCULATIONAHA.116.026886>
123. Wooderchak-Donahue WL, Akay G, Whitehead K, Briggs E, Stevenson DA, O'Fallon B, et al. Phenotype of CM-AVM2 caused by variants in EPHB4: how much overlap with hereditary hemorrhagic telangiectasia (HHT)? *Genet Med* [Internet]. 2019 Sep 1 [cited 2023 Mar 30];21(9):2007–14. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30760892/>
124. Vivanti A, Ozanne A, Grondin C, Saliou G, Quevarec L, Maurey H, et al. Loss of function mutations in EPHB4 are responsible for vein of Galen aneurysmal malformation. *Brain* [Internet]. 2018 Apr 1 [cited 2023 Mar 30];141(4):979–88. Available from: <https://academic.oup.com/brain/article/141/4/979/4850501>
125. Wu SP, Kao CY, Wang L, Creighton CJ, Yang J, Donti TR, et al. Increased COUP-TFII expression in adult hearts induces mitochondrial dysfunction resulting in heart failure. *Nat Commun* [Internet]. 2015 Sep 10 [cited 2023 Mar 30];6. Available from: [/pmc/articles/PMC4568566/](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4568566/)
126. Cui X, Lu YW, Lee V, Kim D, Dorsey T, Wang Q, et al. Venous Endothelial Marker COUP-TFII Regulates the Distinct Pathologic Potentials of Adult Arteries and Veins. *Sci Rep* [Internet]. 2015 Nov 5 [cited 2023 Mar 30];5:16193. Available from: [/pmc/articles/PMC4633649/](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4633649/)
127. Qin J, Chen X, Yu-Lee LY, Tsai MJ, Tsai SY. Nuclear Receptor COUP-TFII Controls Pancreatic Islet Tumor Angiogenesis by Regulating VEGF/VEGFR-2 Signaling. *Cancer Res* [Internet]. 2010 Nov 11 [cited 2023 Mar 15];70(21):8812. Available from: [/pmc/articles/PMC2970665/](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2970665/)
128. Li X, Kumar A, Carmeliet P. Metabolic Pathways Fueling the Endothelial Cell Drive. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-020518-114731> [Internet]. 2019 Feb 11 [cited 2023 Apr 2];81:483–503. Available from: <https://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev-physiol-020518-114731>
129. Rohlenova K, Veys K, Miranda-Santos I, De Bock K, Carmeliet P. Endothelial Cell Metabolism in Health and Disease. *Trends Cell Biol*. 2018 Mar 1;28(3):224–36.
130. Eelen G, De Zeeuw P, Simons M, Carmeliet P. Endothelial cell metabolism in normal and diseased vasculature. *Circ Res* [Internet]. 2015 Mar 3 [cited 2023 Apr 3];116(7):1231. Available from: [/pmc/articles/PMC4380230/](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4380230/)
131. De Bock K, Georgiadou M, Schoors S, Kuchnio A, Wong BW, Cantelmo AR, et al. XRole of PFKFB3-driven glycolysis in vessel sprouting. *Cell* [Internet]. 2013 Aug 1 [cited 2023 Apr 2];154(3):651–63. Available from: <http://www.cell.com/article/S0092867413007769/fulltext>
132. De Bock K, Georgiadou M, Carmeliet P. Role of Endothelial Cell Metabolism in Vessel Sprouting. *Cell Metab* [Internet]. 2013 Nov 5 [cited 2023 Apr 3];18(5):634–47. Available from: <http://www.cell.com/article/S1550413113003252/fulltext>
133. Kondoh H, Leonart ME, Nakashima Y, Yokode M, Tanaka M, Bernard D, et al. A High Glycolytic Flux Supports the Proliferative Potential of Murine Embryonic Stem Cells. <https://home.liebertpub.com/ars> [Internet]. 2007 Feb 12 [cited 2023 Apr 3];9(3):293–9. Available from: <https://www.liebertpub.com/doi/10.1089/ars.2006.1467>
134. Dranka BP, Hill BG, Darley-Usmar VM. Mitochondrial reserve capacity in endothelial cells: the impact of nitric oxide and reactive oxygen species. *Free Radic Biol Med* [Internet]. 2010 Apr 4 [cited 2023 Apr 3];48(7):905. Available from: [/pmc/articles/PMC2860730/](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2860730/)
135. Davidson SM, Duchon MR. Endothelial Mitochondria. *Circ Res* [Internet]. 2007 Apr 27 [cited 2023 Apr 3];100(8):1128–41. Available from: <https://www.ahajournals.org/doi/abs/10.1161/01.RES.0000261970.18328.1d>
136. Uldry M, Thorens B. The SLC2 family of facilitated hexose and polyol transporters. *Pflugers Arch Eur J Physiol* [Internet]. 2004 Feb 16 [cited 2023 Apr 3];447(5):480–9. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00424-003-1085-0>
137. Yu P, Wilhelm K, Dubrac A, Tung JK, Alves TC, Fang JS, et al. FGF-dependent metabolic control of vascular development. *Nat* 2017 5457653 [Internet]. 2017 May 3 [cited 2023 Apr 3];545(7653):224–8. Available from: <https://www-nature-com.sire.ub.edu/articles/nature22322>
138. Vizán P, Sánchez-Tena S, Alcarraz-Vizán G, Soler M, Messeguer R, Pujol MD, et al. Characterization of the metabolic changes underlying growth factor angiogenic activation: identification of new potential therapeutic targets. *Carcinogenesis* [Internet]. 2009 [cited 2023 Apr 3];30(6):946–52.

- Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19369582/>
139. Merchan JR, Kovács K, Railsback JW, Kurtoglu M, Jing Y, Piña Y, et al. Antiangiogenic Activity of 2-Deoxy-D-Glucose. *PLoS One* [Internet]. 2010 [cited 2023 Apr 3];5(10). Available from: </pmc/articles/PMC2965179/>
 140. Wang Q, Liang B, Shirwany NA, Zou MH. 2-Deoxy-D-Glucose Treatment of Endothelial Cells Induces Autophagy by Reactive Oxygen Species-Mediated Activation of the AMP-Activated Protein Kinase. *PLoS One* [Internet]. 2011 [cited 2023 Apr 3];6(2). Available from: </pmc/articles/PMC3046135/>
 141. Schoors S, De Bock K, Cantelmo AR, Georgiadou M, Ghesquière B, Cauwenberghs S, et al. Partial and transient reduction of glycolysis by PFKFB3 blockade reduces pathological angiogenesis. *Cell Metab* [Internet]. 2014 Jan 7 [cited 2023 Apr 3];19(1):37–48. Available from: <http://www.cell.com/article/S1550413113004579/fulltext>
 142. Wilhelm K, Happel K, Eelen G, Schoors S, Oellerich MF, Lim R, et al. FOXO1 couples metabolic activity and growth state in the vascular endothelium. *Nature* [Internet]. 2016 Jan 1 [cited 2023 Apr 3];529(7585):216. Available from: </pmc/articles/PMC5380221/>
 143. Doddaballapur A, Michalik KM, Manavski Y, Lucas T, Houtkooper RH, You X, et al. Laminar shear stress inhibits endothelial cell metabolism via KLF2-mediated repression of PFKFB3. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* [Internet]. 2015 Jan 3 [cited 2023 Apr 3];35(1):137–45. Available from: <https://www.ahajournals.org/doi/abs/10.1161/ATVBAHA.114.304277>
 144. Eelen G, de Zeeuw P, Treps L, Harjes U, Wong BW, Carmeliet P. Endothelial Cell Metabolism. *Physiol Rev* [Internet]. 2018 Jan 1 [cited 2023 Apr 3];98(1):3. Available from: </pmc/articles/PMC5866357/>
 145. Patra KC, Hay N. The pentose phosphate pathway and cancer. *Trends Biochem Sci* [Internet]. 2014 [cited 2023 Apr 3];39(8):347. Available from: </pmc/articles/PMC4329227/>
 146. Lorenzi M. The polyol pathway as a mechanism for diabetic retinopathy: Attractive, elusive, and resilient. *Exp Diabetes Res*. 2007;2007.
 147. Banerjee PS, Lagerlöf O, Hart GW. Roles of O-GlcNAc in chronic diseases of aging. *Mol Aspects Med*. 2016 Oct 1;51:1–15.
 148. Wells L, Vosseller K, Hart GW. Glycosylation of Nucleocytoplasmic Proteins: Signal Transduction and O-GlcNAc. *Science* (80-) [Internet]. 2001 Mar 23 [cited 2023 Apr 3];291(5512):2376–8. Available from: <https://www.science.org/doi/10.1126/science.1058714>
 149. Luo B, Soesanto Y, McClain DA. Protein Modification by O-linked GlcNAc Reduces Angiogenesis by Inhibiting Akt Activity in Endothelial Cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* [Internet]. 2008 Apr [cited 2023 Apr 3];28(4):651. Available from: </pmc/articles/PMC2734484/>
 150. Schoors S, Bruning U, Missiaen R, Queiroz KCS, Borgers G, Elia I, et al. Fatty acid carbon is essential for dNTP synthesis in endothelial cells. *Nature* [Internet]. 2015 Apr 4 [cited 2023 Apr 3];520(7546):192. Available from: </pmc/articles/PMC4413024/>
 151. Kim B, Li J, Jang C, Arany Z. Glutamine fuels proliferation but not migration of endothelial cells. *EMBO J* [Internet]. 2017 Aug 8 [cited 2023 Apr 3];36(16):2321. Available from: </pmc/articles/PMC5556269/>
 152. Huang H, Vandekeere S, Kalucka J, Bierhansl L, Zecchin A, Brüning U, et al. Role of glutamine and interlinked asparagine metabolism in vessel formation. *EMBO J*. 2017 Aug 15;36(16):2334–52.
 153. Kucharzewska P, Welch JE, Svensson KJ, Belting M. Ornithine decarboxylase and extracellular polyamines regulate microvascular sprouting and actin cytoskeleton dynamics in endothelial cells. *Exp Cell Res*. 2010 Oct 1;316(16):2683–91.
 154. Norman J, Whitwam JG, Franks NP, Lieb WR, Dluzewski AR, Halsey MJ, et al. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nat* 1988 3336174 [Internet]. 1988 [cited 2023 Apr 3];333(6174):664–6. Available from: <https://www.nature.com/articles/333664a0>
 155. Durante W, Johnson FK, Johnson RA. ARGINASE: A CRITICAL REGULATOR OF NITRIC OXIDE SYNTHESIS AND VASCULAR FUNCTION.
 156. Mitchell JA, Hecker M, Ånggård EE, Vane JR. Cultured endothelial cells maintain their L-arginine level despite the continuous release of EDRF. *Eur J Pharmacol*. 1990 Jul 17;182(3):573–6.
 157. Erez A, Nagamani SCS, Shchelochkov OA, Premkumar MH, Campeau PM, Chen Y, et al. REQUIREMENT OF ARGININOSUCCINATE LYASE FOR SYSTEMIC NITRIC OXIDE PRODUCTION. *Nat Med* [Internet]. 2011 Dec [cited 2023 Apr 3];17(12):1619. Available from: </pmc/articles/PMC3348956/>

REFERÈNCIES

158. Cade WT. Diabetes-related microvascular and macrovascular diseases in the physical therapy setting. *Phys Ther*. 2008;88(11):1322–35.
159. Guzik TJ, Mussa S, Gastaldi D, Sadowski J, Ratnatunga C, Pillai R, et al. Mechanisms of Increased Vascular Superoxide Production in Human Diabetes Mellitus. *Circulation* [Internet]. 2002 Apr 9 [cited 2023 Apr 4];105(14):1656–62. Available from: <https://www.ahajournals.org/doi/abs/10.1161/01.cir.0000012748.58444.08>
160. Cantelmo AR, Conradi LC, Brajic A, Goveia J, Kalucka J, Pircher A, et al. Inhibition of the Glycolytic Activator PFKFB3 in Endothelium Induces Tumor Vessel Normalization, Impairs Metastasis, and Improves Chemotherapy. *Cancer Cell*. 2016 Dec 12;30(6):968–85.
161. Diebold LP, Gil HJ, Gao P, Martinez CA, Weinberg SE, Chandel NS. Mitochondrial complex III is necessary for endothelial cell proliferation during angiogenesis. *Nat Metab* 2019 11 [Internet]. 2019 Jan 7 [cited 2023 Apr 4];1(1):158–71. Available from: <https://www.nature.com/articles/s42255-018-0011-x>
162. Vandekeere S, Dubois C, Kalucka J, Sullivan MR, García-Caballero M, Goveia J, et al. Serine Synthesis via PHGDH Is Essential for Heme Production in Endothelial Cells. *Cell Metab* [Internet]. 2018 Oct 2 [cited 2023 Apr 4];28(4):573–587.e13. Available from: <http://www.cell.com/article/S1550413118303917/fulltext>
163. Ribatti D, Vacca A, Roncali L, Dammacco F. The Chick Embryo Chorioallantoic Membrane as a Model for in vivo Research on Anti-Angiogenesis. *Curr Pharm Biotechnol* [Internet]. 2000 Jul 1 [cited 2023 Apr 5];1(1):73–82. Available from: <http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=1389-2010&volume=1&issue=1&page=73>
164. Laib AM, Bartol A, Alajati A, Korff T, Weber H, Augustin HG. Spheroid-based human endothelial cell microvessel formation in vivo. *Nat Protoc* 2009 48 [Internet]. 2009 Jul 30 [cited 2023 Apr 5];4(8):1202–15. Available from: <https://www.nature.com/articles/nprot.2009.96>
165. Eming SA, Brachvogel B, Odorisio T, Koch M. Regulation of angiogenesis: Wound healing as a model. *Prog Histochem Cytochem*. 2007 Dec 10;42(3):115–70.
166. Pitulescu ME, Schmidt I, Benedito R, Adams RH. Inducible gene targeting in the neonatal vasculature and analysis of retinal angiogenesis in mice. *Nat Protoc* 2010 59 [Internet]. 2010 Aug 12 [cited 2023 Apr 4];5(9):1518–34. Available from: <https://www.nature.com/articles/nprot.2010.113>
167. Stahl A, Connor KM, Sapieha P, Chen J, Dennison RJ, Krah NM, et al. The Mouse Retina as an Angiogenesis Model. *Invest Ophthalmol Vis Sci* [Internet]. 2010 Jun [cited 2023 Apr 4];51(6):2813. Available from: [/pmc/articles/PMC2891451/](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2891451/)
168. Uemura A, Kusuvara S, Katsuta H, Nishikawa SI. Angiogenesis in the mouse retina: A model system for experimental manipulation. *Exp Cell Res*. 2006 Mar 10;312(5):676–83.
169. Gariano RF, Gardner TW. Retinal angiogenesis in development and disease. *Nat* 2005 4387070 [Internet]. 2005 Dec 14 [cited 2023 Apr 8];438(7070):960–6. Available from: <https://www.nature.com/articles/nature04482>
170. Payne S, Val S De, Neal A. Endothelial-Specific Cre Mouse Models: Is Your Cre CREdible? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* [Internet]. 2018 [cited 2023 Apr 5];38(11):2550. Available from: [/pmc/articles/PMC6218004/](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6218004/)
171. Kisanuki YY, Hammer RE, Miyazaki J ichi, Williams SC, Richardson JA, Yanagisawa M. Tie2-Cre Transgenic Mice: A New Model for Endothelial Cell-Lineage Analysis in Vivo. *Dev Biol*. 2001 Feb 15;230(2):230–42.
172. Kano A, Wolfgang MJ, Gao Q, Jacoby J, Chai GX, Hansen W, et al. Endothelial Cells Require STAT3 for Protection against Endotoxin-induced Inflammation. *J Exp Med* [Internet]. 2003 Nov 11 [cited 2023 Apr 9];198(10):1517. Available from: [/pmc/articles/PMC2194113/](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2194113/)
173. Koni PA, Joshi SK, Temann UA, Olson D, Burkly L, Flavell RA. Conditional vascular cell adhesion molecule 1 deletion in mice: Impaired lymphocyte migration to bone marrow. *J Exp Med* [Internet]. 2001 Mar 19 [cited 2023 Apr 9];193(6):741–53. Available from: <https://augusta.pure.elsevier.com/en/publications/conditional-vascular-cell-adhesion-molecule-1-deletion-in-mice-im>
174. Braren R, Hu H, Kim YH, Beggs HE, Reichardt LF, Wang R. Endothelial FAK is essential for vascular network stability, cell survival, and lamellipodial formation. *J Cell Biol* [Internet]. 2006 Jan 1 [cited 2023 Apr 9];172(1):151. Available from: [/pmc/articles/PMC2063542/](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2063542/)
175. Korhonen H, Fisslthaler B, Moers A, Wirth A, Habermehl D, Wieland T, et al. Anaphylactic shock

- depends on endothelial Gq/G11. *J Exp Med* [Internet]. 2009 Feb 2 [cited 2023 Apr 9];206(2):411. Available from: /pmc/articles/PMC2646572/
176. Forde A, Constien R, Gröne HJ, Hämmerling G, Arnold B. Temporal Cre-mediated recombination exclusively in endothelial cells using Tie2 regulatory elements. *genesis* [Internet]. 2002 Aug 1 [cited 2023 Apr 9];33(4):191–7. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/gene.10117>
177. Licht AH, Raab S, Hofmann U, Breier G. Endothelium-specific Cre recombinase activity in flk-1-Cre transgenic mice. *Dev Dyn* [Internet]. 2004 Feb 1 [cited 2023 Apr 9];229(2):312–8. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/dvdy.10416>
178. Lugus JJ, Park C, Ma YD, Choi K. Both primitive and definitive blood cells are derived from Flk-1+ mesoderm. *Blood* [Internet]. 2009 Jan 1 [cited 2023 Apr 9];113(3):563. Available from: /pmc/articles/PMC2628363/
179. Alva JA, Zovein AC, Monvoisin A, Murphy T, Salazar A, Harvey NL, et al. VE-Cadherin-Cre-recombinase transgenic mouse: A tool for lineage analysis and gene deletion in endothelial cells. *Dev Dyn* [Internet]. 2006 Mar 1 [cited 2023 Apr 9];235(3):759–67. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/dvdy.20643>
180. Kogata N, Arai Y, Pearson JT, Hashimoto K, Hidaka K, Koyama T, et al. Cardiac ischemia activates vascular endothelial cadherin promoter in both preexisting vascular cells and bone marrow cells involved in neovascularization. *Circ Res* [Internet]. 2006 Apr 14 [cited 2023 Apr 9];98(7):897–904. Available from: <https://www.ahajournals.org/doi/abs/10.1161/01.RES.0000218193.51136.ad>
181. Chen MJ, Yokomizo T, Zeigler BM, Dzierzak E, Speck NA. Runx1 is required for the endothelial to hematopoietic cell transition but not thereafter. *Nature* [Internet]. 2009 Feb 2 [cited 2023 Apr 9];457(7231):887. Available from: /pmc/articles/PMC2744041/
182. Okabe K, Kobayashi S, Yamada T, Kurihara T, Tai-Nagara I, Miyamoto T, et al. Neurons limit angiogenesis by titrating VEGF in retina. *Cell* [Internet]. 2014 Oct 23 [cited 2023 Apr 9];159(3):584–96. Available from: <http://www.cell.com/article/S009286741401174X/fulltext>
183. Wang Y, Nakayama M, Pitulescu ME, Schmidt TS, Bochenek ML, Sakakibara A, et al. Ephrin-B2 controls VEGF-induced angiogenesis and lymphangiogenesis. *Nat* 2010 4657297 [Internet]. 2010 May 27 [cited 2023 Apr 9];465(7297):483–6. Available from: <https://www.nature.com/articles/nature09002>
184. Claxton S, Kostourou V, Jadeja S, Chambon P, Hodivala-Dilke K, Fruttiger M. Efficient, inducible Cre-recombinase activation in vascular endothelium. *genesis* [Internet]. 2008 Feb 1 [cited 2023 Apr 9];46(2):74–80. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/dvg.20367>
185. Liao WP, Uetzmann L, Burtscher I, Lickert H. Generation of a mouse line expressing Sox17-driven Cre recombinase with specific activity in arteries. *genesis* [Internet]. 2009 Jul 1 [cited 2023 Apr 9];47(7):476–83. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/dvg.20520>
186. Ehling M, Adams S, Benedito R, Adams RH. Notch controls retinal blood vessel maturation and quiescence. *Development* [Internet]. 2013 Jul 15 [cited 2023 Apr 9];140(14):3051–61. Available from: <https://journals.biologists.com/dev/article/140/14/3051/45787/Notch-controls-retinal-blood-vessel-maturation-and>
187. Rocha SF, Schiller M, Jing D, Li H, Butz S, Vestweber D, et al. Esm1 modulates endothelial tip cell behavior and vascular permeability by enhancing VEGF bioavailability. *Circ Res* [Internet]. 2014 Aug 29 [cited 2023 Apr 9];115(6):581–90. Available from: <https://www.ahajournals.org/doi/abs/10.1161/CIRCRESAHA.115.304718>
188. Tian X, Hu T, Zhang H, He L, Huang X, Liu Q, et al. Subepicardial endothelial cells invade the embryonic ventricle wall to form coronary arteries. *Cell Res* [Internet]. 2013 Sep [cited 2023 Apr 9];23(9):1075. Available from: /pmc/articles/PMC3760626/
189. Chen HI, Sharma B, Akerberg BN, Numi HJ, Kivelä R, Saharinen P, et al. The sinus venosus contributes to coronary vasculature through VEGFC-stimulated angiogenesis. *Dev* [Internet]. 2014 Dec 1 [cited 2023 Apr 9];141(23):4500–12. Available from: /pmc/articles/PMC4302936/
190. Vanhaesebroeck B, Guillermet-Guibert J, Graupera M, Bilanges B. The emerging mechanisms of isoform-specific PI3K signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2010 115 [Internet]. 2010 Apr 9 [cited 2023 Apr 10];11(5):329–41. Available from: <https://www.nature.com/articles/nrm2882>
191. Bilanges B, Posor Y, Vanhaesebroeck B. PI3K isoforms in cell signalling and vesicle trafficking. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2019 209 [Internet]. 2019 May 20 [cited 2023 Apr 11];20(9):515–34. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41580-019-0129-z>
192. Vadas O, Burke JE, Zhang X, Berndt A, Williams RL. Structural biology structural basis for activation

REFERÈNCIES

- and inhibition of class I phosphoinositide 3-kinases. *Sci Signal* [Internet]. 2011 Oct 18 [cited 2023 Apr 10];4(195). Available from: <https://www.science.org/doi/10.1126/scisignal.2002165>
193. Jean S, Kiger AA. Classes of phosphoinositide 3-kinases at a glance. *J Cell Sci* [Internet]. 2014 Mar 3 [cited 2023 Apr 10];127(5):923–8. Available from: [/pmc/articles/PMC3937771/](https://pmc/articles/PMC3937771/)
194. Rathinaswamy MK, Burke JE. Class I phosphoinositide 3-kinase (PI3K) regulatory subunits and their roles in signaling and disease. *Adv Biol Regul*. 2020 Jan 1;75:100657.
195. Fruman DA, Chiu H, Hopkins BD, Bagrodia S, Cantley LC, Abraham RT. The PI3K pathway in human disease. *Cell* [Internet]. 2017 Aug 8 [cited 2023 Apr 11];170(4):605. Available from: [/pmc/articles/PMC5726441/](https://pmc/articles/PMC5726441/)
196. Manning BD, Toker A. AKT/PKB Signaling: Navigating the Network. *Cell* [Internet]. 2017 Apr 4 [cited 2023 Apr 11];169(3):381. Available from: [/pmc/articles/PMC5546324/](https://pmc/articles/PMC5546324/)
197. Datta SR, Dudek H, Xu T, Masters S, Haian F, Gotoh Y, et al. Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell- intrinsic death machinery. *Cell* [Internet]. 1997 Oct 17 [cited 2023 Apr 11];91(2):231–41. Available from: <http://www.cell.com/article/S0092867400804055/fulltext>
198. Dijkers PF, Birkenkamp KU, Lam EWF, Shaun B Thomas N, Lammers JWJ, Koenderman L, et al. FKHR-L1 can act as a critical effector of cell death induced by cytokine withdrawal: protein kinase B-enhanced cell survival through maintenance of mitochondrial integrity. *J Cell Biol* [Internet]. 2002 Feb 2 [cited 2023 Apr 11];156(3):531. Available from: [/pmc/articles/PMC2173339/](https://pmc/articles/PMC2173339/)
199. Chibaya L, Karim B, Zhang H, Jones SN. Mdm2 phosphorylation by Akt regulates the p53 response to oxidative stress to promote cell proliferation and tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2021 Jan 26 [cited 2023 Apr 11];118(4):2003193118. Available from: [/pmc/articles/PMC7848548/](https://pmc/articles/PMC7848548/)
200. Ogawara Y, Kishishita S, Obata T, Isazawa Y, Suzuki T, Tanaka K, et al. Akt enhances Mdm2-mediated ubiquitination and degradation of p53. *J Biol Chem* [Internet]. 2002 Jun 14 [cited 2023 Apr 11];277(24):21843–50. Available from: <http://www.jbc.org/article/S0021925820704448/fulltext>
201. Shin I, Yakes FM, Rojo F, Shin N young, Bakin A V., Baselga J, et al. PKB/Akt mediates cell-cycle progression by phosphorylation of p27Kip1 at threonine 157 and modulation of its cellular localization. *Nat Med* 2002 810 [Internet]. 2002 Sep 16 [cited 2023 Apr 11];8(10):1145–52. Available from: <https://www.nature.com/articles/nm759>
202. Zhou BP, Liao Y, Xia W, Spohn B, Lee MH, Hung MC. Cytoplasmic localization of p21Cip1/WAF1 by Akt-induced phosphorylation in HER-2/neu-overexpressing cells. *Nat Cell Biol* 2001 33 [Internet]. 2001 Feb 5 [cited 2023 Apr 11];3(3):245–52. Available from: https://www.nature.com/articles/ncb0301_245
203. Welcker M, Singer J, Loeb KR, Grim J, Bloecher A, Gurien-West M, et al. Multisite phosphorylation by Cdk2 and GSK3 controls cyclin E degradation. *Mol Cell* [Internet]. 2003 Aug 1 [cited 2023 Apr 11];12(2):381–92. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14536078/>
204. Cai SL, Tee AR, Short JD, Bergeron JM, Kim J, Shen J, et al. Activity of TSC2 is inhibited by AKT-mediated phosphorylation and membrane partitioning. *J Cell Biol* [Internet]. 2006 Apr 4 [cited 2023 Apr 11];173(2):279. Available from: [/pmc/articles/PMC2063818/](https://pmc/articles/PMC2063818/)
205. Haar E Vander, Lee S il, Bandhakavi S, Griffin TJ, Kim DH. Insulin signalling to mTOR mediated by the Akt/PKB substrate PRAS40. *Nat Cell Biol* 2007 93 [Internet]. 2007 Feb 4 [cited 2023 Apr 11];9(3):316–23. Available from: <https://www.nature.com/articles/ncb1547>
206. Neary CL, Pastorino JG. Akt inhibition promotes hexokinase 2 redistribution and glucose uptake in cancer cells. *J Cell Physiol* [Internet]. 2013 Sep 1 [cited 2023 Apr 11];228(9):1943–8. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/jcp.24361>
207. Yi J, Zhu J, Wu J, Thompson CB, Jiang X. Oncogenic activation of PI3K-AKT-mTOR signaling suppresses ferroptosis via SREBP-mediated lipogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2020 Dec 8 [cited 2023 Apr 11];117(49):31189–97. Available from: [/pmc/articles/PMC7733797/](https://pmc/articles/PMC7733797/)
208. Georgescu MM. PTEN Tumor Suppressor Network in PI3K-Akt Pathway Control. *Genes Cancer* [Internet]. 2010 [cited 2023 Apr 12];1(12):1170. Available from: [/pmc/articles/PMC3092286/](https://pmc/articles/PMC3092286/)
209. Masson GR, Williams RL. Structural Mechanisms of PTEN Regulation. *Cold Spring Harb Perspect Med* [Internet]. 2020 Mar 1 [cited 2023 Apr 12];10(3). Available from: [/pmc/articles/PMC7050585/](https://pmc/articles/PMC7050585/)
210. Mayo LD, Dixon JE, Durden DL, Tonks NK, Donner DB. PTEN protects p53 from Mdm2 and sensitizes cancer cells to chemotherapy. *J Biol Chem* [Internet]. 2002 Feb 15 [cited 2023 Apr 12];277(7):5484–9. Available from: <http://www.jbc.org/article/S0021925819825875/fulltext>

211. Burke JE, Williams RL. Synergy in activating class I PI3Ks. *Trends Biochem Sci*. 2015 Feb 1;40(2):88–100.
212. Miled N, Yan Y, Hon WC, Perisic O, Zvelebil M, Inbar Y, et al. Mechanism of two classes of cancer mutations in the phosphoinositide 3-kinase catalytic subunit. *Science* (80-) [Internet]. 2007 Jul 13 [cited 2023 Apr 12];317(5835):239–42. Available from: <https://www.science.org/doi/10.1126/science.1135394>
213. Burke JE, Perisic O, Masson GR, Vadas O, Williams RL. Oncogenic mutations mimic and enhance dynamic events in the natural activation of phosphoinositide 3-kinase p110 α (PIK3CA). *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2012 Sep 18 [cited 2023 Apr 12];109(38):15259–64. Available from: </pmc/articles/PMC3458343/>
214. Carracedo A, Pandolfi PP. The PTEN–PI3K pathway: of feedbacks and cross-talks. *Oncogene* 2008 2741 [Internet]. 2008 Sep 15 [cited 2023 Apr 12];27(41):5527–41. Available from: <https://www.nature.com/articles/onc2008247>
215. Yehia L, Eng C. PTEN Hamartoma Tumor Syndrome. *Intest Polypsis Syndr Diagnosis Manag* [Internet]. 2021 Feb 11 [cited 2023 Apr 12];87–100. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1488/>
216. Mundi PS, Sachdev J, McCourt C, Kalinsky K. AKT in cancer: new molecular insights and advances in drug development. *Br J Clin Pharmacol* [Internet]. 2016 [cited 2023 Apr 12];82(4):943. Available from: </pmc/articles/PMC5137819/>
217. Soler A, Figueiredo AM, Castel P, Martin L, Monelli E, Angulo-Urarte A, et al. Therapeutic benefit of selective inhibition of p110 α PI3-kinase in pancreatic neuroendocrine tumors. *Clin Cancer Res* [Internet]. 2016 Dec 12 [cited 2023 Apr 12];22(23):5805. Available from: </pmc/articles/PMC5338478/>
218. Kobialka P, Graupera M. Revisiting PI3-kinase signalling in angiogenesis. *Vasc Biol* [Internet]. 2019 Jan 27 [cited 2023 Apr 9];1(1):H125. Available from: </pmc/articles/PMC7439845/>
219. Graupera M, Guillermet-Guibert J, Foukas LC, Phng L-K, Cain RJ, Salpekar A, et al. Angiogenesis selectively requires the p110a isoform of PI3K to control endothelial cell migration.
220. Lelievre E, Bourbon P-M, Duan L-J, Nussbaum RL, Fong G-H. Brief report Deficiency in the p110 subunit of PI3K results in diminished Tie2 expression and Tie2 -like vascular defects in mice. 2005 [cited 2023 Apr 13]; Available from: <http://ashpublications.org/blood/article-pdf/105/10/3935/1709020/zh801005003935.pdf>
221. Hare LM, Schwarz Q, Wiszniak S, Gurung R, Montgomery KG, Mitchell CA, et al. Heterozygous expression of the oncogenic Pik3caH1047R mutation during murine development results in fatal embryonic and extraembryonic defects. *Dev Biol*. 2015 Aug 1;404(1):14–26.
222. Angulo-Urarte A, Casado P, Castillo SD, Kobialka P, Kotini MP, Figueiredo AM, et al. Endothelial cell rearrangements during vascular patterning require PI3-kinase-mediated inhibition of actomyosin contractility. *Nat Commun* 2018 91 [Internet]. 2018 Nov 16 [cited 2023 Apr 13];9(1):1–16. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41467-018-07172-3>
223. Ghigo A. Cell-specific roles of p110 β in myocardial ischaemia. *Cardiovasc Res* [Internet]. 2019 Jul 1 [cited 2023 Apr 13];115(8):1264–5. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30796423/>
224. Figueiredo AM, Villacampa P, Diéguez-Hurtado R, José Lozano J, Kobialka P, Cortazar AR, et al. Phosphoinositide 3-Kinase-Regulated Pericyte Maturation Governs Vascular Remodeling. *Circulation* [Internet]. 2020 Aug 18 [cited 2023 Apr 13];142(7):688–704. Available from: <https://www.ahajournals.org/doi/abs/10.1161/CIRCULATIONAHA.119.042354>
225. Yuan TL, Choi HS, Matsui A, Benes C, Lifshits E, Luo J, et al. Class 1A PI3K regulates vessel integrity during development and tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2008 Jul 15 [cited 2023 Apr 13];105(28):9739–44. Available from: <https://www.pnas.org/doi/abs/10.1073/pnas.0804123105>
226. Suzuki A, Hamada K, Sasaki T, Mak TW, Nakano T. Role of PTEN/PI3K pathway in endothelial cells. *Biochem Soc Trans* [Internet]. 2007 Apr 1 [cited 2023 Apr 13];35(2):172–6. Available from: </biochemsoctrans/article/35/2/172/65188/Role-of-PTEN-PI3K-pathway-in-endothelial-cells>
227. Graupera M, Potente M. Regulation of angiogenesis by PI3K signaling networks. *Exp Cell Res* [Internet]. 2013;319(9):1348–55. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.yexcr.2013.02.021>
228. Gaengel K, Niaudet C, Hagikura K, Siemsen BL, Muhl L, Hofmann JJ, et al. The Sphingosine-1-Phosphate Receptor S1PR1 Restricts Sprouting Angiogenesis by Regulating the Interplay between VE-Cadherin and VEGFR2. *Dev Cell* [Internet]. 2012 Sep 11 [cited 2023 Apr 13];23(3):587–99. Available from: <http://www.cell.com/article/S1534580712003735/fulltext>

REFERÈNCIES

229. Gupta S, Ramjaun AR, Haiko P, Wang Y, Warne PH, Nicke B, et al. Binding of Ras to Phosphoinositide 3-Kinase p110 α Is Required for Ras- Driven Tumorigenesis in Mice. *Cell* [Internet]. 2007 Jun 1 [cited 2023 Apr 13];129(5):957–68. Available from: <http://www.cell.com/article/S009286740700520X/fulltext>
230. Papapetropoulos A, Fulton D, Mahboubi K, Kalb RG, O'Connor DS, Li F, et al. Angiopoietin-1 inhibits endothelial cell apoptosis via the Akt/survivin pathway. *J Biol Chem* [Internet]. 2000 Mar 31 [cited 2023 Apr 13];275(13):9102–5. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10734041/>
231. Daly C, Pasnikowski E, Burova E, Wong V, Aldrich TH, Griffiths J, et al. Angiopoietin-2 functions as an autocrine protective factor in stressed endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2006 Oct 10 [cited 2023 Apr 13];103(42):15491. Available from: [/pmc/articles/PMC1592534/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1592534/)
232. Phung TL, Ziv K, Dabydeen D, Eyiah-Mensah G, Riveros M, Perruzzi C, et al. Pathological angiogenesis is induced by sustained Akt signaling and inhibited by rapamycin. *Cancer Cell* [Internet]. 2006 [cited 2023 Apr 13];10(2):159. Available from: [/pmc/articles/PMC2531257/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1592534/)
233. Lee MY, Luciano AK, Ackah E, Rodriguez-Vitad J, Bancroft TA, Eichmann A, et al. Endothelial Akt1 mediates angiogenesis by phosphorylating multiple angiogenic substrates. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2014 Sep 2 [cited 2023 Apr 13];111(35):12865–70. Available from: [/pmc/articles/PMC4156707/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2531257/)
234. Luo Z, Fujio Y, Kureishi Y, Rudic RD, Daumerie G, Fulton D, et al. Acute modulation of endothelial Akt/PKB activity alters nitric oxide–dependent vasomotor activity in vivo. *J Clin Invest* [Internet]. 2000 Aug 8 [cited 2023 Apr 13];106(4):493. Available from: [/pmc/articles/PMC380252/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10734041/)
235. Yamamoto N, Oyaizu T, Enomoto M, Horie M, Yuasa M, Okawa A, et al. VEGF and bFGF induction by nitric oxide is associated with hyperbaric oxygen-induced angiogenesis and muscle regeneration. *Sci Reports* 2020 101 [Internet]. 2020 Feb 17 [cited 2023 Apr 13];10(1):1–13. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41598-020-59615-x>
236. Dormond O, Madsen JC, Briscoe DM. The Effects of mTOR-Akt Interactions on Anti-apoptotic Signaling in Vascular Endothelial Cells. *J Biol Chem* [Internet]. 2007 Aug 8 [cited 2023 Apr 13];282(32):23679. Available from: [/pmc/articles/PMC3383050/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1592534/)
237. Farhan MA, Carmine-Simmen K, Lewis JD, Moore RB, Murray AG. Endothelial Cell mTOR Complex-2 Regulates Sprouting Angiogenesis. *PLoS One* [Internet]. 2015 Aug 21 [cited 2023 Apr 13];10(8). Available from: [/pmc/articles/PMC4546419/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2531257/)
238. Potente M, Urbich C, Sasaki KI, Hofmann WK, Heeschen C, Aicher A, et al. Involvement of Foxo transcription factors in angiogenesis and postnatal neovascularization. *J Clin Invest* [Internet]. 2005 Sep 9 [cited 2023 Apr 13];115(9):2382. Available from: [/pmc/articles/PMC1184037/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1592534/)
239. Wilhelm K, Happel K, Eelen G, Schoors S, Oellerich MF, Lim R, et al. FOXO1 couples metabolic activity and growth state in the vascular endothelium. *Nature* [Internet]. 2016 Jan 1 [cited 2023 Apr 13];529(7585):216. Available from: [/pmc/articles/PMC5380221/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2531257/)
240. Folkman J. Angiogenesis: an organizing principle for drug discovery? *Nat Rev Drug Discov* 2007 64 [Internet]. 2007 Apr [cited 2023 Mar 6];6(4):273–86. Available from: <https://www.nature.com/articles/nrd2115>
241. Kunitomo K, Yamamoto Y, Jinnin M. ISSVA Classification of Vascular Anomalies and Molecular Biology. *Int J Mol Sci*. 2022;23(4).
242. Steiner JE, Drolet BA. Classification of Vascular Anomalies: An Update. *Semin Intervent Radiol*. 2017;34(3):225–32.
243. Mansfield SA, Williams RF, Jacobas I. Vascular tumors. *Semin Pediatr Surg*. 2020;29(5).
244. Borst AJ, Nakano TA, Blei F, Adams DM, Duis J. A Primer on a Comprehensive Genetic Approach to Vascular Anomalies. *Front Pediatr* [Internet]. 2020 Oct 19 [cited 2023 Apr 17];8:579591. Available from: [/pmc/articles/PMC7604490/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37604490/)
245. van Doesburg MHM, Harbech H, Lokhorst MM, Breugem CC. Surgical management of vascular malformations of the upper extremity: A review of current literature. *JPRAS Open*. 2022 Sep 1;33:63–75.
246. Couto JA, Huang AY, Konczyk DJ, Goss JA, Fishman SJ, Mulliken JB, et al. Somatic MAP2K1 Mutations Are Associated with Extracranial Arteriovenous Malformation. *Am J Hum Genet* [Internet]. 2017 Mar 3 [cited 2023 Apr 17];100(3):546. Available from: [/pmc/articles/PMC5339083/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28339083/)
247. Starke RM, McCarthy D, Komotar RJ, Connolly ES. Somatic KRAS Mutation Found in Sporadic Arteriovenous Malformations. *Clin Neurosurg* [Internet]. 2018 Jul 1 [cited 2023 Apr 17];83(1):E14–5.

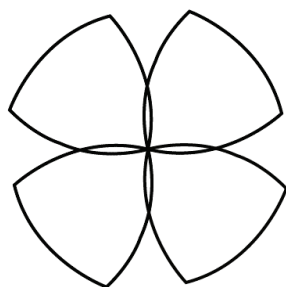
- Available from:
https://journals.lww.com/neurosurgery/Fulltext/2018/07000/Somatic_KRAS_Mutation_Found_in_Sporadic.28.aspx
248. Tørring PM, Kjeldsen AD, Ousager LB, Brusgaard K. ENG mutational mosaicism in a family with hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Mol Genet Genomic Med*. 2018 Jan 1;6(1):121–5.
249. Johnson DW, Berg JN, Baldwin MA, Gallione CJ, Marondel I, Yoon SJ, et al. Mutations in the activin receptor–like kinase 1 gene in hereditary haemorrhagic telangiectasia type 2. *Nat Genet* 1996 132 [Internet]. 1996 [cited 2023 Apr 18];13(2):189–95. Available from: <https://www.nature.com/articles/ng0696-189>
250. Gallione CJ, Richards JA, Letteboer TGW, Rushlow D, Prigoda NL, Leedom TP, et al. SMAD4 mutations found in unselected HHT patients. *J Med Genet* [Internet]. 2006 Oct [cited 2023 Apr 18];43(10):793. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1683178/>
251. Sundaram SK, Michelhaugh SK, Klinger N V, Kupsky WJ, Sood S, Chugani HT, et al. GNAQ Mutation in the Venous Vascular Malformation and Underlying Brain Tissue in Sturge-Weber Syndrome HHS Public Access. *Neuropediatrics*. 2017;48(5):385–9.
252. Wellman RJ, Cho S Bin, Singh P, Tune M, Pardo CA, Comi AM. Gαq and hyper-phosphorylated ERK expression in Sturge–Weber syndrome leptomeningeal blood vessel endothelial cells. *Vasc Med* [Internet]. 2019 Feb 1 [cited 2023 Apr 18];24(1):72. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30830577/>
253. Limaye N, Wouters V, Uebelhoer M, Tuominen M, Wirkkala R, Mulliken JB, et al. Somatic Mutations in the Angiopoietin-Receptor TIE2 Can Cause Both Solitary and Multiple Sporadic Venous Malformations. *Nat Genet* [Internet]. 2009 Jan [cited 2023 Apr 18];41(1):118. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18670982/>
254. Limaye N, Kangas J, Mendola A, Godfraind C, Schlögel MJ, Helaers R, et al. Somatic Activating PIK3CA Mutations Cause Venous Malformation. *Am J Hum Genet* [Internet]. 2015 Dec 12 [cited 2023 Apr 17];97(6):914. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26478782/>
255. Castel P, Carmona FJ, Grego-Bessa J, Berger MF, Viale A, Anderson K V., et al. Somatic PIK3CA mutations as a driver of sporadic venous malformations. *Sci Transl Med*. 2016;8(332).
256. Castillo SD, Tzouanacou E, Zaw-Thin M, Berenjeno IM, Parker VER, Chivite I, et al. Somatic activating mutations in Pik3ca cause sporadic venous malformations in mice and humans. *Sci Transl Med* [Internet]. 2016 Mar 30 [cited 2023 Feb 14];8(332). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27030595/>
257. Castillo SD, Baselga E, Graupera M. PIK3CA mutations in vascular malformations. *Curr Opin Hematol* [Internet]. 2019 May 1 [cited 2023 Apr 18];26(3):170–8. Available from: https://journals.lww.com/co-hematology/Fulltext/2019/05000/PIK3CA_mutations_in_vascular_malformations.9.aspx
258. Sahoo T, Johnson EW, Thomas JW, Kuehl PM, Jones TL, Dokken CG, et al. Mutations in the gene encoding KRIT1, a Krev-1/rap1a binding protein, cause cerebral cavernous malformations (CCM1). *Hum Mol Genet* [Internet]. 1999 [cited 2023 Apr 18];8(12):2325–33. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10545614/>
259. Liquori CL, Berg MJ, Siegel AM, Huang E, Zawistowski JS, Stoffer T, et al. Mutations in a Gene Encoding a Novel Protein Containing a Phosphotyrosine-Binding Domain Cause Type 2 Cerebral Cavernous Malformations. *Am J Hum Genet* [Internet]. 2003 [cited 2023 Apr 18];73(6):1459. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1180409/>
260. Bergametti F, Denier C, Labauge P, Arnoult M, Boetto S, Clanet M, et al. Mutations within the Programmed Cell Death 10 Gene Cause Cerebral Cavernous Malformations. *Am J Hum Genet* [Internet]. 2005 [cited 2023 Apr 18];76(1):42. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1196432/>
261. Ren AA, Snellings DA, Su YS, Hong CC, Castro M, Tang AT, et al. PIK3CA and CCM mutations fuel cavernomas through a cancer-like mechanism. *Nature* [Internet]. 2021 Jun 10 [cited 2023 Apr 18];594(7862):271–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33910229/>
262. Blesinger H, Kaulfuß S, Aung T, Schwoch S, Prantl L, Rößler J, et al. PIK3CA mutations are specifically localized to lymphatic endothelial cells of lymphatic malformations. *PLoS One* [Internet]. 2018 Jul 1 [cited 2023 Apr 18];13(7). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30037383/>
263. Rodriguez-Laguna L, Agra N, Ibañez K, Oliva-Molina G, Gordo G, Khurana N, et al. Somatic activating mutations in PIK3CA cause generalized lymphatic anomaly. *J Exp Med* [Internet]. 2019 Feb 2 [cited 2023 Apr 18];216(2):407. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30636343/>
264. Mäkinen T, Boon LM, Vikkula M, Alitalo K. Lymphatic Malformations: Genetics, Mechanisms and Therapeutic Strategies. *Circ Res* [Internet]. 2021 Jun 25 [cited 2023 Apr 18];129(1):136–54.

- Available from: <https://www.ahajournals.org/doi/abs/10.1161/CIRCRESAHA.121.318142>
265. Cras TD Le, Boscolo E. Cellular and molecular mechanisms of PIK3CA-related vascular anomalies. *Vasc Biol* [Internet]. 2019 Jun 21 [cited 2023 Apr 18];1(1):H33–40. Available from: <https://vb.bioscientifica.com/view/journals/vb/1/1/VB-19-0016.xml>
266. Di Blasio L, Puliafito A, Gagliardi PA, Comunanza V, Somale D, Chiaverina G, et al. PI3K/mTOR inhibition promotes the regression of experimental vascular malformations driven by PIK3CA-activating mutations. *Cell Death Dis* 2018 92 [Internet]. 2018 Jan 19 [cited 2023 Apr 18];9(2):1–15. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41419-017-0064-x>
267. Adams DM, Trenor CC, Hammill AM, Vinks AA, Patel MN, Chaudry G, et al. Efficacy and safety of sirolimus in the treatment of complicated vascular anomalies. *Pediatrics* [Internet]. 2016 Feb 1 [cited 2023 Apr 18];137(2). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26473236/>
268. Hammer J, Seront E, Duez S, Dupont S, Van Damme A, Schmitz S, et al. Sirolimus is efficacious in treatment for extensive and/or complex slow-flow vascular malformations: a monocentric prospective phase II study. *Orphanet J Rare Dis* [Internet]. 2018 Oct 29 [cited 2023 Apr 18];13(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3006885/>
269. Fokas E, Im JH, Hill S, Yameen S, Stratford M, Beech J, et al. Dual inhibition of the PI3K/mTOR pathway increases tumor radiosensitivity by normalizing tumor vasculature. *Cancer Res* [Internet]. 2012 Jan 1 [cited 2023 Apr 18];72(1):239–48. Available from: <https://aacrjournals.org/cancerres/article/72/1/239/575868/Dual-Inhibition-of-the-PI3K-mTOR-Pathway-Increases>
270. André F, Ciruelos E, Rubovszky G, Campone M, Loibl S, Rugo HS, et al. Alpelisib for PIK3CA - Mutated, Hormone Receptor–Positive Advanced Breast Cancer . *N Engl J Med* [Internet]. 2019 May 16 [cited 2023 Apr 18];380(20):1929–40. Available from: <https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/nejmoa1813904>
271. Venot Q, Blanc T, Rabia SH, Berteloot L, Ladraa S, Duong JP, et al. Targeted therapy in patients with PIK3CA-related overgrowth syndrome. *Nature* [Internet]. 2018 Jun 6 [cited 2023 Apr 18];558(7711):540. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3006885/>
272. Yu Y, Savage RE, Eathiraj S, Meade J, Wick MJ, Hall T, et al. Targeting AKT1-E17K and the PI3K/AKT Pathway with an Allosteric AKT Inhibitor, ARQ 092. *PLoS One* [Internet]. 2015 Oct 15 [cited 2023 Apr 18];10(10). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26473236/>
273. Biesecker LG, Edwards M, O'Donnell S, Doherty P, MacDougall T, Tith K, et al. Clinical report: One year of treatment of Proteus syndrome with miransertib (ARQ 092). *Cold Spring Harb Mol Case Stud* [Internet]. 2020 Feb 1 [cited 2023 Apr 18];6(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/326996520/>
274. Leoni C, Gullo G, Resta N, Fagotti A, Onesimo R, Schwartz B, et al. First evidence of a therapeutic effect of miransertib in a teenager with Proteus syndrome and ovarian carcinoma. *Am J Med Genet Part A* [Internet]. 2019 Jul 1 [cited 2023 Apr 18];179(7):1319–24. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/ajmg.a.61160>
275. Forde K, Resta N, Ranieri C, Rea D, Kubassova O, Hinton M, et al. Preclinical model systems of ryanodine receptor 1-related myopathies and malignant hyperthermia: a comprehensive scoping review of works published 1990–2019. *Orphanet J Rare Dis* [Internet]. 2020 [cited 2023 Apr 18];16:109. Available from: <https://doi.org/10.1186/s13023-021-01745-0>
276. Kobialka P, Sabata H, Vilalta O, Gouveia L, Angulo-Urarte A, Muixí L, et al. The onset of PI3K-related vascular malformations occurs during angiogenesis and is prevented by the AKT inhibitor miransertib. *EMBO Mol Med*. 2022 Jul 7;14(7).
277. Miransertib (ARQ 092) Granted Fast Track Designation for the Treatment of PIK3CA-Related Overgrowth Spectrum (PROS) | Business Wire [Internet]. [cited 2023 Apr 18]. Available from: <https://www.businesswire.com/news/home/20180913005253/en/Miransertib-ARQ-092-Granted-Fast-Track-Designation-for-the-Treatment-of-PIK3CA-Related-Overgrowth-Spectrum-PROS>
278. Kinross KM, Montgomery KG, Kleinschmidt M, Waring P, Ivetac I, Tikoo A, et al. An activating Pik3ca mutation coupled with Pten loss is sufficient to initiate ovarian tumorigenesis in mice. *J Clin Invest* [Internet]. 2012 Feb 2 [cited 2023 Mar 19];122(2):553. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2266789/>
279. Muzumdar MD, Tasic B, Miyamichi K, Li N, Luo L. A global double-fluorescent Cre reporter mouse. *genesis* [Internet]. 2007 Sep 1 [cited 2023 Apr 21];45(9):593–605. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/dvg.20335>
280. Fernández-Chacón M, Casquero-García V, Luo W, Francesca Lunella F, Ferreira Rocha S, Del Olmo-Cabrera S, et al. iSuRe-Cre is a genetic tool to reliably induce and report Cre-dependent genetic

- modifications. *Nat Commun* 2019 101 [Internet]. 2019 May 22 [cited 2023 Apr 21];10(1):1–13. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41467-019-10239-4>
281. Takamoto N, You LR, Moses K, Chiang C, Zimmer WE, Schwartz RJ, et al. COUP-TFII is essential for radial and anteroposterior patterning of the stomach. *Development* [Internet]. 2005 May 1 [cited 2023 Apr 23];132(9):2179–89. Available from: <https://journals.biologists.com/dev/article/132/9/2179/43390/COUP-TFII-is-essential-for-radial-and>
282. Jeong HW, Hernández-Rodríguez B, Kim JM, Kim KP, Enriquez-Gasca R, Yoon J, et al. Transcriptional regulation of endothelial cell behavior during sprouting angiogenesis. *Nat Commun* [Internet]. 2017;8(1):1–14. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-017-00738-7>
283. Wang L, Cheng C-M, Qin J, Xu M, Kao C-Y, Shi J, et al. Small-molecule inhibitor targeting orphan nuclear receptor COUP-TFII for prostate cancer treatment. *Sci Adv* [Internet]. 2020 [cited 2023 May 15]; Available from: <https://www.science.org/doi/10.1126/sciadv.aaz8031>
284. Luks VL, Kamitaki N, Vivero MP, Uller W, Rab R, Bovee JVMG, et al. Lymphatic and other vascular malformative/overgrowth disorders are caused by somatic mutations in PIK3CA. *J Pediatr* [Internet]. 2015 [cited 2023 May 26];166(4):1048. Available from: <https://pmc/articles/PMC4498659/>
285. Garrido-Martin EM, Nguyen HL, Cunningham TA, Choe SW, Jiang Z, Arthur HM, et al. Common and distinctive pathogenetic features of arteriovenous malformations in hereditary hemorrhagic telangiectasia 1 and hereditary hemorrhagic telangiectasia 2 animal models - Brief report. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* [Internet]. 2014 [cited 2023 May 26];34(10):2232–6. Available from: <https://www.ahajournals.org/doi/abs/10.1161/ATVBAHA.114.303984>
286. Martinez-Corral I, Zhang Y, Petkova M, Ortsäter H, Sjöberg S, Castillo SD, et al. Blockade of VEGF-C signaling inhibits lymphatic malformations driven by oncogenic PIK3CA mutation. *Nat Commun* [Internet]. 2020 Dec 1 [cited 2023 May 26];11(1). Available from: <https://pmc/articles/PMC7280302/>
287. Behraves S, Yakes W, Gupta N, Naidu S, Chong BW, Khademhosseini A, et al. Venous malformations: clinical diagnosis and treatment. *Cardiovasc Diagn Ther* [Internet]. 2016 [cited 2023 May 26];6(6):557. Available from: <https://pmc/articles/PMC5220204/>
288. Hassanein AH, Mulliken JB, Fishman SJ, Alomari AI, Zurakowski D, Greene AK. Venous malformation: Risk of progression during childhood and adolescence. *Ann Plast Surg* [Internet]. 2012 Feb [cited 2023 May 26];68(2):198–201. Available from: https://journals.lww.com/annalsplasticsurgery/Fulltext/2012/02000/Venous_Malformation__Risk_of_Progression_During.22.aspx
289. Pang C, Lim CS, Brookes J, Tsui J, Hamilton G. Emerging importance of molecular pathogenesis of vascular malformations in clinical practice and classifications. *Vasc Med (United Kingdom)* [Internet]. 2020 Aug 1 [cited 2023 May 26];25(4):364–77. Available from: https://journals.sagepub.com/doi/full/10.1177/1358863X20918941?rfr_dat=cr_pub++0pubmed&url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori%3Arid%3Aacrossref.org
290. Rafii S, Butler JM, Ding B Sen. Angiocrine functions of organ-specific endothelial cells. *Nat* 2016 5297586 [Internet]. 2016 Jan 20 [cited 2023 May 26];529(7586):316–25. Available from: <https://www.nature.com/articles/nature17040>
291. Monelli E, Villacampa P, Zabala-Letona A, Martinez-Romero A, Llana J, Beiroa D, et al. Angiocrine polyamine production regulates adiposity. *Nat Metab* [Internet]. 2022 Mar 1 [cited 2023 May 26];4(3):327–43. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35288722/>
292. Zhang J, Muri J, Fitzgerald G, Gorski T, Gianni-Barrera R, Masschelein E, et al. Endothelial Lactate Controls Muscle Regeneration from Ischemia by Inducing M2-like Macrophage Polarization. *Cell Metab* [Internet]. 2020 Jun 6 [cited 2023 May 26];31(6):1136. Available from: <https://pmc/articles/PMC7267778/>
293. Cox JA, Bartlett E, Lee EI. Vascular Malformations: A Review. *Semin Plast Surg* [Internet]. 2014 [cited 2023 May 26];28(2):58. Available from: <https://pmc/articles/PMC4078214/>
294. Petkova M, Kraft M, Stritt S, Martinez-Corral I, Ortsäter H, Vanlandewijck M, et al. Immune-interacting lymphatic endothelial subtype at capillary terminals drives lymphatic malformation. *J Exp Med* [Internet]. 2023 Apr 4 [cited 2023 May 26];220(4). Available from: <https://pmc/articles/PMC9884640/>
295. Brouillard P, Schlögel MJ, Homaun Sepehr N, Helaers R, Queisser A, Fastré E, et al. Non-hotspot PIK3CA mutations are more frequent in CLOVES than in common or combined lymphatic malformations. *Orphanet J Rare Dis* [Internet]. 2021 Dec 1 [cited 2023 May 25];16(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34112235/>
296. Madsen RR, Vanhaesebroeck B, Semple RK. Cancer-Associated PIK3CA Mutations in Overgrowth

- Disorders. Trends Mol Med [Internet]. 2018 Oct 1 [cited 2023 May 25];24(10):856–70. Available from: <http://www.cell.com/article/S1471491418301631/fulltext>
297. Danielsson BE, Tieu K V., Spagnol ST, Vu KK, Cabe JI, Raisch TB, et al. Chromatin condensation regulates endothelial cell adaptation to shear stress. Mol Biol Cell [Internet]. 2022 Sep 15 [cited 2023 May 29];33(11). Available from: <https://www.molbiolcell.org/doi/10.1091/mbc.E22-02-0064>
298. Alavattam KG, Mitzelfelt KA, Bonora G, Fields PA, Yang X, Chiu HS, et al. Dynamic chromatin organization and regulatory interactions in human endothelial cell differentiation. Stem cell reports [Internet]. 2023 Jan 10 [cited 2023 May 29];18(1):159–74. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36493778/>
299. Nakato R, Wada Y, Nakaki R, Nagae G, Katou Y, Tsutsumi S, et al. Comprehensive epigenome characterization reveals diverse transcriptional regulation across human vascular endothelial cells. Epigenetics and Chromatin [Internet]. 2019 Dec 19 [cited 2023 May 29];12(1):1–16. Available from: <https://epigeneticsandchromatin.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13072-019-0319-0>
300. Luo J, Liu D, Zhang J, J Shyy JY, Kwak BrendaKwakChanson BR, Denis J-F, et al. KLF4-Induced Connexin40 Expression Contributes to Arterial Endothelial Quiescence. 2019 [cited 2023 May 29]; Available from: www.frontiersin.org
301. Tsaryk R, Yucel N, Leonard E V, Diaz N, Bondareva O, Odenthal-Schnittler M, et al. Shear stress switches the association of endothelial enhancers from ETV/ETS to KLF transcription factor binding sites. 123AD [cited 2023 May 29]; Available from: <https://doi.org/10.1038/s41598-022-08645-8>
302. Banerjee K, Lin Y, Gahn J, Gupta P, Graupera M, Dobrev G, et al. Excessive fluid shear stress-mediated Klf4 leads to arteriovenous pathogenesis. [cited 2023 May 29]; Available from: <https://doi.org/10.1101/2022.07.04.498236>
303. Chavkin NW, Cain S, Walsh K, Hirschi KK. Isolation of Murine Retinal Endothelial Cells for Next-Generation Sequencing. J Vis Exp [Internet]. 2021 Oct 10 [cited 2023 Jun 7];(176). Available from: [/pmc/articles/PMC8641104/](https://www.jove.com/doi/10.1038/s41598-022-08645-8)
304. He Y, Tacconi C, Dieterich LC, Kim J, Restivo G, Gousopoulos E, et al. Novel Blood Vascular Endothelial Subtype-Specific Markers in Human Skin Unearthed by Single-Cell Transcriptomic Profiling. Cells [Internet]. 2022 Apr 1 [cited 2023 May 31];11(7). Available from: [/pmc/articles/PMC8997372/](https://www.mdpi.com/1422-0067/23/4/1422)
305. Madsen RR, Knox RG, Pearce W, Lopez S, Mahler-Araujo B, McGranahan N, et al. Oncogenic PIK3CA promotes cellular stemness in an allele dose-dependent manner. Proc Natl Acad Sci U S A [Internet]. 2019 [cited 2023 Jun 7];116(17):8380–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30948643/>
306. Sun B, Jiang Y, Cui H, Fang X, Han G, Dai X, et al. Activating PIK3CA mutation promotes adipogenesis of adipose-derived stem cells in macrodactyly via up-regulation of E2F1. Cell Death Dis 2020 117 [Internet]. 2020 Jul 30 [cited 2023 Jun 7];11(7):1–11. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41419-020-02806-1>
307. Briata P, Lin WJ, Giovarelli M, Pasero M, Chou CF, Trabucchi M, et al. PI3K/AKT signaling determines a dynamic switch between distinct KSRP functions favoring skeletal myogenesis. Cell Death Differ 2012 193 [Internet]. 2011 Sep 2 [cited 2023 Jun 7];19(3):478–87. Available from: <https://www.nature.com/articles/cdd201117>
308. Chen X, Qin J, Cheng CM, Tsai MJ, Tsai SY. COUP-TFII Is a Major Regulator of Cell Cycle and Notch Signaling Pathways. Mol Endocrinol [Internet]. 2012 Aug 1 [cited 2023 Mar 23];26(8):1268. Available from: [/pmc/articles/PMC3404301/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22544441/)
309. Chen D, Van der Ent MA, Lartey NL, King PD. EPHB4-RASA1-Mediated Negative Regulation of Ras-MAPK Signaling in the Vasculature: Implications for the Treatment of EPHB4- and RASA1-Related Vascular Anomalies in Humans. Pharm 2023, Vol 16, Page 165 [Internet]. 2023 Jan 23 [cited 2023 Jun 7];16(2):165. Available from: <https://www.mdpi.com/1424-8247/16/2/165/htm>
310. Xu C, Hasan SS, Schmidt I, Rocha SF, Pitulescu ME, Bussmann J, et al. Arteries are formed by vein-derived endothelial tip cells. Nat Commun 2014 51 [Internet]. 2014 Dec 15 [cited 2023 Jun 7];5(1):1–11. Available from: <https://www.nature.com/articles/ncomms6758>
311. Döring Y, Noels H, Van Der Vorst EPC, Neideck C, Egea V, Drechsler M, et al. Vascular CXCR4 limits atherosclerosis by maintaining arterial integrity: Evidence from mouse and human studies. Circulation. 2017;136(4):388–403.
312. Stratman AN, Burns MC, Farrelly OM, Davis AE, Li W, Pham VN, et al. Chemokine mediated signalling within arteries promotes vascular smooth muscle cell recruitment. Commun Biol 2020 31 [Internet].

- 2020 Dec 4 [cited 2023 Jun 7];3(1):1–13. Available from: <https://www.nature.com/articles/s42003-020-01462-7>
313. Neal A, Nornes S, Louphrasitthiphol P, Sacilotto N, Preston MD, Fleisinger L, et al. ETS factors are required but not sufficient for specific patterns of enhancer activity in different endothelial subtypes. *Dev Biol* [Internet]. 2021 May 1 [cited 2023 Jun 7];473:1. Available from: [/pmc/articles/PMC8026812/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33481262/)
314. Strittmatter BG, Jerde TJ, Hollenhorst PC. Ras/ERK and PI3K/AKT signaling differentially regulate oncogenic ERG mediated transcription in prostate cells. *PLoS Genet* [Internet]. 2021 Jul 27 [cited 2023 Jun 9];17(7). Available from: [/pmc/articles/PMC8345871/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33845871/)
315. Lavenburg KR, Ivey J, Hsu T, Muise-Helmericks RC. Coordinated functions of Akt/PKB and ETS1 in tubule formation. *FASEB J* [Internet]. 2003 Dec [cited 2023 Jun 9];17(15):2278. Available from: [/pmc/articles/PMC2276577/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12276577/)
316. Gong GQ, Bilanges B, Allsop B, Masson GR, Robertson V, Askwith T, et al. A small-molecule PI3K α activator for cardioprotection and neuroregeneration. *Nat* 2023 6187963 [Internet]. 2023 May 24 [cited 2023 Jun 9];618(7963):159–68. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41586-023-05972-2>
317. Lopes-Coelho F, Martins F, Pereira SA, Serpa J. Anti-Angiogenic Therapy: Current Challenges and Future Perspectives. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2021 Apr 1 [cited 2023 Jun 9];22(7):3765. Available from: [/pmc/articles/PMC8038573/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33857373/)
318. Li X, Sun X, Carmeliet P. Hallmarks of Endothelial Cell Metabolism in Health and Disease. *Cell Metab* [Internet]. 2019 Sep 3 [cited 2023 Apr 3];30(3):414–33. Available from: <http://www.cell.com/article/S1550413119304401/fulltext>
319. Hoxhaj G, Manning BD. The PI3K–AKT network at the interface of oncogenic signalling and cancer metabolism. *Nat Rev Cancer* [Internet]. 2020;20(2):74–88. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41568-019-0216-7>
320. Cantelmo AR, Conradi LC, Brajic A, Goveia J, Kalucka J, Pircher A, et al. Inhibition of the Glycolytic Activator PFKFB3 in Endothelium Induces Tumor Vessel Normalization, Impairs Metastasis, and Improves Chemotherapy. *Cancer Cell* [Internet]. 2016 Dec 12 [cited 2023 Apr 4];30(6):968–85. Available from: <http://www.cell.com/article/S1535610816304937/fulltext>
321. Zhou ZY, Wang L, Wang YS, Dou GR. PFKFB3: A Potential Key to Ocular Angiogenesis. *Front Cell Dev Biol*. 2021;9(March):1–14.
322. Espinosa-Díez C, Miguel V, Vallejo S, Sánchez FJ, Sandoval E, Blanco E, et al. Role of glutathione biosynthesis in endothelial dysfunction and fibrosis. *Redox Biol*. 2018;14(July 2017):88–99.
323. Schuman EM, Madison D V. Nitric Oxide and. *Am J Physiol*. 1994;272(2 Pt 2):31–5.



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

