




Neovascularización mediada por factor tisular en la placa aterosclerótica

Sonia Espinosa Ferrer

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



Neovascularización mediada por factor tisular en la placa aterosclerótica

Sonia Espinosa Ferrer

Tesis doctoral

2015

UNIVERSIDAD DE BARCELONA
PROGRAMA DE DOCTORADO EN BIOMEDICINA
FACULTAD DE FARMACIA

**Neovascularización mediada por factor tisular en la
placa aterosclerótica**

Tesis presentada por:

SONIA ESPINOSA FERRER

Para optar al grado de:

Doctor por la Universidad de Barcelona

Institut Català de Ciències Cardiovasculars (CSIC-ICCC)

La directora

La directora

El tutor

La doctoranda

**Prof. Lina
Badimon Maetro**

**Dra. Gemma
Arderiu Marquès**

**Dr. Juan Carlos
Laguna Egea**

**Sonia Espinosa
Ferrer**

Barcelona, 2015

“Do what you love and do it often. Open your mind, arms, and heart to new things and people. Life is about the people you meet, and the things you create with them, so go out and start creating. Life is short. Live your dream and share your passion.”

Dave, Mike & Fabian. The Hosltee Manifesto.

*To my sister, who is so far and so close
at the same time.*

A mi padre y a mi madre.

AGRADECIMIENTOS

En una primera impresión, cuatro años me parecían mucho tiempo. Hoy, sin embargo, todavía me cuesta creer que esta etapa de mi vida esté llegando a su fin y me resulta increíble pensar cuánto he vivido, cuánto he aprendido y cuánto he disfrutado esta época que, ahora, se me antoja corta. Cuando algo termina, es inevitable echar la vista atrás y acordarte de cómo empezó y de todas las personas que te acompañaron en el camino. Por eso, es para mí un placer dedicar este espacio a todos aquellos que, en mayor o menor medida, aportaron su granito de arena.

En primer lugar, quiero agradecer a la Prof. Lina Badimon la confianza que depositó en mí al aceptarme en su grupo, gracias por darme la oportunidad de vivir esta experiencia, por tus consejos y por tu ayuda a lo largo de estos años.

También quiero agradecer a Gemma Arderiu toda la ayuda que me ha brindado. Gracias por haberme guiado y aconsejado durante mi formación, por tu paciencia y, sobretodo, por tu apoyo en los momentos complicados.

Quiero darle las gracias a todas las personas que formáis parte del ICCC, porque todos habéis contribuido en el desarrollo de mi tesis. En especial, me gustaría empezar por Olaya García, a quien tengo que agradecerle muchas cosas. Gracias por todo lo que me has enseñado, por tu paciencia, por tu infinita disponibilidad para echarme una mano, por escucharme y por tu apoyo que siempre ha estado ahí cuando lo he necesitado. Has sido una compañera excelente y te estoy muy agradecida. Gracias Montse por tu comprensión y dulzura, y por haber podido contar contigo en mis momentos de bajón. Mónica, gracias por tu alegría diaria y tus sonrisas, tienen más valor del que parece. Sonia Huertas y Mari Cánovas, gracias por los momentos que hemos compartido, por vuestros consejos y por las risas que nos hemos echado juntas. Carolina, gracias por nuestras charlas dentro y fuera del ICCC.

También quiero expresar un especial agradecimiento a mis compañeros del 110 y agregados, gracias por vuestra amistad y cariño, y por todos los momentos compartidos, que han sido muchos y muy buenos. Bea, gracias por estar siempre disponible y por ayudarme tanto con la tesis, por animarme y por tu paciencia. Saray, gracias por tu generosidad, por tus risas y por el esfuerzo que pones siempre para colaborar. Me he sentido muy a gusto compartiendo piso contigo. Mar, gracias por tu forma de ser y tus ganas de

ayudar. Ingrid, gracias por escucharme y por tus consejos. Javi, gracias por tus chistes y por poner ese punto de humor que tantas veces nos ha hecho reír. Sílvia, gracias por tu alegría diaria y por tu disponibilidad para ayudar. María Galán, gracias por aconsejarme, escucharme y echarme una mano siempre que has podido. María Azorín, gracias por tu energía inagotable y por tus ánimos. Judith, gracias por tranquilizarme con los nervios de la tesis y por tu compañía. Gemma, gracias por tus consejos, tu sinceridad, tu frikismo y tu sentido del humor. Tengo muchísimas cosas que agradecer a todos, gracias por introducirme en el mundo del running, por las miles de quedadas que hemos hecho, por las excursiones, las barbacoas, las cervezas y las bravas en la china, los disfraces, los zumitos, los helados de chocolate y las miles de cosas que hemos hecho juntos. Me ha encantado compartir este tiempo con vosotros, me habéis aportado muchas cosas. Os voy a echar mucho de menos.

Quiero darle las gracias también a Rosa Aledo, por enseñarme con tanta paciencia la técnica de clonaje, por tu simpatía y tu sonrisa cada vez que te veía. Esther Peña, quiero agradecerte el tiempo que has invertido conmigo en el confocal y tu disposición a colaborar cada vez que te hacía una consulta. Mónica Pescador, muchas gracias por echarme una mano con los westerns y los ELISA. Raquel de la Torre, gracias por todas las veces que me he reído contigo. Maite, gracias por tu amabilidad y tus ganas de ayudar, por nuestras conversaciones en la biblioteca y por tu buena actitud. También le quiero dar las gracias a mis compañeras de congreso Rosa Suades y Judith Cubedo. Rosa, gracias por dedicarme siempre una sonrisa. Judith, gracias por haber sido tan agradable conmigo.

También me gustaría agradecer a mis compañeros Pablo, Sergi y Josep, por vuestro buen humor y las risas que hemos compartido; a Teresa Padró y Gemma Vilahur, por darme ánimos; a Esther Gerbolés y Laura Buendía, por vuestra sonrisa mañanera y por la labor que hacéis en cultivos. Nía, Maisa, Anna, Ona, Oriol, M^a Angels y Maribel, gracias por la labor que hacéis en el ICC; Elena, Laura, Adela, Carmen y Selma, gracias por nuestras conversaciones. Adela, me gustó mucho ser compañeras de máster. Sandra y Meritxell, muchas gracias por ser dos trabajadoras tan eficientes, da gusto trabajar con vosotras.

Quiero agradecer a mis amigos de Barberà todos los buenos momentos que he vivido con ellos. En especial, a Lola y a Lau, sois geniales, lo paso muy bien con vosotras y me encantan nuestras charlas. Jordi y Cristhian, sois muy especiales para mí, gracias por animarme cuando estoy mal, escucharme, aguantarme, hacerme reír hasta la saciedad... compartir piso con vosotros ha sido toda una experiencia, he aprendido mucho de vosotros y sobretodo, con vuestra amistad he sido muy muy feliz. Muchas gracias.

Quiero darles las gracias también a mis amigos de Barcelona, Lucía, Pablo, David Sánchez, Marc, Lucía Pérez y Helen, gracias por los momentos compartidos, las cenas, los fines de semana en la montaña, de concierto, de cervezas, de fiesta o de calçots, han sido muchas horas de desconexión, de diversión y de risas. Sois también una parte muy importante de esta tesis porque me he sentido muy apoyada por vosotros.

También quiero darle mi más sincero y sentido gracias a David de Gonzalo, porque has sido mi mentor en muchos aspectos de mi trabajo y fuera de él, gracias por motivarme, aconsejarme, comprenderme, escucharme, apoyarme y ayudarme como si de tu propia tesis se tratara. Podría dedicarte una tesis entera de agradecimientos, eso sí, ¡con puntos y comas! Pero en resumidas cuentas y por encima de todo, gracias por estar a mi lado, por cambiarme la vida y por hacerme feliz.

Finalmente, quiero dedicar el agradecimiento más profundo a mi familia. Tata, gracias por preocuparte tanto por mí, intentar ayudarme y protegerme siempre, y por estar tan lejos y hacerte sentir tan cerca de mí. Papa, gracias por estar al otro lado del teléfono cada vez que necesito consolarme, por animarme siempre y por apoyarme en todo lo que hago. Mama, gracias por preocuparte tanto por mí, por cuidarme y por esos tupperes maravillosos que preparas con tanto cariño. Has sido una ayuda muy importante. ¡Va por vosotros!

Science is not a serious business. Give yourself the uncomfortable privilege of changing your mind over and over again. Science is not work, if it is, then stop and do something else.

¡Gracias a todos los que habéis formado parte de esta increíble experiencia!

ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	23
INTRODUCCIÓN	31
1. LAS ENFERMEDADES CARDIOVASCULARES	33
1.1 Epidemiología de las enfermedades cardiovasculares.....	33
1.2 Factores de riesgo cardiovascular	35
2. ATEROSCLEROSIS.....	37
2.1. Fisiopatología de la aterosclerosis	37
2.2. La pared arterial	38
2.3. Desarrollo de la lesión aterosclerótica.....	40
2.3.1. Activación endotelial	40
2.3.2. Inicio de la lesión	42
2.3.3. Progresión de la lesión	42
2.3.4. Complicación de la lesión: ruptura de la placa aterosclerótica... 43	
2.4. Papel de la angiogénesis, el factor tisular y la inflamación en la placa aterosclerótica.....	45
3. NEOVASCULARIZACIÓN	49
3.1. Proceso de angiogénesis	50
4. INFLAMACIÓN	53
4.1 Monocitos en la placa aterosclerótica	53
4.1.1 Heterogeneidad monocitaria	53
4.1.2. Monocitos con fenotipo endotelial.....	56
5. FACTOR TISULAR	57
5.1. El factor tisular y la cascada de coagulación	57
5.2. Estructura del factor tisular.....	58
5.2.1. Proceso de splicing	60
5.2.2. Modificaciones post-traduccionales.....	61
5.3. Moduladores de la expresión y la actividad del factor tisular	62

5.4. Distribución del factor tisular	65
5.4.1. Tejidos extravasculares	66
5.4.2. Plaquetas.....	66
5.4.3. Monocitos	67
5.4.4. Granulocitos: neutrófilos polimorfonucleares y eosinófilos.....	67
5.4.5. El factor tisular en células endoteliales y células musculares lisas vasculares.....	68
5.5. Señalización celular inducida por el factor tisular	69
6. ESTADO DE LA CUESTIÓN	73
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	75
MATERIAL Y MÉTODOS.....	79
1. DISEÑO EXPERIMENTAL	81
2. CULTIVOS CELULARES	82
2.1 Células endoteliales	82
2.2. Células musculares lisas vasculares	83
2.3. Monocitos	83
3. SILENCIAMIENTO DE GENES	86
4. AMPLIFICACIÓN, PURIFICACIÓN Y CLONAJE EN VECTORES DE EXPRESIÓN	88
4.1. Generación de construcciones.....	88
4.1.1. Obtención del inserto	88
4.1.2. Digestión y desfosforilación del vector receptor	89
4.1.3. Reacción de ligación.....	89
4.1.4. Construcciones obtenidas.....	89
4.2. Mutagénesis dirigida.....	90
4.3. Transformación bacteriana.....	92
4.4. Purificación del ADN	92

5. SOBREEXPRESIÓN GÉNICA POR TRANSDUCCIÓN VIRAL.....	94
5.1. Producción de los virus.....	95
5.2. Determinación del título viral.....	95
5.3. Transducción en HMEC-1	96
6. SOBREEXPRESIÓN TRANSITORIA POR PLÁSMIDOS	97
7. ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD DE PROMOTORES	98
8. ENSAYOS DE MIGRACIÓN.....	99
8.1. Cicatrización de heridas.....	99
8.2. Migración con cámaras Boyden	100
9. ANGIOGÉNESIS <i>IN VITRO</i>	102
9.1. Cultivo de células en un sistema tridimensional	102
9.2. Tinción de células y determinación de cinéticas de movimiento.....	103
9.3. Extracción de células de los cultivos 3DBM.....	103
10. EFECTO DE LOS MONOCITOS SOBRE LAS CÉLULAS ENDOTELIALES	104
10.1. Separación de poblaciones de monocitos.....	104
10.1.1. Principio de separación del método.....	104
10.2. Obtención de medio condicionante de monocitos	106
10.3. Aislamiento y cuantificación de micropartículas positivas para factor tisular.....	106
11. EFECTO DE LAS CÉLULAS ENDOTELIALES SOBRE LOS MONOCITOS	108
11.1. Obtención de medio condicionante de HMEC-1	108
11.2. Expansión de la población de monocitos CD16 ⁺	108
11.3. Transdiferenciación y caracterización de monocitos a células con fenotipo endotelial	109
12. INMUNOPRECIPITACIÓN DE CROMATINA.....	111
13. INMUNOPRECIPITACIÓN DE WNT5A-S³⁵-METIONINA/CISTEÍNA	114
14. MOVILIZACIÓN DE CALCIO INTRACELULAR	115

15. ANÁLISIS DE LOS NIVELES DE ARN MENSAJERO.....	116
15.1. Obtención de ARN celular.....	116
15.2. Cuantificación del ARN.....	116
15.3. Síntesis del ADNc	117
15.4. PCR a tiempo real por TaqMan® Gene Expression Assay	117
15.5. PCR a tiempo real por SYBR-Green	119
15.6. Cuantificación	120
16. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN PROTEICA	121
16.1. Obtención de muestras proteicas de cultivos celulares	121
16.2. Subfraccionamiento nuclear y citoplasmático.....	121
16.3. Precipitación de proteínas de sobrenadantes celulares.....	122
16.4. Cuantificación de las muestras	122
16.5. Western Blot	122
16.6. ELISA de CCL2.....	125
17. ENSAYOS IN VIVO	126
17.1. Angiogénesis <i>in vivo</i>	126
17.2. Determinación del contenido de hemoglobina	127
18. HISTOLOGÍA	128
19. INMUNOCITOQUÍMICA E INMUNOHISTOQUÍMICA	129
20. ESTADÍSTICA.....	131
RESULTADOS	133
ARTÍCULO I.....	135
Supplementary Material	150
ARTÍCULO II.....	159
Supplementary Material	196
ARTÍCULO III.....	217
Supplementary Material	233

ARTÍCULO IV	251
DISCUSIÓN.....	281
CONCLUSIONES.....	297
REFERENCIAS	301
APÉNDICE	319
MUTACIONES EN LA SECUENCIA DEL FACTOR TISULAR	321
MUTACIONES EN LA SECUENCIA DEL PROMOTOR DE CCL2	322
PARTICIPACIÓN DE LA DOCTORANDA EN LOS ARTÍCULOS PUBLICADOS	323

ABREVIATURAS

3DBM	Membrana basal tridimensional o <i>3 Dimensional Basement Membrane</i>
AA	Ácido Araquidónico
ABP-280	Proteína de unión a actina 280 o <i>Actin-Binding Protein 280</i>
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN copia
agLDL	Lipoproteína de baja densidad agregada o <i>aggregated Low Density Lipoprotein</i>
AML-1	Proteína de leucemia mieloide aguda-1 o <i>Acute Myeloid Leukemia-1 protein</i>
AngII	Angiotensina II
AP-1	Proteína activadora-1 o <i>Activator Protein-1</i>
ApoE	Apolipoproteína E
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
asTF	Factor tisular truncado o <i>alternatively spliced tissue factor</i>
bFGF	Factor básico de crecimiento de fibroblastos o <i>basic Fibroblast Growth Factor</i>
BSA	Albúmina de suero bovino o <i>Bovine Serum Albumin</i>
CCL2	Ligando 2 de quimiocinas con dominio C-C o <i>Chemokine (C-C motif) Ligand 2</i>
CCR	Receptor de quimiocinas con dominio C-C o <i>Chemokine (C-C motif) Receptor</i>
CEm	Células Endoteliales microvasculares
CEs	Células Endoteliales
cfu	Unidades formadoras de colonias o <i>Colony Forming Units</i>
ChIP	Inmunoprecipitación de cromatina o <i>Chromatin Immunoprecipitation</i>
CIAP	Fosfatasa alcalina intestinal de ternero o <i>Calf Intestinal Alkaline Phosphatase</i>
CMLVs	Células Musculares Lisas Vasculares
CMV	Citomegalovirus
COX	Ciclooxigenasa
CRP	Proteína C Reactiva o <i>C Reactive Protein</i>
CSK	Citoesqueleto o <i>Cytoskeleton</i>
CX3CR1	Receptor 1 de quimiocina con dominio CX3C o <i>Chemokine (CX3C motif) Receptor 1</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
ECGS	Suplemento para el crecimiento de células endoteliales o <i>Endothelial Cells Growth Supplement</i>
ECVs	Enfermedades Cardiovasculares
EDTA	Ácido etildiaminotetraacético
EGF	Factor de crecimiento endotelial o <i>Endothelial Growth Factor</i>

ABREVIATURAS

EGTA	Ácido etilenglicol tetraacético
ELCs	Células parecidas a endoteliales o <i>Endothelial-Like Cells</i>
eNOS	Sintasa endotelial de óxido nítrico o <i>endothelial Nitric Oxide Synthase</i>
EPCs	Células endoteliales progenitoras o <i>Endothelial Progenitor Cells</i>
Erg-1	Gen relacionado a ETS o <i>ETS-related gen</i>
ERK	Quinasa regulada por señal extracelular o <i>Extracellular-signal-Regulated Kinase</i>
ET	Endotelina
ETS1	E26 de transformación específica o <i>E26-Transformation-Specific</i>
F3	Factor III de la coagulación
FIIa	Factor II activado
FIXa	Factor IX activado
fITF	Factor tisular de longitud completa o <i>full-length Tissue Factor</i>
FRC	Factores de Riesgo Cardiovascular
FSC	Detector de dispersión frontal o <i>Forward Scatter</i>
FT	Factor Tisular
FT ⁺ -MPs	Micropartículas positivas para factor tisular
Ftmut	Factor tisular mutado
FVII	Factor VII
FVIIa	FVII activado
FXa	Factor X activado
FZD	Receptor Frizzled
GAPDH	Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa o <i>Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase</i>
GFP	Proteína verde fluorescente o <i>Green Fluorescence Protein</i>
Gr1/Ly6C	Epítipo Ly6C del antígeno de diferenciación mieloide Gr1
HBS	Tampón Salino Hepes o <i>Hepes Buffered Saline</i>
HDMEC	Células endoteliales dermales microvasculares humanas o <i>Human Dermal Microvascular Endothelial Cells</i>
HGF	Factor de crecimiento de hepatocito o <i>Hepatocyte Growth Factor</i>
HiCN	Cianmetahemoglobina o <i>Haemoglobincyanide</i>
HIF-1 α	Factor inducible de hipoxia-1 α o <i>Hypoxia Inducible Factor-1α</i>
HMEC	Células endoteliales microvasculares humanas o <i>Human Microvascular Endothelial Cells</i>
HRP	Peroxidasa de rábano o <i>Horseradish Peroxidase</i>
HUVEC	Células endoteliales humanas de cordón umbilical o <i>Human Umbilical Vein Endothelial Cells</i>
ICAM-1	Molécula de adhesión intercelular-1 o <i>Intercellular Adhesion Molecule-1</i>
IF	Tampón de inmunofluorescencia
IFN	Interferón
IL-1 β	Interleucina-1 β

IL-6R	Receptor de interleucina-6 o <i>Interleukin-6 Receptor</i>
IL-8	Interleucina-8
IL-8R β	Receptor β de interleucina-8 o <i>Interleukin-8 Receptor β</i>
LB	Luria Bertani
LDL	Lipoproteína de baja densidad o <i>Low Density Lipoprotein</i>
LFA-1	Antígeno-1 asociado a función linfocitaria o <i>Lymphocyte function-associated antigen-1</i>
LPA	Ácido lisofosfático o <i>Lysophosphatic acid</i>
LPS	Lipopolisacáridos
LRP5	Proteína relacionada con el receptor 5 de lipoproteína de baja densidad o <i>Low density lipoprotein Receptor-related Protein 5</i>
LTR	Secuencias largas terminales repetidas o <i>Long Terminal Repeats</i>
M-199	<i>Medium-199</i>
MAPK	Proteína quinasa activada por mitógeno o <i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i>
MCM	Medio Condicionante de Monocitos
MCP-1	Proteína quimiotáctica de monocitos-1 o <i>Monocyte Chemoattractant Protein-1</i>
MCS	Lugar de clonaje múltiple o <i>Multi Cloning Site</i>
MEM199	<i>Modified Eagle's Medium 199</i>
miRs	Micro-ARNs
MMP	Metaloproteasas de matriz o <i>Matrix Metalloproteinase</i>
MOI	Multiplicidad de infección o <i>Multiplicity Of Infection</i>
MPs	Micropartículas
NF- κ B	Factor nuclear- κ B o <i>Nuclear Factor-κB</i>
NFAT	Factor de transcripción de células T activadas o <i>Nuclear Factor of Activated T-cells</i>
NK	Células Natural Killer
NO	Óxido nítrico o <i>Nitric Oxide</i>
OMS	Organización Mundial de la Salud
ORF	Punto de inicio de lectura u <i>Open Reading Frame</i>
oxLDL	Lipoproteína de baja densidad oxidada o <i>oxidized Low Density Lipoprotein</i>
PAR2	Receptor activado por proteasas 2 o <i>Protease-Activated Receptor 2</i>
PB	Tampón fosfato o <i>Phosphate Buffered</i>
PBMCs	Células mononucleares de sangre periférica o <i>Peripheral Blood Mononuclear Cells</i>
PBS	Tampón fosfato salino o <i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCP	Polaridad Celular Planar
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa o <i>Polymerase Chain Reaction</i>
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas o <i>Platelet Derived Growth Factor</i>

ABREVIATURAS

PDI	Proteína disulfuro isomerasa
PECAM-1	Molécula de adhesión plaqueta-célula endotelial-1 o <i>Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1</i>
PEDF	Factor derivado de pigmento epitelial o <i>Pigment Epithelium-Derived Factor</i>
pFT	Promotor del Factor Tisular
PGI ₂	Prostaglandina I ₂
PI3K	Quinasa fosfatidil-inositol 3 o <i>Phosphatidylinositide 3-kinases</i>
PKC	Proteína quinasa C o <i>Protein Kinase C</i>
PMA	Forbol 12-mistirato 13-acetato o <i>Phorbol Myristate Acetate</i>
PMNs	Polimorfonucleares
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo o <i>Phenylmethylsulfonyl fluoride</i>
PPAR α	Receptor α activado de proliferador de peroxisoma o <i>Peroxisome Proliferator-Activated Receptor α</i>
PS	Fosfatidilserina o <i>Phosphatidylserine</i>
PSGL-1	Ligando-1 de glicoproteína P-selectina o <i>P-Selectin Glycoprotein Ligand-1</i>
ROS	Especies reactivas de oxígeno o <i>Reactive Oxygen Species</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SBF	Suero Bovino Fetal
SDS	Sodio Dodecil Sulfato
SDS-PAGE	Sodio Dodecil Sulfato – Poliacrilamida Gel Electroforesis
SEM	Error estándar de la media o <i>Standard Error of the Mean</i>
SH ^A / _B	Suero humano A/B
shRNA	ARN de horquilla pequeño o <i>short hairpin RNA</i>
siRNA	ARN de interferencia pequeño o <i>small interference RNA</i>
SLAN	6-Sulfo-LacNAc
SOB	Medio Optimizado o <i>Super Optimal Broth</i>
SOC	Medio optimizado con represión catabolita o <i>Super Optimal broth with Catabolite repression</i>
SP1	Proteína de especificidad 1 o <i>Specificity Protein1</i>
SR-A	Receptor scavenger-tipo A o <i>Scavenger Receptor-type A</i>
SSC	Detector de dispersión lateral o <i>Side Scatter</i>
TBS	Tampón Tris salino o <i>Tris Buffered Saline</i>
TFE3	Factor de transcripción E3 o <i>Transcription Factor E3</i>
TFPI	Inhibidor de las vías de señalización del factor tisular o <i>Tissue Factor Pathway Inhibitor</i>
TGF- β	Factor de crecimiento transformante- β o <i>Transforming Growth Factor-β</i>
TLR4	Receptor 4 Toll-like o <i>Toll-like Receptor 4</i>
TNF α	Factor de necrosis tumoral α o <i>Tumoral Necrosis Factor α</i>
TRA	Agonista del receptor de trombina o <i>Thrombin Receptor Antagonist</i>
TSP1	Trombospondina 1

TXA ₂	Tromboxano A ₂
UTR	Región no traducida o <i>untranslated region</i>
Va	Cofactor V activado
VCAM-1	Molécula de adhesión a células vasculares-1 o <i>Vascular cell adhesion protein-1</i>
VE-Cadherina	Cadherina vascular endotelial o <i>Vascular endothelial cadherin</i>
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular o <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
VEGFR	Receptor del factor de crecimiento endotelial vascular o <i>Vascular Endothelial Growth Factor Receptor</i>
VIIIa	Cofactor VIII activado
vWF	Factor von Willebrand o <i>von Willebrand Factor</i>

INTRODUCCIÓN

1. LAS ENFERMEDADES CARDIOVASCULARES

1.1 Epidemiología de las enfermedades cardiovasculares

Las enfermedades cardiovasculares (ECVs) son la principal causa de muerte en todo el mundo [1]. Datos oficiales de la Organización Mundial de la Salud (OMS) estiman que 17,3 millones de personas mueren cada año por ECVs, lo que representa el 31% del total de muertes registradas a nivel mundial [2]. Es más, las predicciones para el año 2030 prevén que las ECVs seguirán siendo la principal causa de mortalidad. Se calcula que 23,6 millones de personas morirán por alguna ECV, especialmente por cardiopatías isquémicas o accidentes cerebrovasculares [3] (**Figura 1**).

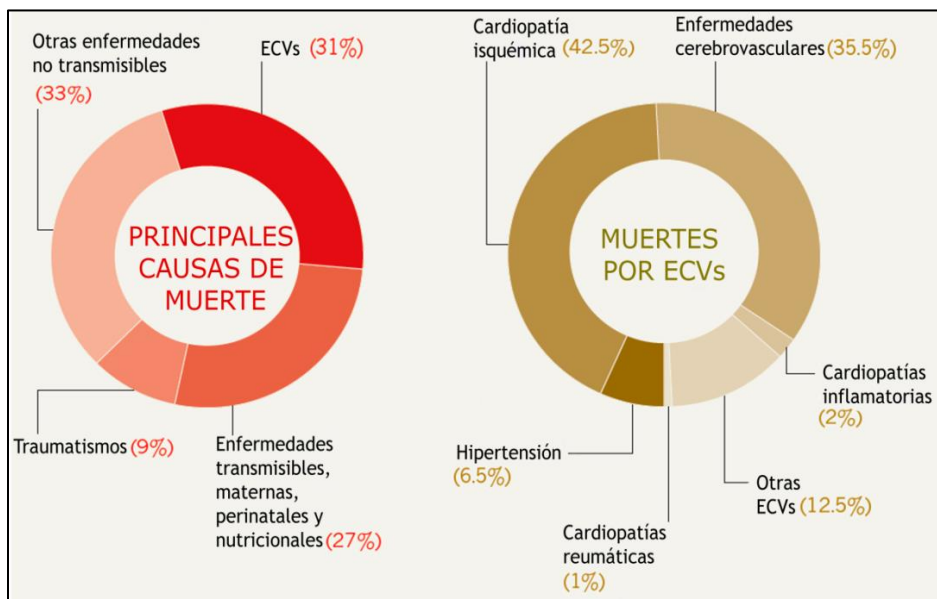


Figura 1. Principales causas de muerte a nivel mundial y distribución de muertes por ECVs. Adaptado de Cannon, B., 2013 [3].

En España, la situación resulta bastante parecida. En el 2010, las muertes por ECVs representaron el 28,4% del total, liderando la lista de causas de muerte en nuestro país. Dado que la distribución por edad de la población varía anualmente, la comparación temporal de la tasa de mortalidad bruta o cruda en el conjunto del Estado puede dar lugar a resultados distorsionados de las

diferencias verdaderas en el riesgo de muerte. Por esta razón, es importante estudiar también la tasa de mortalidad ajustada por edad, que es la media ponderada de las tasas específicas de mortalidad según la edad. La ponderación se calcula mediante el tamaño de la población estándar en cada categoría de edad. La tasa de mortalidad ajustada por edad elimina la distorsión que supone la diferente distribución de edad en la población. Cuando analizamos los patrones de mortalidad ajustados por edad, observamos que las ECVs se sitúan también a la cabeza, ocupando el segundo lugar justo por detrás del cáncer (**Tabla 1**).

Tabla 1. Principales causas de defunción en España en 2010. Elaborada a partir de los datos publicados por el Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad [4].

Causa de muerte	Defunciones	Porcentaje	Mortalidad ajustada por edad
ECVs*	108.348	28,4%	125,4
Cáncer	103.307	27,0%	152,3
E. Respiratorias	15.676	4,1%	17,8
Alzheimer	11.343	3,0%	11,4
Accidentes	10.100	2,6%	15,9
Diabetes mellitus	9.799	2,6%	11,2
Todas las causas	382.047	100%	487,0

*Agrupa las muertes por enfermedades del corazón y cerebrovasculares.

Las ECVs se clasifican de la siguiente manera:

- **Cardiopatía coronaria.** La cardiopatía coronaria es una de las ECVs más frecuentes y se caracteriza por el bloqueo de los vasos sanguíneos que irrigan el músculo cardíaco (miocardio). La cardiopatía coronaria suele estar causada por la acumulación de depósitos lipídicos en las paredes internas de los vasos y/o por coágulos de sangre [5].
- **Ictus o ataque isquémico transitorio.** El ictus es una alteración del flujo sanguíneo que irriga el cerebro debido a la ruptura (ictus hemorrágico) o a la obstrucción (ictus isquémico) de un vaso sanguíneo. Junto con el caso anterior, la enfermedad cerebrovascular es una de las ECVs más frecuentes.
- **Aneurisma aórtico.** El aneurisma aórtico consiste en la dilatación y ruptura de la aorta.
- **Arteriopatías periféricas.** La arteriopatía periférica es la enfermedad de las arterias que irrigan las extremidades.

- **Cardiopatía reumática.** Las cardiopatías reumáticas son lesiones del miocardio y de las válvulas cardíacas originadas por la fiebre reumática, una infección bacteriana causada por estreptococos.
- **Cardiopatía congénita.** Las cardiopatías congénitas son malformaciones del corazón debido a factores genéticos o a gestaciones adversas.
- **Trombosis venosa profunda y embolias pulmonares.** Tanto la trombosis venosa profunda como las embolias pulmonares consisten en la formación de coágulos de sangre en las venas de las piernas, que pueden desprenderse y alojarse en los vasos del corazón y los pulmones.
- **Otras ECVs.** Se entiende por otras ECVs el conjunto de enfermedades del corazón y de los vasos sanguíneos que son poco frecuentes. Entre ellas, encontramos la enfermedad de la válvula cardíaca y los tumores vasculares del cerebro y del corazón [6].

1.2 Factores de riesgo cardiovascular

Las ECVs están consideradas enfermedades dinámicas y progresivas que se desarrollan como consecuencia de la interacción entre factores genéticos y ambientales. Los estudios epidemiológicos permiten detectar una serie de condiciones, llamadas factores de riesgo cardiovascular (FRC), que favorecen la aparición de accidentes cardiovasculares [7]. Estimar la probabilidad de desarrollar una patología cardiovascular permite, en la mayoría de casos, reducirla o bien adoptar medidas preventivas para controlar su evolución. Una prevención efectiva depende de la identificación de los individuos con riesgo a desarrollar alguna enfermedad cardíaca. El uso de FRC permite predecir el riesgo global de los pacientes a sufrir accidentes cardiovasculares, determinar un diagnóstico y diseñar un tratamiento. Los FRC se dividen en dos grupos, modificables y no modificables (**Figura 2**).

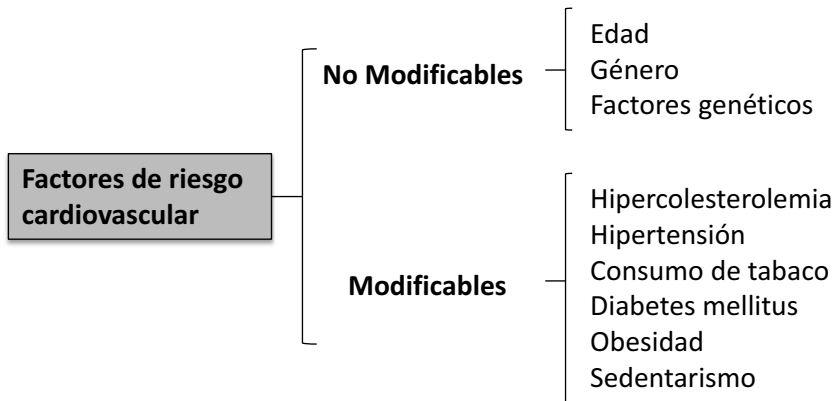


Figura 2. Principales factores de riesgo cardiovascular.

Además, varios estudios han demostrado que ciertos factores psicosociales, como la depresión, la ansiedad o el estrés, incrementan la incidencia de los FRC y el curso de la enfermedad coronaria [8, 9].

Los biomarcadores son herramientas analíticas que sirven para describir parámetros biológicos y son utilizados comúnmente para identificar individuos con alto riesgo patológico, diagnosticar enfermedades y tratar a los pacientes [10]. El uso de biomarcadores moleculares para predecir eventos cardiovasculares ya está siendo implementando en nuestro país. Actualmente se utilizan biomarcadores de inflamación, de disfunción endotelial, de activación neurohormonal y de isquemia [11].

El principal proceso patológico que da lugar a las ECVs es la aterosclerosis, una enfermedad sistémica que afecta a las arterias de todo el sistema vascular [12].

2. ATEROSCLEROSIS

La aterosclerosis es un proceso inflamatorio crónico que comienza a desarrollarse en edades tempranas de forma asintomática y avanza gradualmente durante la edad adulta [13]. Sus principales manifestaciones clínicas son la cardiopatía isquémica, el accidente cerebrovascular y la cardiopatía periférica, que se presentan en etapas avanzadas de la enfermedad.

La aterosclerosis se caracteriza por la acumulación de lípidos en la pared arterial, la disfunción endotelial y una alta actividad inflamatoria que conducen a la formación de la placa aterosclerótica.

2.1. Fisiopatología de la aterosclerosis

Durante los siglos XIX y XX, coexistieron dos hipótesis para explicar el origen y las causas que provocan la aparición y el desarrollo de la placa de ateroma. Por una parte, la teoría trombogénica, también llamada teoría de la incrustación de la aterosclerosis, fue formulada por Carl von Rokitansky en 1852 [14]. Esta hipótesis sugería que el engrosamiento de la pared arterial era provocado por una deposición de fibrina seguida por una reorganización mediada por fibroblastos y una acumulación lipídica. Por otra parte, los experimentos de Anitskchow [15] y Chalатов de 1913 [15] apuntaban a una teoría lipídica, donde la causa primaria de la aparición de lesiones ateroscleróticas era la acumulación de colesterol en las arterias.

Actualmente, la teoría más aceptada es la teoría de la respuesta a la lesión [13], que fue formulada por Russell Ross en 1973 y define la aterosclerosis como una enfermedad de tipo inflamatoria crónica originada por un daño endotelial provocado por la existencia de uno o varios FRC. La aterosclerosis se describe como un proceso patológico, caracterizado por la presencia de una placa de ateroma [16, 17]. Ésta afecta prácticamente a todos los territorios vasculares aunque mayoritariamente se desarrolla en las arterias de mediano (coronaria) y gran calibre (aorta, carótida e iliofemoral) [18, 19] (**Figura 3**).

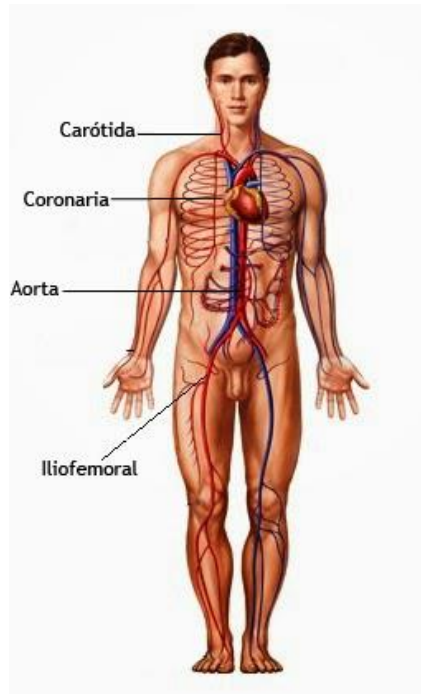


Figura 3. Principales territorios vasculares afectados por la aterosclerosis. Indicaciones de las arterias carótida, coronaria, aorta e iliofemoral, las cuales tienen mayor riesgo de desarrollar lesiones ateroscleróticas.

2.2. La pared arterial

El sistema vascular está formado por arterias, venas, arteriolas, vénulas y capilares que se diferencian entre sí por su tamaño, morfología y función. La pared vascular es un tejido flexible capaz de adaptarse a diferentes estímulos y está compuesta por tres capas concéntricas (**Figura 4**).

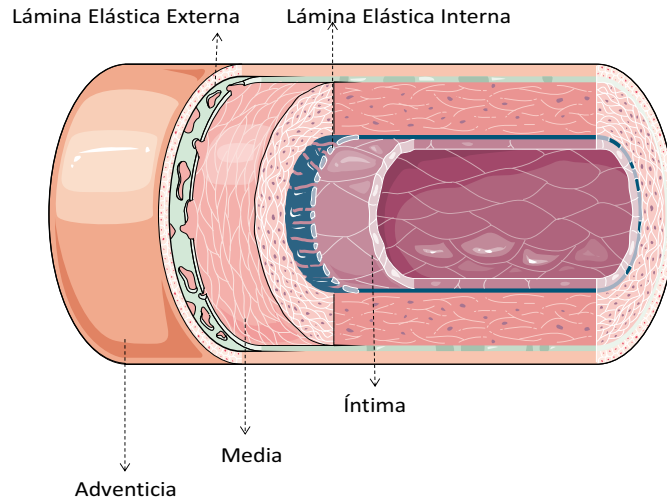


Figura 4. Representación de la estructura de la pared vascular.

La íntima: Es la capa más interna, consiste en una monocapa de células endoteliales (CEs) que recubren longitudinalmente la luz del vaso (endotelio) y regulan el intercambio molecular entre la sangre y la pared vascular. Las CEs se extienden sobre una membrana basal (subendotelio) compuesta principalmente por proteoglicanos y colágeno. La íntima está separada de la siguiente capa por la membrana elástica interna, compuesta de tejido conectivo.

La media: Es la capa intermedia. Esta capa es la encargada de regular el tono vascular. Puede contener diferente número de subcapas dependiendo del grosor del vaso. Los vasos más grandes están compuestos por células musculares lisas vasculares (CMLVs) y componentes de la matriz extracelular como colágeno y fibras elásticas. Los vasos de menor calibre, sin embargo, están formados por pericitos en lugar de CMLVs. En el proceso aterosclerótico, las CMLVs y los pericitos proliferan y migran hacia la íntima, provocando la formación de la cápsula fibrosa.

La adventicia: Es la capa más externa de la arteria y está separada de la capa media por la lámina elástica externa, compuesta también de tejido conectivo. El grosor de la adventicia depende del tipo de vaso y de su localización. Esta capa está formada por tejido conjuntivo, fibroblastos, fibras elásticas y fibras

de colágeno, y aporta estabilidad a la pared vascular, conectando el vaso con los tejidos circulantes [20].

En la adventicia discurre un sistema de microvasos denominado *vasa vasorum*, constituido por una red de pequeños vasos que pueden ser simplemente canales de CEs, pueden estar formados por una única capa de CMLVs o bien por múltiples capas de estas células. Su función es proporcionar nutrientes a las capas profundas de la pared vascular, especialmente a las arterias de gran tamaño, como la aorta o las arterias coronarias. Este sistema representa una reserva energética para el desarrollo de nuevos vasos de las arterias en la etapa adulta, proceso conocido como neovascularización. Esta red de microvasos está muy desarrollada en áreas donde se forman placas ateroscleróticas [21].

2.3. Desarrollo de la lesión aterosclerótica

2.3.1. Activación endotelial

El endotelio vascular es un órgano multifactorial que se encarga de llevar a cabo funciones críticas de la fisiología vascular y el mantenimiento de la homeostasis [22]. El endotelio, además de ser una barrera protectora natural entre la circulación sanguínea y el tejido del vaso, es el principal regulador de la función vascular, ya que es capaz de liberar numerosos factores vasoactivos en respuesta a diferentes estímulos, ya sean físicos (flujo sanguíneo, presión arterial), o químicos (producciones tisulares y celulares) [23]. La disfunción endotelial es el evento inicial de la aterosclerosis [13].

En condiciones normales, las CEs regulan la homeostasis del sistema vascular y contribuyen a la modulación del tono vasomotor mediante la regulación del intercambio molecular entre los compartimentos extra e intravascular. Esta regulación consiste en un equilibrio de producción y liberación de sustancias vasodilatadoras, como el óxido nítrico (NO) y la prostaglandina I₂ (PGI₂); y sustancias vasoconstrictoras, como la endotelina-1 (ET-1), el tromboxano A₂ (TXA₂) y la angiotensina (AngII). Además, las CEs son resistentes a la adhesión de leucocitos, a la activación y agregación plaquetaria, e inhiben la proliferación y el crecimiento de las CMLVs, la coagulación y la fibrinólisis.

En presencia de FRC como la hipertensión, la hipercolesterolemia, el tabaquismo, la diabetes o la obesidad; la función del endotelio se ve seriamente alterada, hecho que provoca su activación [24] (**Figura 5**). En respuesta a un daño mediado por estímulos pro-aterogénicos, se produce un desequilibrio de las funciones endoteliales que se refleja en un profundo cambio en su patrón de expresión génica. De esta manera, se produce un incremento de la permeabilidad del endotelio, lo que favorece la entrada de lipoproteínas de baja densidad (LDL) al espacio subendotelial, donde se unirán a proteoglicanos de la matriz extracelular [13]. Además, aumenta la agregación plaquetaria [25] y se induce la secreción de citoquinas y quimiocinas, como la proteína quimiotáctica de monocitos-1 (MCP-1), también conocida como CCL2 (Ligando 2 de quimiocinas con dominio C-C), que pertenece a una superfamilia de proteínas secretadas que participan en procesos de inmunoregulación y de inflamación. La quimiocina CCL2 es un miembro de la subfamilia de quimiocinas CC, caracterizadas por tener dos residuos de cisteína adyacentes. CCL2 muestra una actividad quimiotáctica para los monocitos y basófilos, pero no para otras células inflamatorias como los neutrófilos y los eosinófilos. Se ha descrito que CCL2 está implicada en la patogénesis de enfermedades caracterizadas por la infiltración de monocitos, como la aterosclerosis [26, 27]. El aumento de la permeabilidad del endotelio está ligado a la expresión de las moléculas de adhesión: selectinas E, L y P; molécula de adhesión plaqueta-célula endotelial-1 (PECAM-1), molécula de adhesión intercelular-1 (ICAM-1) y molécula de adhesión a células vasculares-1 (VCAM-1). Todas ellas favorecen la unión y la transmigración de monocitos circulantes al interior de la pared vascular [28, 29].

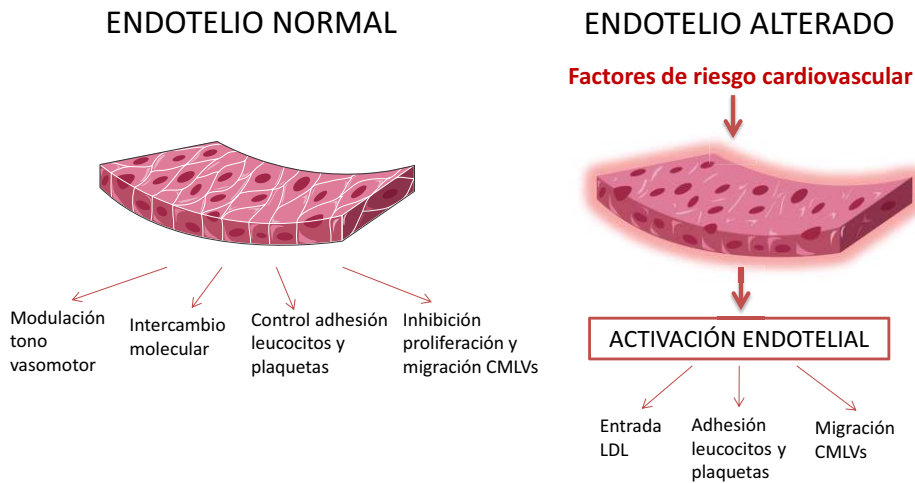


Figura 5. Funciones fisiológicas del endotelio vascular y efecto de los FRC sobre el endotelio.

2.3.2. Inicio de la lesión

Las LDL internalizadas en la pared vascular sufren diversas modificaciones (agregación, oxidación, glicosilación, etc.) que provocan el aumento de expresión de moléculas como el factor estimulador de colonias de macrófagos (M-CSF), CCL2, la interleucina 8 (IL-8) o el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) en las CE [30]. Algunas de estas moléculas, como CCL2, incrementan la adhesión y la quimioatracción de monocitos, intensificando su reclutamiento hacia el lugar de la lesión. La presencia de M-CSF contribuye a que los monocitos internalizados se diferencien a macrófagos, aumentando su expresión de receptores tipo *scavenger* que les permiten captar grandes cantidades de lípidos, transformándose así en células espumosas [31]. Una vez saturadas de lípidos, las células espumosas liberan numerosas sustancias que intensifican el efecto proinflamatorio y dañan el endotelio, el cual presenta cambios morfológicos e incluso puede quedar destruido en algunas zonas [32] (Figura 6A).

2.3.3. Progresión de la lesión

El daño endotelial persistente atrae plaquetas a la lesión vascular. Estas células, junto con la reacción inflamatoria y las CE activadas, liberan diversos factores de crecimiento, entre ellos el PDGF, el factor básico de crecimiento de fibroblastos (bFGF) y el factor de crecimiento transformante- β (TGF- β), que inducen la proliferación de las CMLVs de la capa media y su migración hacia la

capa íntima [32]. En el proceso de migración, las CMLVs producen también factores de crecimiento y proteínas de matriz, entre las que encontramos las metaloproteasas de matriz (MMP), que son críticas en el progreso de la aterosclerosis, ya que degradan la matriz y permiten el avance de las CMLVs (**Figura 6B**).

La sobresaturación de grasa en las células espumosas provoca su muerte por apoptosis, liberando los lípidos y sustancias proinflamatorias a la matriz extracelular [25]. Esta acumulación lipídica contribuye a la desestructuración total de la pared vascular. Después de varios ciclos de acumulación de macrófagos, migración y proliferación de CMLVs y de la formación de tejido fibroso, se produce el crecimiento y la reestructuración de la lesión. Como resultado, el núcleo lipídico queda rodeado por una cubierta fibrosa. Todo ello da lugar a la formación de una lesión vulnerable (**Figura 6C**).

2.3.4. Complicación de la lesión: ruptura de la placa aterosclerótica

Las células vasculares residentes y las células inflamatorias de la placa pueden secretar diversos factores proangiogénicos, entre los que se han descrito el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) o el bFGF, que favorecerían la formación de microvasos en la placa. Sin embargo, la regulación de este proceso de formación de microvasos intraplaca es todavía poco conocida. Ahora bien, se ha descrito que los microvasos contribuyen al crecimiento de la placa aterosclerótica, ya que, en primer lugar, suponen un contacto de la placa con la sangre, lo cual significa una continua fuente de células inflamatorias. En segundo lugar, la ruptura de pequeños vasos inestables puede dar lugar a hemorragias internas, que constituyen un estímulo para el avance de la enfermedad [33].

El riesgo de ruptura de una placa depende principalmente de su composición. Las placas estables presentan un contenido bajo en lípidos y cubiertas fibrosas gruesas que las hacen resistentes. Las placas vulnerables, en cambio, presentan cubiertas fibrosas delgadas, con baja presencia de CMLVs y con un elevado número de microvasos inestables y células inflamatorias. Durante la evolución de la placa puede existir calcificación debido a la presencia de moléculas fijadoras del calcio como las proteínas morfogénicas óseas o proteínas con residuos de ácido glutámico γ -carboxilo. Se ha descrito la presencia de depósitos de calcio [34] en placas inestables.

A medida que la lesión aterosclerótica progresa, la pared vascular incrementa su tamaño para compensar la reducción del lumen. Cuando la placa ocupa aproximadamente el 40% del área arterial, la compensación se detiene y cualquier crecimiento posterior disminuye el lumen arterial. Las principales complicaciones de la aterosclerosis provienen de la formación de un trombo oclusivo, el cual suele ocurrir tras la ruptura, fisión o erosión de la placa aterosclerótica [33]. La progresiva erosión y desestructuración del endotelio expone varios elementos subendoteliales, como el colágeno o el factor von Willebrand (vWF), al torrente sanguíneo. Así se estimula la activación y agregación plaquetaria, provocando la ruptura de la cubierta fibrosa. De esta manera, se expone el contenido del núcleo necrótico, rico en material trombogénico, a la sangre, lo que favorece la aparición de un trombo [13] (**Figura 6D**).

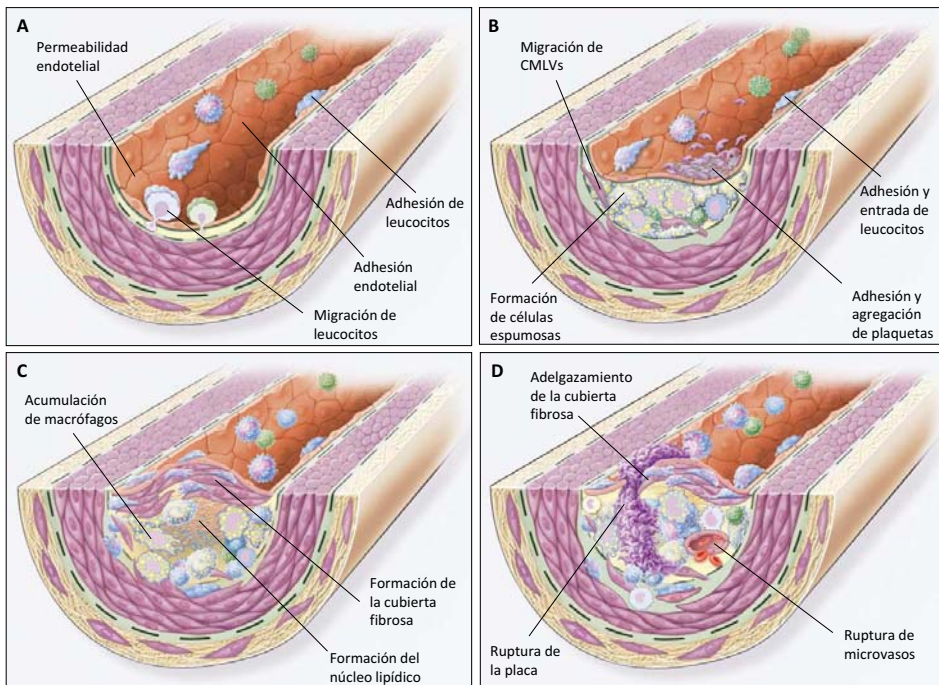


Figura 6. Desarrollo de la placa aterosclerótica. A) La disfunción endotelial provoca un aumento de la permeabilidad favoreciendo la entrada de LDL y aumentando la expresión de moléculas de adhesión que favorecen la fijación de leucocitos al endotelio. **B)** Las LDL internalizadas sufren modificaciones que favorecen el reclutamiento de más células inflamatorias, la diferenciación de monocitos a macrófagos y la internalización de grandes cantidades de lípidos por los macrófagos, dando lugar a células espumosas. Además, el daño endotelial persistente provoca la acumulación de plaquetas que, junto con las células inflamatorias y las CE, secretan factores de crecimiento que estimulan la migración de CMLVs. **C)** La proliferación y migración de CMLVs contribuye a la formación de la capa fibrosa. Las células espumosas, sobresaturadas de grasa,

mueren liberando depósitos lipídicos que inducen la formación del núcleo necrótico lipídico. D) La secreción de factores angiogénicos por las CEs, CMLVs y células inflamatorias conduce a la formación de microvasos que favorecen la inflamación en la placa, incrementando el tamaño de la lesión. Las MMP secretadas por CEs adelgazan la cubierta fibrosa, favoreciendo su ruptura. Así, se facilita la aparición de hemorragias intraplaca y la exposición del contenido trombogénico al lumen de la arteria, dando lugar a isquemia o necrosis (Adaptado de Ross, R., 1999 [13]).

2.4. Papel de la angiogénesis, el factor tisular y la inflamación en la placa aterosclerótica

Las causas que inducen que una placa aterosclerótica estable se transforme en vulnerable y susceptible de ruptura todavía se desconocen. Sin embargo, las investigaciones más recientes apuntan a que una elevada densidad de nuevos capilares sanguíneos intraplaca y la inflamación en la íntima de la pared vascular están asociadas al desarrollo de placas inestables en las lesiones arteriales, a hemorragias internas y a un elevado número de episodios trombóticos [35-37].

La angiogénesis es el proceso de formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de otros pre-existentes, como se explica más detalladamente en el apartado siguiente. La formación de neovasos requiere una regulación de moléculas pro- y anti-angiogénicas que no se conoce con exactitud.

Por otro lado, se ha demostrado que la trombogenicidad de una placa aterosclerótica está relacionada con niveles elevados de factor tisular (FT) [38]. El FT no se expresa de forma fisiológica en el endotelio del lumen arterial, ni en CMLVs, monocitos o macrófagos; sin embargo, diversos estímulos, entre ellos citoquinas, factores de crecimiento o aminas biogénicas, pueden inducir su expresión en dichas células [39]. Ahora bien, se ha descrito que el FT se expresa en los *vasa vasorum*, hecho que llevó a hipotetizar que esta red de microvasos representa una envoltura procoagulante para la eventualidad de la ruptura de un vaso [40, 41]. De hecho, se encuentra sobreexpresión de FT en la adventicia y en la íntima de vasos sanguíneos de lugares activamente angiogénicos [42], así como en placas ateroscleróticas avanzadas [43, 44] (**Figura 7**). Creemos, por lo tanto, que el FT juega un papel fundamental en la proliferación de los *vasa vasorum*, y que estos podrían jugar un papel clave para el desarrollo de la íntima de la placa. Es decir, la localización del FT en zonas altamente angiogénicas es compatible con su posible contribución al proceso angiogénico y, por ende, podría contribuir también en la inestabilidad

y vulnerabilidad de la placa de ateroma, incrementando así el riesgo de ruptura y de trombosis.

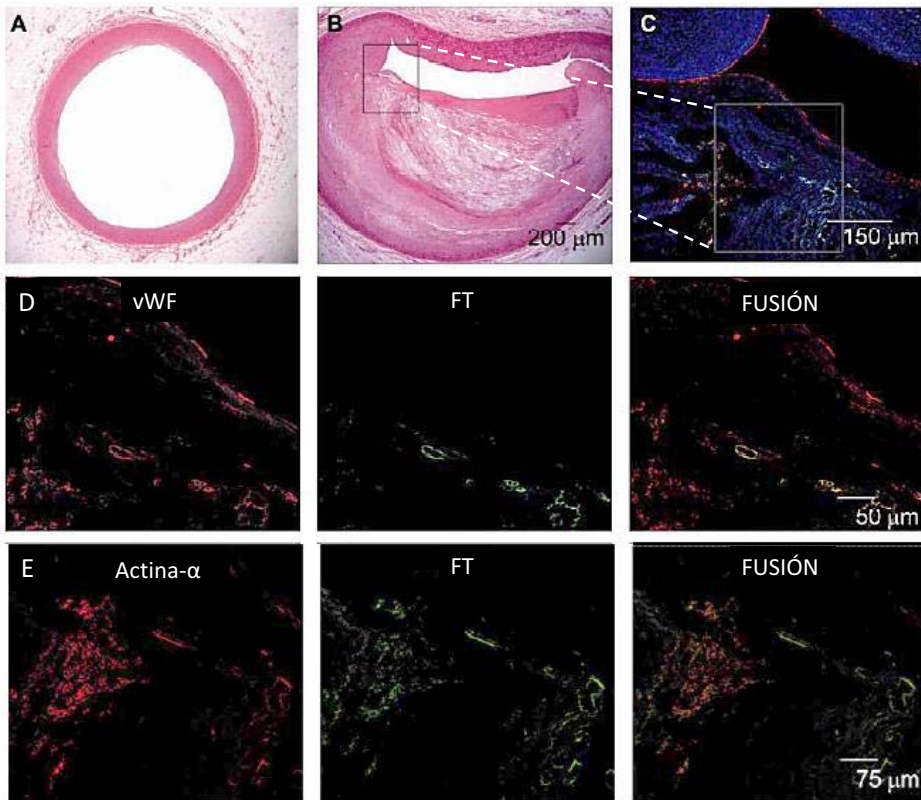


Figura 7. Estudio de inmunolocalización de angiogénesis y de FT en la placa aterosclerótica. Las placas ateroscleróticas avanzadas en arterias coronarias humanas muestran una extensa red de microvasos. **A)** Arteria coronaria humana normal. Presenta un grosor de la íntima sin alteraciones y no se observan indicios de neovascularización. **B)** Placa aterosclerótica avanzada en una arteria coronaria humana. **C)** Magnificación de B. Los microvasos pueden observarse mediante la tinción inmunofluorescente de vWF, que marca las CEs (rojo) y Hoescht 33342, que marca los núcleos de las células (azul). **D)** Doble inmunolocalización de FT (verde), expresado en los microvasos de las lesiones ateroscleróticas, co-localizando con las CEs (rojo). **E)** La expresión de FT también se encuentra en CMLVs, marcadas con actina- α (rojo), alrededor de las CEs que forman los vasos. Adaptado de Arderiu, G. *et al.*, 2011 [45].

Además, la angiogénesis que tiene lugar en la íntima arterial con placa es parte de la respuesta vascular para mantener el estado inflamatorio. En este sentido, la formación de nuevos vasos en la placa aterosclerótica resulta un proceso estrechamente relacionado con la inflamación que encontramos en la misma (**Figura 8**). Existen evidencias de que el inicio de la neovascularización en un ambiente de isquemia está relacionado con el reclutamiento y la activación de

monocitos y de macrófagos [46, 47]. Los monocitos pueden estimular la proliferación de las CEs, su migración y su organización en estructuras tubulares, todo ello a través de un proceso estrictamente regulado [48].

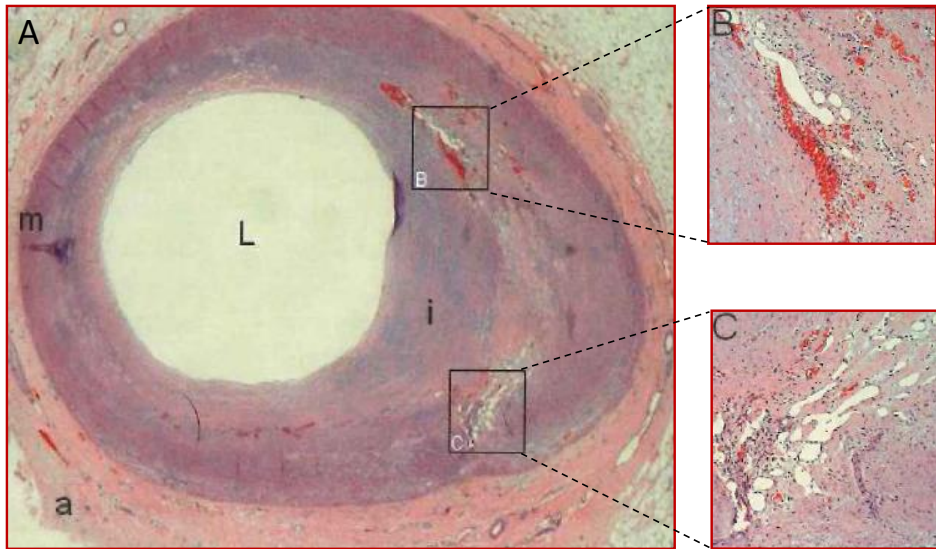


Figura 8. Estudio histológico sobre neovascularización de la placa aterosclerótica humana. A) Tinción de hematoxilina-eosina correspondiente a una arteria coronaria humana con una lesión aterosclerótica vulnerable. Se aprecian zonas de neovascularización y signos de hemorragias. A la derecha, ampliación de dos de estas áreas. **B y C)** Se pueden apreciar los neovasos intraplaca, la hemorragia presente y la concentración de células inflamatorias (núcleos azules) próximas a los vasos. a: adventicia, i: íntima, L: lumen, m: media. (Adaptado de Martínez-González, J. *et al.*, 2004 [21])

Los neovasos de la íntima de la pared vascular suelen localizarse en áreas ricas de células inflamatorias, que secretan factores de crecimiento estimuladores de la angiogénesis [49]. No obstante, no es únicamente en dichas zonas donde pueden encontrarse neovasos. Existen placas que muestran neovasos en zonas no inflamatorias, por lo que se cree que este proceso es inducido por distintos factores que son aún desconocidos. La neovascularización supone una vía de contacto directa con el torrente sanguíneo, por lo que favorece la internalización de células inflamatorias en la pared vascular. Independientemente de qué evento precede al otro, se produce un mecanismo de retroalimentación positiva en el que ambos componentes, el angiogénico y el inflamatorio, se favorecen mutuamente.

INTRODUCCIÓN

En definitiva, existe un consenso general sobre que la neovascularización en sí misma es una fuente de hemorragia intraplaca, por lo que podría ser causante de su inestabilidad [35-37].

3. NEOVASCULARIZACIÓN

Durante décadas, muchos investigadores se han interesado por la presencia de neovasos en la lesión aterosclerótica. Estos microvasos proceden de la densa red *vasa vasorum* presente en la adventicia y que se muestra muy desarrollada durante la aterosclerosis. La enfermedad vascular se presenta con un aumento del grosor de la pared, la proliferación del *vasa vasorum* y la neovascularización de la íntima arterial [26]. Diversos estudios apoyan la hipótesis de que esta expansión de vasos en las placas se debe a un mecanismo de compensación para aumentar la perfusión de la pared arterial cuando ésta aumenta su grosor [21]. Sin embargo, no todos los estudios reportan una correlación entre el tamaño de la placa y el nivel de formación de nuevos vasos. Esta controversia apunta a que los neovasos se sitúan principalmente en determinadas zonas de las lesiones, dependiendo de la composición de la placa (nivel de inflamación, densidad celular, concentración de factores de crecimiento y citoquinas, composición de la matriz extracelular).

La neovascularización incluye tres procesos: angiogénesis, arteriogénesis y vasculogénesis [26].

- **Angiogénesis:** es la formación de nuevos capilares sanguíneos a partir de vasos preexistentes. En la edad adulta, la mayoría de los vasos sanguíneos se encuentran en estado quiescente y la creación de nuevos vasos sólo tiene lugar en determinados procesos fisiológicos de forma regulada. Por ejemplo, en la cicatrización de heridas y en la reparación de tejido dañado, en el ciclo menstrual o en la formación de la placenta durante el embarazo. Sin embargo y dado que las CEs mantienen la capacidad de responder a diversos estímulos, la angiogénesis puede contribuir e incluso formar parte de diversos procesos patológicos, como el crecimiento tumoral, la metástasis o la evolución de la aterosclerosis.
- **Vasculogénesis:** se trata del crecimiento de nuevos vasos sanguíneos a partir de células madre o progenitoras. Este proceso sucede tanto en el embrión como en el individuo adulto [50]. La formación de nuevos vasos sanguíneos embrionarios se da gracias a células endoteliales progenitoras (EPCs) derivadas del mesodermo, conocidas como

angioblastos. Estas células se diferencian a endoteliales maduras y forman una vasculatura primitiva.

- **Arteriogénesis:** consiste en la progresión y expansión de vasos colaterales. Los vasos se ramifican creando una red de arterias y venas que consolidan el sistema circulatorio. Se cree que la arteriogénesis es un mecanismo de preservación de órganos cuando hay oclusión vascular.

3.1. Proceso de angiogénesis

El desarrollo de nueva vasculatura a través de CEs que se extienden desde vasos ya existentes resulta fundamental desde el desarrollo embrionario. El proceso de angiogénesis es complejo y requiere una regulación fina entre potenciadores e inhibidores, más conocidos como factores pro- y anti-angiogénicos, que actúan de forma coordinada (**Tabla 2**). Un cambio en el equilibrio de estos factores activa el proceso angiogénico [51].

Tabla 2. Algunos factores reguladores de la angiogénesis [51].

FACTORES PRO-ANGIOGÉNICOS		FACTORES ANTIANGIOGÉNICOS	
Nombre	Función biológica	Nombre	Función Biológica
VEGF	Favorece la permeabilidad, proliferación y migración de CEs y reduce la apoptosis.	Angiostatina	Reduce la proliferación y migración de CEs y favorece la apoptosis.
bFGF	Favorece la proliferación y migración de CEs y potencia los activadores del plasminógeno.	Endostatina	Reduce la proliferación y migración de CEs y favorece la apoptosis.
PDGF	Favorece la estabilización de los vasos.	Tumstatina	Reduce la proliferación de CEs.
LPA	Etimula los niveles de VEGF.	TSP1	Reduce la proliferación y migración de CEs y favorece su apoptosis.
EGF	Favorece la proliferación de las CEs y sobre regula VEGF y FGF.	PEDF	Reduce la proliferación y migración de CEs.

EGF: factor de crecimiento endotelial, LPA: Ácido lisofosfático, PEDF: Factor derivado de pigmento epitelial, TSP1: Trombospondina 1.

El factor desencadenante de la angiogénesis es, normalmente, una situación de hipoxia, aunque ésta suele estar acompañada de inflamación del tejido [52] y de estrés oxidativo [53]. También existen otros factores que favorecen este proceso, como el estrés por fricción (*shear stress*) [54]. Las CEs están

equipadas con sensores de oxígeno y factores de crecimiento, como el factor inducible de hipoxia-1 α (HIF-1 α), que responden a estos estímulos. En una primera fase, se produce una dilatación de capilares y vénulas quiescentes, a través de la expresión de varias citoquinas que aumentan la permeabilidad y activan las CEs. A continuación, se desencadena la degradación de la membrana basal por medio de la acción de diversas enzimas proteolíticas, las MMPs, así como la pérdida de unión celular. En una segunda fase, tiene lugar la migración de las CEs que invaden el tejido colindante y proliferan formando la estructura de los nuevos vasos capilares. El proceso finaliza con el reclutamiento de pericitos y CMLVs que ayudan a estabilizar los vasos formados, se establece la nueva membrana basal y la matriz extracelular, se estrechan las uniones celulares y se induce de nuevo la quiescencia de los vasos, permitiendo finalmente el paso del flujo sanguíneo [55-57] (**Figura 9**).

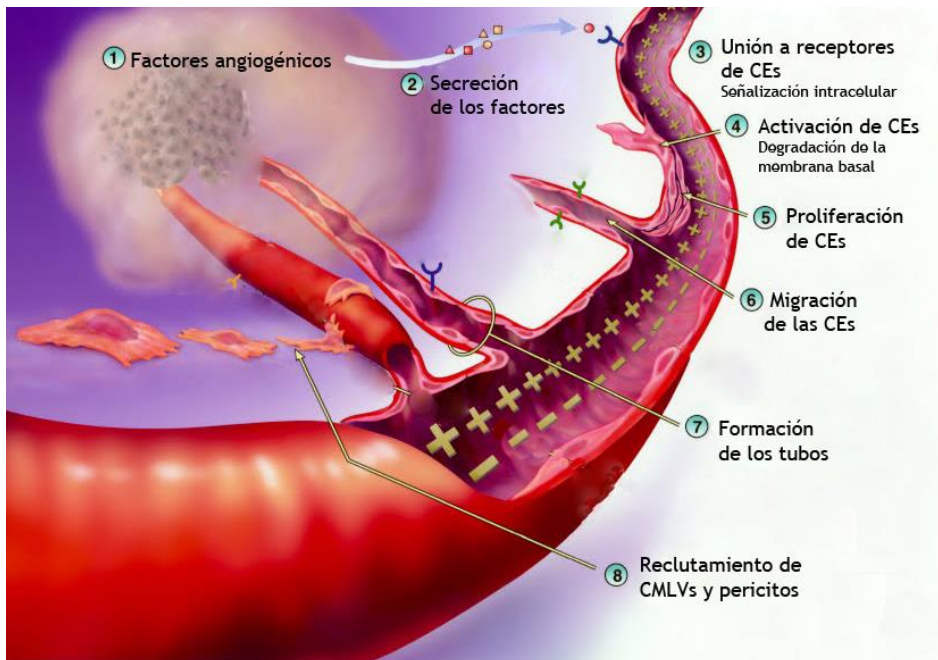


Figura 9. Etapas del proceso angiogénico. Adaptado de The Angiogenesis Foundation [58].

Los estudios terapéuticos en el campo de la angiogénesis se enfocan en dos sentidos aparentemente contradictorios. Por una parte, hay estudios que fomentan el desarrollo de la angiogénesis para garantizar el suministro de nutrientes y oxígeno a los órganos. También para fomentar una mejor recuperación y cicatrización de heridas, por ejemplo, en caso de infarto de

miocardio o de enfermedad cardiovascular periférica. Por otro lado, existen grupos que contemplan la inhibición de este proceso como una estrategia para evitar el desarrollo de ciertas enfermedades, tales como el crecimiento tumoral y la ruptura de la placa aterosclerótica [59, 60].

4. INFLAMACIÓN

La inflamación es la respuesta del sistema inmunitario frente a una alteración, como por ejemplo una infección o una lesión. Existen dos tipos de respuesta inflamatoria: la respuesta aguda o innata y la respuesta crónica o adaptativa. La infiltración de células inflamatorias en la pared vascular juega un papel clave en todas las etapas del desarrollo de la enfermedad aterosclerótica. La respuesta inflamatoria aguda consiste en una organización compleja de eventos a nivel vascular que incluyen la activación de las CEs, la interacción de los leucocitos con el endotelio vascular y la agregación de las plaquetas, entre otros eventos. Se trata de un proceso rápido, no específico, que ocurre durante las primeras horas después del daño y que provoca alteraciones tanto físicas como químicas de los vasos, provocando en consecuencia el aumento de la permeabilidad vascular. En el caso de persistencia del daño, la respuesta inflamatoria evoluciona hacia un estado crónico. La principal diferencia entre la respuesta crónica y la respuesta aguda es la naturaleza de las células inflamatorias que aparecen en los tejidos dañados. Los neutrófilos son los primeros en llegar a la zona de lesión y son característicos de la respuesta aguda, mientras que la respuesta crónica incluye la presencia de monocitos y linfocitos. Aunque se han detectado linfocitos B y T, neutrófilos, mastocitos, células dendríticas, monocitos y macrófagos en la placa, éstos dos últimos tienen la función protagonista [61].

4.1 Monocitos en la placa aterosclerótica

Durante la aterosclerosis, los monocitos circulantes se adhieren a la íntima de la pared arterial y la atraviesan. Una vez allí, se diferencian a varios tipos celulares, como células dendríticas o macrófagos. Los monocitos constituyen una población heterogénea y pueden ser divididos según sus características fenotípicas y funcionales [62].

4.1.1 Heterogeneidad monocitaria

Las subpoblaciones de monocitos difieren en tamaño, granulosidad, morfología nuclear y fenotipo. Estudios en modelos murinos han permitido identificar dos poblaciones en base a la expresión de Gr1/Ly6C (epítipo Ly6C del antígeno de diferenciación mieloide Gr1). En este sentido, los monocitos Gr1⁺/Ly6C^{high} se consideran inflamatorios y dan lugar a macrófagos y células

dendríticas en presencia de infecciones, mientras que la población Gr1⁻/Ly6C^{low} se consideran monocitos residentes o *patrolling* y suelen encontrarse en la luz del endotelio microvascular en condiciones homeostáticas o inflamatorias. Se ha observado que los monocitos Gr1⁺/Ly6C^{high} pueden transformarse en Gr1⁻/Ly6C^{low} en modelos animales [63, 64].

En humanos, se ha propuesto que existen poblaciones de monocitos análogas a la de los ratones. En este caso, se diferencian tres poblaciones, basadas en la intensidad de expresión del receptor de lipopolisacáridos (LPS), CD14, y el receptor de FcγIII, CD16. Así pues, la población CD14⁺⁺CD16⁻, que es conocida como “clásica”, representa el 85% del total de monocitos y correspondería a la población Gr1⁺/Ly6C^{high} del ratón. Por otro lado, la población CD14⁺CD16⁺⁺ es conocida como “no-clásica” y representa el 10% de toda la fracción monocitaria. Esta población es análoga a la Gr1⁻/Ly6C^{low} en modelos murinos. Finalmente, existe una población CD14⁺⁺CD16⁺, llamada “intermedia”, que corresponde al 5% del total de monocitos. Todas estas poblaciones se caracterizan por la expresión de determinados receptores de membrana que permiten diferenciarlas [61, 65]. La **Tabla 3** recoge un conjunto de estos marcadores.

Tabla 3. Patrones de expresión de marcadores diferenciales en subpoblaciones monocitarias murinas y humanas (Adaptado de Hristov, M. and Heine, G.H., 2014 [63]).

POBLACIÓN DE MONOCITOS	MARCADORES
Ratón	
Gr1⁺/Ly6C^{high}	CCR1, CCR2, CCR5, IL-8Rβ, L-selectina, PSGL-1
Gr1⁻/Ly6C^{low}	CX3CR1, CCR5, LFA-1, CD11c, SR-A, CD36
Humano	
CD14⁺⁺CD16⁻ (clásica)	CCR2, FcγRI, L-selectina, PSGL-1, IL-6R, SR-A, CD36
CD14⁺⁺CD16⁺ (intermedia)	CCR5, CD163, TLR4, HLA-DR, CD105, Tie-2, VEGFR1, VEGFR2
CD14⁺CD16⁺⁺ (no-clásica)	CX3CR1, CD49d, sialoforina, SLAN

CCR1, 2, 5: Receptor 1, 2, 5 de quimiocinas con dominio C-C, IL-8Rβ: Receptor β de interleucina 8, PSGL-1: Ligando de glicoproteína P-selectina-1, CX3CR1: Receptor 1 de quimiocina con dominio CX3C, LFA-1: antígeno asociado a función linfocitaria-1, SR-A: Receptor scavenger tipo A, IL-6R: receptor de interleucina 6, TLR4: Receptor 4 Toll-like, VEGFR½: Receptor ½ VEGF, SLAN: 6-Sulfo-LacNAc, modificación de PSGL-1.

Principalmente, los monocitos CD14⁺⁺CD16⁻ son fagocíticos, internalizan LDL y secretan citoquinas en respuesta a LPS. Por el contrario, los monocitos CD14⁺CD16⁺⁺ son poco fagocíticos, sin embargo, secretan citoquinas inflamatorias como el factor de necrosis tumoral α (TNF α) o la interleucina 1 β (IL-1 β), tras una activación dependiente del receptor *Toll-like*. Los monocitos CD14⁺CD16⁺⁺ son también células patrulla o *patrolling*, que eliminan células infectadas o dañadas y detoxifican LDL oxidadas (oxLDL). Finalmente, la población CD14⁺⁺CD16⁺ genera una fuerte secreción de TNF α y IL-1 β en respuesta a LPS [63]. En general, se ha observado que los monocitos de las poblaciones CD16⁺ son grandes productores de CCL2, expresan el receptor 1 de quimiocina con dominio CX3C (CX3CR1) y presentan bajos niveles del receptor 2 de quimiocinas C-C (CCR2). Por el contrario, la población CD16⁻ expresa altos niveles de CCR2 pero poca CCL2 [66]. Ambas poblaciones utilizan diferentes mecanismos para ser reclutados por las CEs [67, 68] y presentan cinéticas de migración particulares. En este sentido, se ha observado que la población CD16⁺ se adhiere con más facilidad al endotelio que la población CD16⁻ [69]. Además, dado que los patrones de expresión de los monocitos CD16⁺ recuerdan a los que típicamente se encuentran en macrófagos, se ha sugerido que esta población es más madura que la población CD16⁻ [70].

Por lo tanto, los monocitos parecen participar en la formación de vasos con una regulación en forma paracrina, aunque todo apunta a que la contribución en estos procesos es específica de cada población. Estudios clínicos han demostrado que pacientes con enfermedad arterial coronaria o infarto de miocardio presentan altos niveles de monocitos CD16⁺ [71, 72]. Además, los niveles de CD14⁺CD16⁺⁺ se presentan reducidos en individuos sanos, en comparación con individuos que presentan lesiones vasculares y los CD14⁺⁺CD16⁺ presentan un perfil de expresión muy ligado a angiogénesis y remodelamiento tisular [73], con altos niveles de TGF- β 1 y CD105 (endoglina), entre otros marcadores de angiogénesis. Este hecho, sumado a su capacidad para secretar citoquinas inflamatorias, ha llevado a muchos grupos de investigación a considerar la implicación de la población CD16⁺ en la arteriogénesis y en la angiogénesis intraplaca [26].

4.1.2. Monocitos con fenotipo endotelial

Varios estudios han identificado la presencia de células endoteliales progenitoras (EPCs) circulantes en diferentes estados de maduración en el individuo adulto. La presencia de estas células es clave para entender la angiogénesis [74, 75]. Recientemente, se ha descrito que ratones con isquemia periférica poseen el potencial de incorporar poblaciones de monocitos en el endotelio de vasos sanguíneos y transdiferenciarlos a CEs [76]. La heterogeneidad de las poblaciones de monocitos refleja la gran plasticidad que poseen para responder a las señales de su ambiente [77]. Los monocitos pueden expresar marcadores endoteliales como vWF, cadherina vascular endotelial (VE-Cadherina) o Sintasa Endotelial de Óxido Nítrico (eNOS), y son capaces de formar estructuras tubulares *in vitro* [78] e *in vivo* [79] desde la primera semana de cultivo [74], en respuesta a una combinación de factores angiogénicos, dando lugar a células con fenotipo endotelial, llamadas células parecidas a endoteliales o *Endothelial-like cells* (ELCs). Estos estudios sugieren que existe una relación muy estrecha entre monocitos y CEs y señalan que las poblaciones monocitarias pueden ser reclutadas para estimular la neovascularización [80].

5. FACTOR TISULAR

El factor tisular (FT) es clásicamente conocido como tromboplastina, aunque se le ha llamado también factor III de la coagulación (F3) y antígeno CD142. Se trata de una glicoproteína de transmembrana de 47 kDa, considerada el principal activador de la cascada de coagulación. El FT no solamente participa en los procesos de coagulación sino que además es esencial en procesos de señalización intracelular, migración celular, inflamación y angiogénesis [81]. A pesar de que el FT tiene una función fisiológica y su expresión es esencial durante el desarrollo embrionario, la cicatrización de heridas y la supervivencia celular; se ha descrito que el FT contribuye a la progresión de algunas patologías como el cáncer, la diabetes o las ECVs [82]. En relación a las enfermedades del sistema cardiovascular, cada vez se presta más atención a la desregulación de la expresión y de la actividad procoagulante del FT, ya que se han asociado alteraciones en su funcionalidad con la aterosclerosis o la dislipemia, entre otras patologías [38].

5.1. El factor tisular y la cascada de coagulación

En términos generales, el FT inicia la vía extrínseca de la coagulación por medio de la unión y la activación al Factor VII (FVII). El FT y el FVII activado (FVIIa) forman un complejo binario que activa los factores IX (FIXa) y X (FXa). El FXa actúa como una molécula que converge la señal extrínseca (vía FVIIa) y la señal intrínseca (vía FIXa) de la coagulación y permite la conversión de protrombina (o factor II) en trombina (FIIa). Esta reacción se ve favorecida tras la activación de dos cofactores no enzimáticos, el V y el VIII (Va y VIIIa), que permiten al FXa catalizar la formación de trombina de forma 10^5 veces más eficiente, resultando en una transformación más eficaz del fibrinógeno a fibrina. La fibrina, finalmente, polimeriza y retiene eritrocitos y leucocitos, generándose el trombo [34, 83] (**Figura 10**).

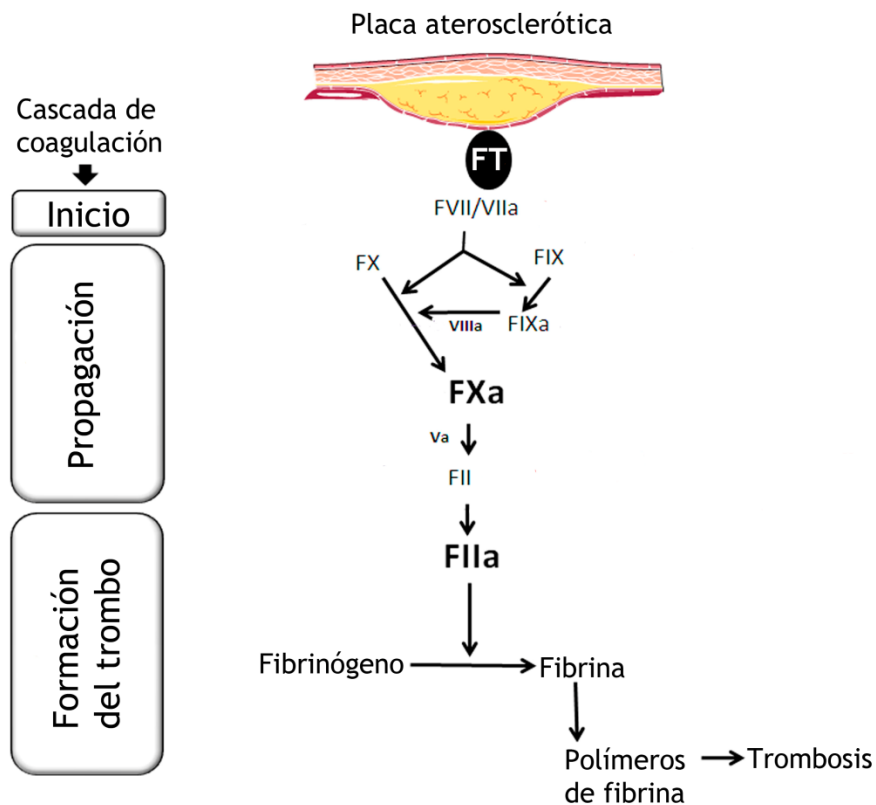


Figura 10. Cascada de coagulación desencadenada por FT. Monocitos, CE y CMLVs de la placa aterosclerótica expresan FT, capaz de desencadenar la cascada de coagulación mediante la formación de un complejo proteico junto con el FVIIa y la activación del FIX (FIXa). Así, se activa el FX (FXa), que gracias a sus cofactores Va y VIIIa, activa la trombina (FIIa) y, consecuentemente, la fibrina, formadora de polímeros que facilitan la aparición de un trombo. Adaptado de Badimon, L. *et al.*, 2009 [34].

5.2. Estructura del factor tisular

El FT es una glicoproteína de 263 aminoácidos, compuesta por tres dominios: un dominio extracelular representando la parte NH₂-terminal de la molécula, que contiene los 219 primeros residuos. El siguiente dominio estructural del FT es un dominio transmembrana de 23 aminoácidos que une la molécula a la membrana celular. Finalmente, el tercer dominio es el citoplasmático, que está formado por 21 aminoácidos y constituye la parte carboxiterminal [84] de la molécula. Tanto el dominio extracelular como el transmembrana ejercen una función en el proceso de coagulación, bien porque permiten el acoplamiento del FT a la membrana celular (dominio transmembrana), o bien porque

permiten la unión del FT al FVII (dominio extracelular), formándose el complejo FT-FVIIa mediante el cual el FT desarrolla su máxima actividad procoagulante [85, 86]. El dominio citoplasmático del FT, por su parte, tiene un papel relevante en la transducción de señalización celular [87].

Se han identificado diferentes formas del FT: el FT de longitud completa o *full length tissue factor* (fITF), que suele encontrarse acoplado a la membrana celular, y el FT truncado o *alternatively spliced tissue factor* (asTF) [88], carente de dominio citoplasmático y transmembranaral, que se presenta en forma soluble en la circulación (**Figura 11**). Además, se han detectado formas del fITF y del asTF asociadas a micropartículas presentes en el torrente sanguíneo (FT⁺-MPs) [89, 90]. Al conjunto del FT circulante se le llama FT de la sangre o *blood-borne TF* y, debido a que posee una mayor capacidad procoagulante que el FT de la superficie celular, ha sido objeto de estudio de varios grupos de investigación en los últimos años [91, 92].

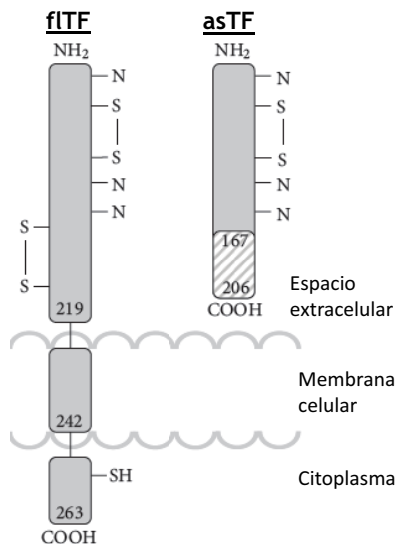


Figura 11. Variantes de la estructura del FT. Adaptado de Butenas, S. *et al.*, 2007 [93].

Así pues, según la forma en la que se presenta el FT, se le atribuyen diferentes funciones. El fITF se encarga principalmente de desencadenar la cascada de la coagulación, aunque se le ha reconocido una participación en procesos de

señalización celular. El fITF puede unirse a integrinas expresadas en la superficie celular aunque no actúan como receptores de éste. También puede formar un complejo proteico junto con el FVIIa que, de manera dependiente o independiente del receptor activado por proteasas 2 (PAR2), puede inducir la expresión de determinados factores pro-angiogénicos [45, 94].

El asTF desarrolla un papel clave en la supervivencia celular, en la proliferación celular y en la angiogénesis, sin embargo, su actividad procoagulante es reducida [95]. Debido a su solubilidad, es capaz de acumularse en la matriz extracelular e interactuar con las integrinas $\alpha_v\beta_3$ y $\alpha_6\beta_1$ [96, 97]. El asTF está presente en la circulación y en los tejidos, en concentraciones de alrededor de 1nM [98].

El FT presente en micropartículas (FT⁺-MPs) se ha encontrado en la sangre, en la orina y en la saliva. Las FT⁺-MPs derivan principalmente de plaquetas, aunque también de otros tipos celulares como las CEs y los monocitos, y desarrollan un papel en la homeostasis [99]. Además, se han asociado alteraciones de los niveles de FT⁺-MPs con algunas enfermedades, por ejemplo, pacientes de síndrome coronario agudo presentan concentraciones más elevadas de FT⁺-MPs que los individuos sanos. También se han observado altos niveles de FT⁺-MPs en pacientes con cáncer, diabetes mellitus, hipertensión y trombo-embolismo venoso [100, 101]. Por esta razón, se ha planteado utilizar los niveles de FT⁺-MPs como un marcador de enfermedades como las que se acaban de comentar. Aleman *et al.* [101] defiende que las FT⁺-MPs derivadas de monocitos incrementan en condiciones patológicas y pueden iniciar la generación de trombina y fibrina, de manera que el riesgo trombotico está influenciado por la concentración de micropartículas. Sin embargo, hay estudios que contradicen esta correlación entre la cantidad de FT⁺-MPs y la actividad procoagulante [102-104].

5.2.1. Proceso de *splicing*

Dependiendo del proceso de transcripción, el FT puede presentarse en dos isoformas distintas, como se ha comentado anteriormente, el fITF y el asTF. A partir de un proceso de *splicing*, un pre-ARNm primario da lugar a fITF. Sin embargo, en determinadas ocasiones se produce un *splicing* alternativo que provoca la exclusión del exón 5 del transcrito génico del FT. Esta exclusión produce un cambio del marco de lectura y da lugar a la isoforma de asTF [105].

A partir del *splicing* del transcrito primario del FT se produce, además de las dos isoformas funcionales de FT, la expresión de diversas variantes de ARNm que no codifican para ninguna proteína. En este sentido, la variante más conocida es el FT-A, detectada en múltiples pacientes de cáncer [106, 107], cuya función aún no ha sido esclarecida.

5.2.2. Modificaciones post-traduccionales

Una vez se ha sintetizado el FT, se somete a una serie de modificaciones post-traduccionales que cambian algunos aspectos de su estructura y función. Las modificaciones más comunes son la fosforilación, la S-palmitoilación, la N-glicosilación y la S-nitrosilación (**Figura 12**).

- **Fosforilación:** El FT tiene tres lugares de fosforilación en la cola citoplasmática: Ser²⁵³, Ser²⁵⁸ y Ser²⁶³, que permiten regular la actividad del FT en la señalización celular, migración y angiogénesis [108] además de su incorporación a las micropartículas [109].
- **Glicosilación:** La estructura del FT presenta cuatro lugares de N-glicosilación: Asn¹¹, Asn¹²⁴ y Asn¹³⁷ en el dominio extracelular, y Asn²⁶¹ en el citoplasmático. La importancia de la glicosilación del FT aún no está totalmente definida, aunque los últimos estudios señalan que su actividad procoagulante puede verse modulada por N-glicosilos [110, 111].
- **Palmitoilación:** El FT solamente contiene un residuo de cisteína en el dominio citoplasmático: Cys²⁴⁵ [112]. No existen datos suficientes sobre cómo afecta la S-palmitoilación sobre la función del FT, sin embargo, resultados obtenidos hasta el momento señalan que cuando se inhibe la palmitoilación, aumenta la fosforilación de la Ser²⁵⁸, ya que la palmitoilación promueve la interacción entre el FT y las caveolinas contenidas en las balsas lipídicas (*lipid rafts*), inhibiéndose así la proteína quinasa C (PKC) responsable de la fosforilación de FT [113].
- **Nitrosilación:** El FT tiene dos parejas de cisteínas en el dominio extracelular entre las que se forman puentes disulfuro: Cys⁴⁹-Cys⁵⁷ y Cys¹⁸⁶-Cys²⁰⁹. La primera pareja se encarga de conectar dos hojas β (*β -sheets*) con el dominio N-terminal, la segunda estabiliza el FT en la superficie celular y conecta el C-terminal con el dominio transmembrana. La mutación de estas cisteínas provoca una reducción de la actividad procoagulante del FT [114].

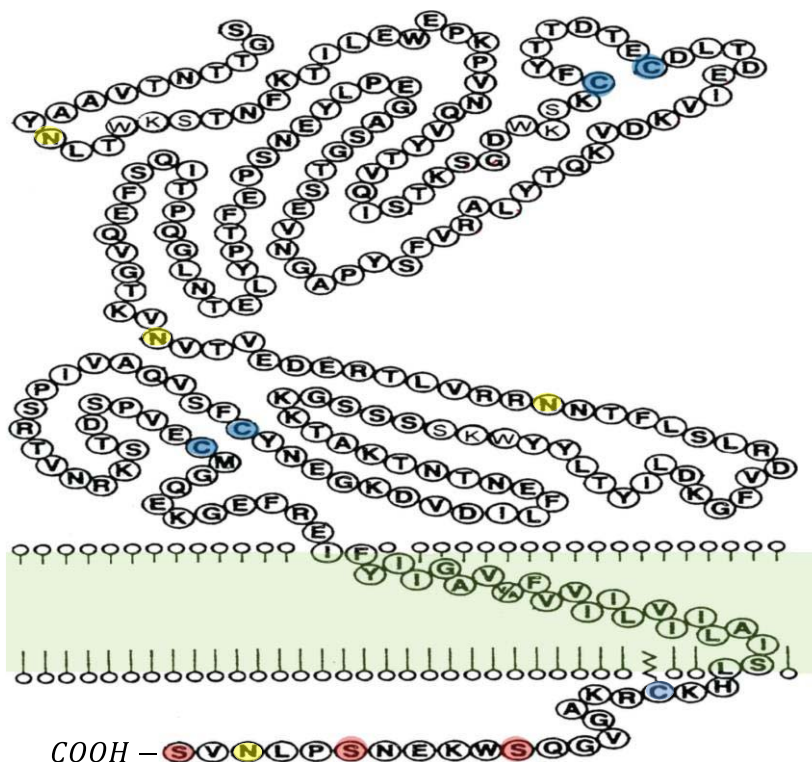


Figura 12. Estructura del FT. En azul, los residuos de Cys; en rojo, los de Ser y en amarillo los de Asn; esenciales para las modificaciones post-traduccionales. Adaptado de Chu A.J., 2011 [115].

5.3. Moduladores de la expresión y la actividad del factor tisular

Varios grupos de investigación han demostrado que el FT se mantiene inactivo en la superficie celular hasta que se activa a través de un estímulo. Recientemente, este FT inactivo, que representa la mayor parte de todo el FT expresado por las células, se ha denominado FT encriptado. La forma activa, que representa el 20%, se la conoce como FT desencriptado.

La forma encriptada del FT se compone por dos dominios de inmunoglobulina en la parte extracelular, que consisten en dos hojas β (β sheets) antiparalelas, cada una formando un puente disulfuro [116]. La reducción del puente disulfuro Cys¹⁸⁶-Cys²⁰⁹, que es el más próximo a la membrana, crea un giro de horquilla β (β -hairpin) adyacente al lugar en el que el dominio extracelular se convierte en transmembrana, provocando la activación del FT [117] (**Figura 13**).

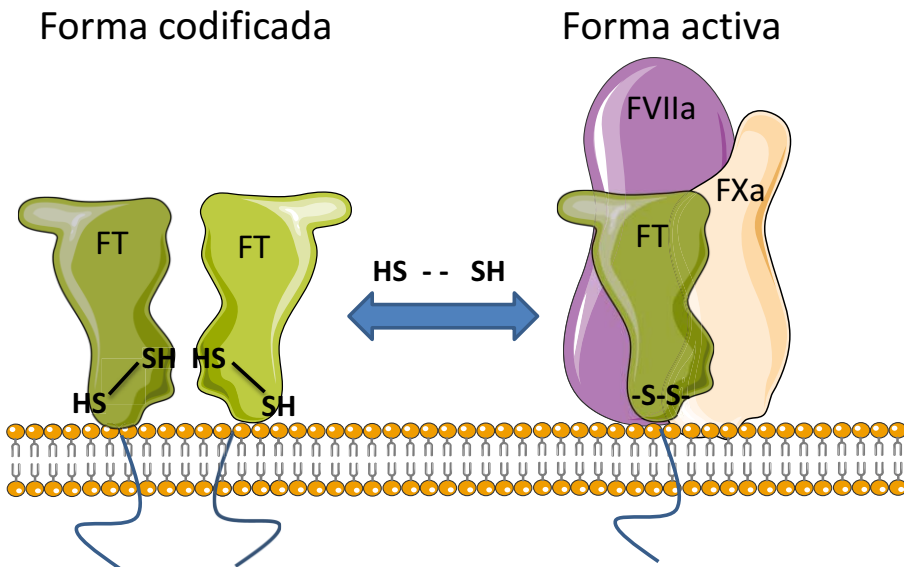


Figura 13. Activación del FT por medio de puentes disulfuro. La descriptación del FT puede implicar la reducción de un puente disulfuro que une dos dominios extracelulares. El FT activo se une al FVIIa y forma un complejo que activa el FXa, con alta actividad coagulante. Adaptado de Monroe, M. and Key, N.S., 2007 [116].

Diversos estudios han analizado los mecanismos que desencadenan la descriptación del FT. Algunos de los estimuladores son fisiopatológicos, entre ellos el LPS, la trombina, algunas citoquinas y estímulos apoptóticos. Otros son factores que alteran la integridad de la membrana plasmática, modificando la asimetría fosfolipídica e incrementando la exposición de carga negativa. Dentro de este grupo encontramos los detergentes no iónicos, ionóforos del calcio o ciclos de congelación y descongelación [118, 119].

La membrana plasmática contiene fosfatidilserina (PS) de forma asimétrica, mientras que es abundante en la capa interna, la capa externa presenta poca cantidad. Esta asimetría se mantiene mediante enzimas translocasas [120] pero puede verse alterada por varios estímulos. La presencia de fosfolípidos aniónicos como PS permite la activación del FT.

Un conocido modulador de la actividad procoagulante del FT es la proteína disulfuro isomerasa (PDI) que facilita la reducción del puente disulfuro Cys¹⁸⁶-Cys²⁰⁹, provocando la encriptación del FT. Además, se ha observado que la inhibición de PDI aumenta la exposición de PS en la membrana [121].

Otro modulador de la actividad del FT es el inhibidor de las vías de señalización del FT (TFPI). Éste se encarga de regular la vía de coagulación extrínseca mediante la formación de un complejo binario con el FXa y, por consiguiente, un complejo cuaternario con el FT y el FVIIa, inhibiendo su actividad [122]. El TFPI se encuentra en circulación, en concentraciones de entre 1 y 5 nM [123] y suele ser producido por CEs microvasculares (CEm) y por CMLVs, aunque también lo producen los monocitos, plaquetas, megacariocitos, linfocitos T y macrófagos.

Hay que destacar que, recientemente, se han descrito microARNs (miRs) que están involucrados en la regulación del FT. Los miRs, o miRNAs, son una familia de ARNs de cadena simple no codificante, de alrededor de 21 y 24 nucleótidos, que ejercen un papel esencial en la regulación post-traducciona. Resultados obtenidos por Teruel *et al.* [124] apuntaron que el ARNm del FT contiene dianas conservadas del miR-20a *in silico* y demostraron que este miR-20a puede inhibir de forma directa la expresión de FT *in vivo*. El grupo de Zhang [125] demostró que el miR-19 provoca una reducción de FT en modelos celulares de cáncer de mama, MDA-MB-231. Chuang *et al.* [126] encontró que los miR-93 y miR-106b regulan la expresión de FT en CMLVs y en células de leiomiomasarcoma. También se ha determinado que la inhibición selectiva de los miR-19a o miR-126 induce la expresión de las dos isoformas, FITF y aTF, en CEs bajo condiciones normales e inflamatorias [127].

Un elevado número de patologías asociadas a la expresión y regulación del FT presentan alteraciones en el equilibrio hemostático basal [124]. Por este motivo, es esencial tener un conocimiento preciso sobre las vías de señalización del FT y sus posibles moduladores.

Tabla 4. Algunos estimuladores, activadores e inhibidores del FT (Adaptado de Chu, A.J., 2011 [115]).

Estimuladores de expresión de FT					
Lesión vascular	PDI				
Inflamación	LPS	Interleucinas	TNF α	CRP	<i>C. pneumoniae</i>
Otros	VEGF	EGF	bFGF	agLDL	oxLDL
	AA	Ang II	Plasmina	IFN	MCP-1/CCL2
	ICAM	P-selectina	PDGF	Homocisteína	Hipoxia
	Leptina	Histamina	Nicotina	Estrógenos	Serotonina
Activadores del FT					
Quinasas de señalización intracelular	PKC		ERK (MAPK)	p38 (MAPK)	
Factores de transcripción	AP-1		NF- κ B	Erg-1	
Ionóforos del calcio	A23187				
Inhibidores de FT					
Inhibidores COX	Lisofosfatidilcolina	Insulina	Nicotinamina	Óxido nítrico	Hidroxiurea
Etil piruvato	DMSO	Adiponectina	Ácido retinoico	Vitamina D3	Agonistas de PPAR α
Derivados del resveratrol	Derivados fenólicos	Indobufeno	Ácido trans-retinoico	Paclitaxel	miR-19

AA: ácido araquidónico, agLDL: LDL agregadas, AP-1: proteína activadora-1, COX: ciclooxigenasa, CRP: proteína C reactiva, DMSO: dimetilsulfóxido, ERK: quinasa regulada por señal extracelular, IFN: interferón, MAPK: proteína quinasa activada por mitógeno, NF- κ B: Factor nuclear- κ B, PPAR α : Receptor α activado de proliferador de peroxisoma.

5.4. Distribución del factor tisular

El FT se expresa constitutivamente en varios tipos celulares incluyendo fibroblastos, pericitos y células epiteliales. Las células en contacto con el torrente sanguíneo, como monocitos, macrófagos, neutrófilos, CE y CMLVs, entre otras, no expresan FT en condiciones fisiológicas, sin embargo, su expresión puede verse inducida en respuesta a varios estímulos, entre ellos factores de crecimiento y aminos biogénicas [39]. Los mecanismos que desencadenan la expresión de FT pueden ser diferentes dependiendo del tipo celular y de la forma del FT (fITF o asTF).

5.4.1. Tejidos extravasculares

El FT no tiene una distribución uniforme. Edginton *et al.* [128] fue el primero en utilizar anticuerpos monoclonales contra el FT humano para localizarlo inmunohistoquímicamente. Estudios posteriores han encontrado niveles elevados de FT en el cerebro, los pulmones y la placenta, que son órganos muy vascularizados. Se ha observado que su expresión es intermedia en intestinos, corazón, riñones, testículos y útero, y que en el bazo, timo e hígado se expresa en poca cantidad [129]. Alrededor de los vasos sanguíneos, el FT se localiza en la epidermis, el epitelio mucoso, las células estromales subyacentes de la piel y la mucosa interna. En general, la distribución del FT es consecuente con su función señalizadora y homeostática [128].

5.4.2. Plaquetas

Las plaquetas son capaces de expresar FT ya que se ha observado que las plaquetas adheridas a leucocitos presentan actividad procoagulante de FT después de ser estimuladas con colágeno [130]. Además, la estimulación de plaquetas con colágeno o trombina puede inducir la expresión de FT en su superficie [130, 131]. Estos estudios defienden que cuando las plaquetas son activadas, comienzan a expresar pre-ARNm. Después, un proceso de *splicing* transforma este precursor en una cadena madura de ARNm y tiene lugar la síntesis de FT [132].

Sin embargo, la síntesis de FT en plaquetas todavía no está aceptada. Hay autores que apoyan la idea de que las plaquetas captan el FT de los monocitos. En este sentido, algunos estudios estimularon plaquetas con LPS, con LPS + forbol 12-mistirato 13-acetato (PMA), agonista del receptor de trombina (TRA), y con TRA + LPS, sin encontrar evidencias de FT [133, 134]. Los análisis de citometría de flujo de plaquetas activadas de humano y de ratón tampoco mostraron la presencia de FT [135]. Varios estudios han demostrado que los monocitos transfieren el FT a las plaquetas a través de la interacción de CD15 con P-selectina, expresado en plaquetas, y mediante el FT, que actúa como molécula adhesiva [136-138].

5.4.3. Monocitos

Los monocitos pueden sintetizar FT [139]. Alrededor del 1-2% del total de monocitos posee FT encriptado [140], que se activa en respuesta a algún estímulo. Los estudios de Butenas *et al.* [141] no detectaron antígeno de FT en monocitos en estado quiescente y las investigaciones de Osterud y Bjorklid [129] encontraron que solamente el 1,5% de los monocitos circulantes expresaban esta molécula en pacientes sanos; sin embargo, cuando estimularon a los monocitos con el ionóforo de calcio A23187, obtuvieron una actividad de FT significativa. Por lo tanto, el FT en monocitos no activados permanece encriptado y su expresión está asociada a una elevada secreción de citoquinas y a la interacción entre monocitos y plaquetas, las cuales potencian la actividad procoagulante de los monocitos. Esta teoría se confirmó a partir de la adición de plaquetas a un cultivo de monocitos estimulados con LPS, ya que la actividad del FT aumentó en presencia de las plaquetas [142].

Los monocitos son una de las principales fuentes de micropartículas transportadoras de FT en la circulación y pueden constituir una fuente peligrosa de FT, especialmente en pacientes con riesgo cardiovascular, ya que puede ser causa de anomalías vasculares [143].

5.4.4. Granulocitos: neutrófilos polimorfonucleares y eosinófilos

La presencia de FT en neutrófilos polimorfonucleares (PMNs) ha sido descrita por varios autores. Sin embargo, aún no está claro si estas células son capaces de sintetizar el FT por sí mismas o lo captan del exterior. Algunos autores sugieren que tanto los monocitos como las FT⁺-MPs derivadas de monocitos pueden transferir el FT a los PMNs [129, 144]. Los PMNs pueden, a su vez, transferir el FT a las plaquetas mediante el mecanismo de unión CD15-FT.

Darbousset *et al.* [145] demostró que los PMNs no expresan FT en la superficie celular *in vitro*, sin embargo, *in vivo*, el FT fue detectado en la circulación sanguínea en los lugares donde había una lesión. Cuando se inhibió la interacción de los PMNs con el endotelio en el lugar de la lesión, no se produjo la acumulación de plaquetas ni se inició la cascada de la coagulación. Estos resultados indican que los PMNs interactúan con las CE e inducen la expresión del FT y el desencadenamiento de la formación del trombo.

Por otro lado, algunos autores defienden que los eosinófilos presentan actividad del FT cuando son estimulados [146]. Sin embargo, esta hipótesis es controvertida, ya que otros estudios no han detectado expresión del antígeno de FT o de su actividad en la superficie de los eosinófilos, independientemente de que fueran remanentes o estimulados [147].

5.4.5. El factor tisular en células endoteliales y células musculares lisas vasculares

La expresión de FT y su papel en CEs y CMLVs son todavía poco conocidos. Algunos inductores de FT en CEs son LPS, IL-1 β , VEGF y TNF α , entre otros [39, 148]. Las CEs pueden sintetizar, expresar y secretar el FT. Blum *et al.* [149] estudiaron las cascadas de señalización de FT en CEs humanas de cordón umbilical (HUVEC) y descubrieron que existen mecanismos diferentes para controlar la expresión de FT en CEs que se encuentran en condiciones fisiológicas o patológicas. Se ha propuesto que en condiciones fisiológicas, la vía de señalización mediada por la PI3K (fosfatidil-inositol 3 quinasa) y la proteína antiapoptótica Akt, activa continuamente componentes plasmáticos que suprimen la expresión de FT en las CEs. En condiciones patológicas, la regulación de FT se da a través de VEGF, que disminuye la actividad de PI3K y aumenta la actividad de las MAPK. Otro estudio reciente indica que la angiopoietina-1 inhibe la expresión de FT inducida por VEGF y TNF α y activa la vía de señalización PI3K-Akt [150]. Además, la eliminación de expresión de FT en CEs está asociada a una reducción de la angiogénesis que tiene lugar en *plugs* de matrigel introducidos en ratones [45, 151].

Respecto a las CMLVs, el FT no se expresa en la capa media de la pared vascular en condiciones fisiológicas. Sin embargo, determinadas condiciones patológicas de la pared vascular provocan la proliferación y migración de las CMLVs a la íntima del vaso, hecho que se asocia con un aumento de expresión de FT. Las CMLVs expresan FT bajo la inducción de factores de crecimiento, de agonistas vasoactivos y de factores protrombóticos [152, 153]. Se ha encontrado FT asociado al núcleo lipídico de lesiones ateroscleróticas. En este sentido, las CMLVs producen FT durante la migración hacia la íntima y de esta manera estimulan la expresión de FT en las CEs [154].

Las CMLVs tienen una gran plasticidad para llevar a cabo cambios fenotípicos. Estudios de nuestro grupo han demostrado que la distribución subcelular del

FT se ve claramente modificada en CMLVs en migración. Ensayos de microscopía confocal han permitido observar las dinámicas de migración celular y los patrones de polarización del FT en células en movimiento. El FT se expresa a niveles muy bajos en células estáticas y sólo se le ha detectado en pequeñas zonas de contacto localizadas en balsas lipídicas. Las tinciones intracelulares mostraron los bajos niveles de FT, localizado alrededor del núcleo en el aparato de Golgi, preparado para recibir una señal de exocitosis hacia la membrana plasmática. Al estimular las células quiescentes, el FT se movilizó rápidamente a la superficie celular. Además, se detectó un aumento en la expresión de FT en la íntima de arterias coronarias ateroscleróticas humanas con lesiones intermedias que colocalizaban con CMLVs migratorias (**Figura 14**). La asociación del FT a las balsas lipídicas permite su polarización hacia el frente migratorio. Esta localización es esencial para promover la interacción del FT con proteínas de microfilamentos y mediar la reorganización del citoesqueleto y la migración de las CMLVs [155].

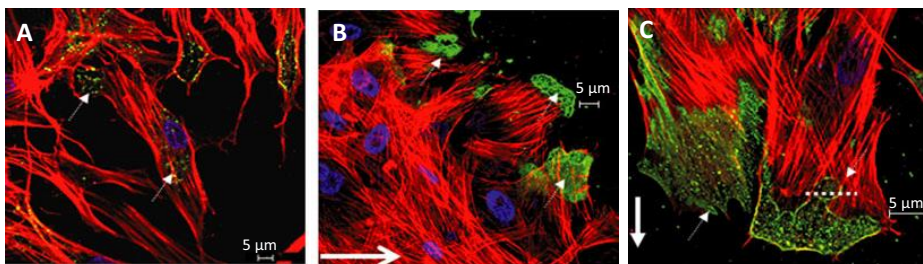


Figura 14. Localización celular del FT en CMLVs quiescentes y migratorias. Las células se tiñeron con un anticuerpo anti-FT (verde), un anticuerpo anti-faloidina (rojo), que se une a los filamentos de actina del citoesqueleto y Hoechst 33342 (azul), que marca los núcleos. **A)** CMLVs quiescentes. **B y C)** CMLVs en migración. Las flechas marcan la dirección de la migración. El FT se localiza en el frente de migración. Adaptado de Peña, E. *et al.* 2012 [155].

5.5. Señalización celular inducida por el factor tisular

Además del papel protagonista que tiene el FT en la coagulación, varios estudios han demostrado en repetidas ocasiones que el FT no es solamente el receptor celular del FVIIa sino que además está implicado en la señalización y activación de varios procesos celulares, entre ellos la inflamación, la angiogénesis o el crecimiento tumoral [156-158]. En la **Figura 15** se recoge un resumen de las vías de señalización del FT mejor conocidas.

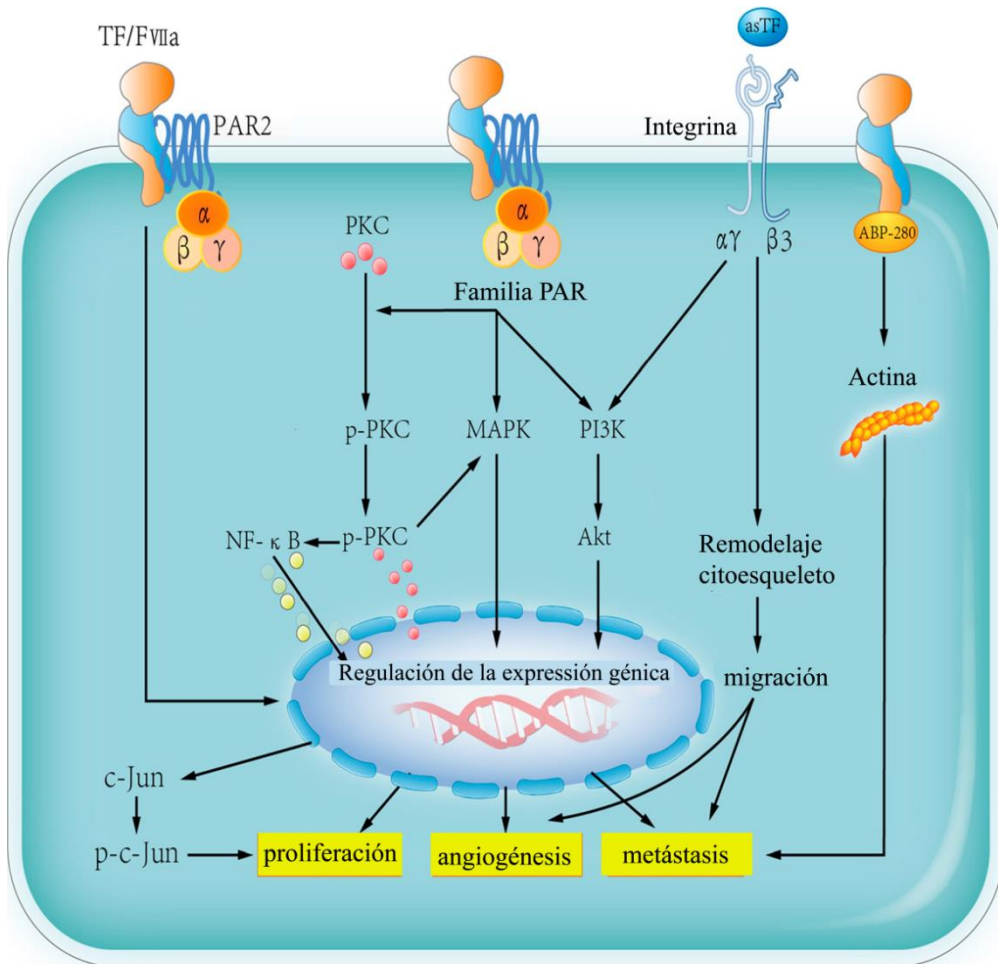


Figura 15. Principales vías de señalización del FT. El fITF forma un complejo binario con el FVIIa, que induce señalización a través de PAR2. La PKC se fosforila gracias al complejo FT y PAR, y transloca al núcleo activando también NF-κB. La familia PAR es capaz de señalizar a través de MAPK y de la vía PI3K/Akt, que también se activa mediante el asTF. El fITF, además, puede unirse a ABP-280 y liderar la modulación de actina, así como activar c-Jun. El asTF se une a integrinas, señalizando el remodelado del citoesqueleto y activando la migración, la angiogénesis y la metástasis celular (Adaptado de Han, X. *et al.*, 2014 [159]).

Estudios previos de nuestro grupo han demostrado que el FT expresado en CEm es necesario para la formación de nuevos microvasos. Más concretamente, el FT de CEm incrementa la expresión y secreción de CCL2, que a su vez, estimula el reclutamiento de CMLVs hacia las CEm. De esta manera, las CEm forman nuevos vasos y las CMLVs ayudan a estabilizarlos [45].

El FT contribuye a la angiogénesis mediante la activación de la cascada de coagulación así como de forma independiente a ella. La señalización del FITF se puede iniciar a través del complejo binario formado por FT-FVIIa, que activa PAR2; o bien mediante la fosforilación de la cola citoplasmática de FT, que regula positivamente la migración celular dependiente de la integrina $\alpha_3\beta_1$.

La activación de PAR2 induce la fosforilación de la quinasa PKC α y su translocación a la región perinuclear de la célula, lo que promueve la fosforilación de las quinasas ERK1/2 y del NF- κ B [159]. Se ha observado que la señalización por PAR2 inhibe la vía desencadenada por la fosforilación de la cola citoplasmática, que a su vez es dependiente de PKC α . La cola citoplasmática también puede interactuar con la proteína de unión a actina 280 (*Actin-Binding Protein*, ABP-280) y señalar metástasis y remodelamiento vascular [151].

Además, el FT induce la movilización de calcio en diferentes tipos celulares [160, 161], activa las proteínas activadas por mitógeno (MAP) p42/p44, la quinasa MAP p38 y la quinasa c-Jun [162, 163]. Esta activación de MAPK también está mediada por las proteínas PAR. En fibroblastos, se ha determinado que el FT activa el eje de quinasas Src-like, PI3K y c-Akt. Akt regula funciones esenciales de la célula como migración, proliferación, diferenciación, apoptosis, metabolismo y activación de varios factores pro- y anti-angiogénicos [151]. Lavenburg *et al.* [164] demostró que Akt y ETS1 controlan diferentes aspectos de la movilidad celular que son esenciales para la formación de tubos.

Resultados de nuestro grupo apuntan a que el FT señala la formación de tubos a través de Akt. La inhibición de FT endógena en CEm provoca una disminución de la activación de Akt, así como la inhibición de angiogénesis. Además, la sobreexpresión de Akt en CEm que han sido silenciadas de FT puede recuperar los niveles normales de formación de microcapilares [151]. La pérdida de Akt ha sido asociada con un aumento de la permeabilidad vascular y con vasos inmaduros [165, 166]. La activación de Akt dependiente de FT es consecuencia de la desfosforilación de Raf-Ser²⁵⁹, que disminuye la actividad quinasa de Raf y, en consecuencia, la fosforilación de las quinasas ERK1/2. Estos estudios indican que el eje FT-Akt tiene un importante papel en la formación de microvasos. Akt puede ser activado a través de integrinas, como

ya se ha demostrado en células de glioma, en las que el FT regula la angiogénesis mediante $\alpha_v\beta_3$ [167]. Además, $\alpha_v\beta_3$ regula la migración de las células a través de la activación de la vía PI3K-Akt [168]. Srinivasan *et al.* [169] demostró que, en las CEs, la vía de FT-integrinas media la señalización PI3K-Akt-NF- κ B, regulando la expresión de moléculas de adhesión y facilitando el reclutamiento de monocitos.

En cuanto a la forma soluble asTF, también ha sido relacionada con el crecimiento tumoral y la angiogénesis, sin embargo, esta forma no interacciona con PAR2, sino con las integrinas $\alpha_v\beta_3$ y $\alpha_6\beta_1$ para inducir angiogénesis [94].

A pesar de todos los avances conseguidos en relación a la regulación de FT y a su señalización mediante factores de transcripción, existen vías todavía no identificadas en la señalización de FT.

6. ESTADO DE LA CUESTIÓN

Las ECVs son una de las causas más importantes de muerte en todo el mundo y actualmente representan uno de los mayores desafíos para la investigación biomédica [1]. La aterosclerosis es un mecanismo fisiopatológico responsable de la mayoría de las ECVs. La ruptura de una placa de ateroma es uno de los orígenes más comunes de las complicaciones tromboisquémicas [12].

Actualmente, las causas que inducen que una placa fibroateromatosa asintomática se convierta en vulnerable con un alto riesgo de ruptura todavía no se conocen con profundidad. Los resultados obtenidos hasta el momento sugieren que una hemorragia dentro de la placa podría ser crucial para que ésta se transforme en inestable y de alto riesgo [37]. Se ha observado que la infiltración de células inflamatorias y la elevada producción de factores angiogénicos en las lesiones ateroscleróticas provocan la proliferación incontrolada de microvasos inmaduros y frágiles. Una elevada densidad de nuevos vasos sanguíneos inmaduros está asociada a vasos hemorrágicos perforados, a placas inestables y a un elevado número de episodios trombóticos [35, 36].

La formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de otros pre-existentes se conoce con el nombre de angiogénesis. Este proceso tiene lugar tras la exposición de las CEs a varios factores pro- y anti-angiogénicos que actúan de forma coordinada provocando que las células degraden la membrana basal, invadan el tejido colindante y proliferen formando la estructura de un nuevo vaso capilar. El proceso finaliza con el reclutamiento de pericitos y de CMLVs que estabilizan los neovasos formados [57].

El proceso de angiogénesis ha sido relacionado con algunos componentes que participan en la cascada de la coagulación, especialmente el FT [170]. La trombogenicidad de una placa aterosclerótica también está relacionada con una elevada expresión del FT [38]. El FT es una glicoproteína de membrana que funciona como receptor celular y cofactor catalítico para el FVIIa, que resulta en la activación de los factores IX y X, conduciendo finalmente a la formación de fibrina [34]. La expresión de FT puede verse inducida en CEs, CMLVs y monocitos por diversos estímulos tales como citoquinas, factores de crecimiento y aminas biogénicas [39]. Esta sobreexpresión se encuentra tanto

en la adventicia como en la íntima de placas arteriales y principalmente en vasos sanguíneos de lugares activamente angiogénicos [42]. El FT juega un papel esencial en la proliferación del *vasa vasorum*, un elemento clave en el desarrollo de la placa. Recientemente, se ha observado que las CEs de grandes vasos no expresan FT, sin embargo las CEm expresan altos niveles. El FT es capaz de regular la expresión de diferentes factores de transcripción involucrados en los procesos angiogénicos [45, 151]. Lo que no se conoce es si la expresión de FT en zonas altamente angiogénicas podría contribuir a la formación de vasos estables.

Por otro lado, la aterosclerosis se considera una enfermedad inflamatoria crónica. Durante el desarrollo de la placa se desencadena una respuesta inmune innata que progresa hasta convertirse en respuesta adaptativa en fases avanzadas. La neovascularización de la placa contribuye a mantener este estado inflamatorio. En este contexto, monocitos y macrófagos juegan un papel fundamental. Los monocitos en circulación son atraídos a la lesión aterosclerótica. La interacción de los monocitos con las CEs acelera la disfunción endotelial y aumenta la actividad procoagulante dependiente de FT, de esta manera se convierten en una importante fuente de citoquinas, quimiocinas y moléculas de adhesión [63, 64]. Ahora bien, se desconoce si las células inflamatorias son capaces de desencadenar funciones adicionales FT-dependientes.

Recientes estudios han demostrado que los monocitos están también implicados en los procesos de angiogénesis y de reparación tisular [61]. Los monocitos constituyen una población heterogénea. Se ha observado que determinadas subpoblaciones de monocitos tienen características particulares, mientras que a unos, CD16⁻, se les considera inflamatorios, los otros, CD16⁺, son llamados *patrolling* y están relacionados con procesos de neovascularización intraplaca, debido a su capacidad para secretar citoquinas y factores angiogénicos [26]. Los monocitos reaccionan en respuesta a diversos estímulos activando su diferenciación a macrófagos, células dendríticas y células fenotípicamente similares a endoteliales, conocidas como ELCs [74]. No obstante, todavía se desconoce si el FT, que está tan estrechamente ligado a la aterosclerosis y a la angiogénesis, está también implicado en la relación entre monocitos y CEs.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Un factor clave en la evolución de la aterosclerosis subclínica hacia un evento isquémico es la vulnerabilidad de la placa aterosclerótica. No se conocen las causas que producen la rotura de alguna de las placas existentes en el árbol arterial mientras que otras se mantienen estables. Se han observado placas coronarias humanas, asociadas a síndromes coronarios agudos, que presentan una mayor acumulación de neovasos. De hecho, se ha considerado que la angiogénesis dentro de las placas ateroscleróticas puede contribuir a la expansión de la íntima, a la transformación pro-trombótica de las células residentes y a crear un fenotipo de placa hemorrágica inestable. Los neovasos recién formados dentro de la placa son vasos inmaduros, no recubiertos por pericitos o células musculares lisas y, por lo tanto, poseen una debilidad estructural que puede dar lugar a complicaciones hemorrágicas y que contribuye a la inestabilidad de la placa.

Se han localizado células inflamatorias, especialmente monocitos y macrófagos, en áreas de la placa activamente angiogénicas. También se han detectado CEm que expresan altos niveles de FT, dentro del núcleo de una placa aterosclerótica coronaria. El FT contribuye activamente en la formación de neovasos. Por lo tanto, **nuestra hipótesis de trabajo es que el FT expresado en las placas ateroscleróticas regula la angiogénesis intraplaca mediante la inducción de la capacidad angiogénica de las CEm, la mejora del reclutamiento de pericitos y la inducción de formación de vasos maduros y estables, evitando así continuas hemorragias, favoreciendo la estabilidad de la placa y disminuyendo los episodios trombóticos.**

En primer lugar, creemos que el FT desencadena la formación de nuevos vasos sanguíneos por medio de la activación de varias vías de señalización, factores transcripcionales y de crecimiento. En segundo lugar, pensamos que los monocitos estimulan los procesos angiogénicos en las CEm. Simultáneamente, las CEm participantes en el proceso angiogénico son capaces de reclutar a los monocitos hacia las zonas de más actividad angiogénica y estimularlos para potenciar la formación de neovasos. De esta manera, se genera un proceso de retroalimentación positiva que estimula y estabiliza los nuevos vasos formados.

Para responder a esta hipótesis, esta tesis ha propuesto tres objetivos concretos:

- i. Analizar los mecanismos de señalización inducidos por el FT en CEm que dan lugar a la formación de nuevos vasos sanguíneos, a través de rutas celulares de señalización estrechamente involucradas en la angiogénesis.
- ii. Determinar los mecanismos a través de los cuales los monocitos regulan la expresión de FT en CEs.
- iii. Evaluar el efecto de los factores angiogénicos endoteliales en la respuesta monocitaria y caracterizar los mecanismos de señalización celular implicados.

El abordaje de estos tres objetivos ayudará a conocer en profundidad los mecanismos que nos permitan, en un futuro, favorecer la formación de vasos complejos y estables en placas ateroscleróticas para reducir su vulnerabilidad y disminuir, por consiguiente, los eventos agudos de infarto de miocardio y cerebrales.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. DISEÑO EXPERIMENTAL

Para alcanzar los objetivos propuestos, se diseñó el siguiente programa experimental:



Figura 16. Diseño experimental.

2. CULTIVOS CELULARES

Los cultivos celulares utilizados, detallados a continuación, se mantuvieron en condiciones óptimas de incubación: 37 °C, 95% de humedad, 21% de O₂ y 5% de CO₂.

2.1 Células endoteliales

De acuerdo con la clasificación de la *American Heart Association* [171], las placas con mayor riesgo cardiovascular presentan una gran cantidad de microcapilares [172]. Por esta razón, se eligieron para nuestro estudio células endoteliales microvasculares (CEm).

Estudios previos de nuestro grupo han comprobado que el comportamiento y los patrones de expresión génica y proteica de las células endoteliales microvasculares dermales (HDMECs) de línea primaria y de las células endoteliales microvasculares humanas de línea estable (HMEC-1) [45] son muy similares. Dado que las células de línea estable son más resistentes a las modificaciones de la expresión génica y a la aplicación de los protocolos necesarios, para el desarrollo de esta tesis se utilizaron principalmente células HMEC-1, generosamente donadas por el *Center of Disease Control* (Atlanta, GA).

Las HMEC-1 se cultivaron en medio MCDB131 (Life Technologies) suplementado con un 10% de suero bovino fetal (SBF, Biological Industries), 2mM de L- glutamina (Life Technologies) y 50 ng/ml de gentamicina (Lonza). Estas células crecieron en monocapa hasta alcanzar la confluencia necesaria, se les cambió el medio cada dos días y se utilizaron entre los pases 15 y 25.

Con el objetivo de dar más solidez a los resultados obtenidos, determinados experimentos clave se repitieron con células de línea primaria HDMECs y células endoteliales humanas de cordón umbilical (HUVEC). Las HDMECs (PromoCell) se cultivaron también en medio MCDB131 al 10% SBF. Se utilizaron entre los pases 2 y 6. Las HUVEC (Advancell) se cultivaron en medio *Modified Eagle's Medium* 199 (MEM199, Life Technologies) suplementado con 20 mM de Hepes pH 7.4 (Life Technologies), 20% SBF, 30 µg/ml de suplemento para el crecimiento endotelial (ECGS, Sigma Aldrich), 1 mM de piruvato (Life

Technologies), 2 mM de L-glutamina, 100 µg/ml de heparina (Sigma Aldrich) y los antibióticos penicilina (100 U/ml) y estreptomina (100 µg/ml) (Fisher Bioblock). Estas células se sembraron en placas pretratadas 30 min a 37 °C con 10 mg/ml de gelatina (BD Bioscience) y se utilizaron entre los pases 3 y 6.

Además de estos tres tipos de CEs, se utilizó una cuarta línea celular endotelial, las células EOMA CRL-2586TM (ATCC) [173]. Se trata de una línea de CEs estable que proviene de hemangiomas de ratón adulto. Estas células poseen propiedades características de las CEs, tales como la capacidad de formar estructuras tubulares sobre una membrana basal como el Matrigel (BD MatrigelTM, BD Biosciences) [174] y presentan una morfología empedrada en cultivos confluentes. Tienen un comportamiento similar al de las CEm *in vitro*, además son capaces de sintetizar la enzima convertidora de angiotensina (*angiotensin-converting enzyme*), expresar receptores de superficie para LDL acetiladas y producir trombospondina, entre otras características. Sin embargo, carecen de expresión de FT y, por ese motivo, resultan interesantes para nuestro estudio. Estas células fueron cultivadas en medio *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM, Life Technologies) suplementado con un 10% SBF, 1 mM de piruvato y 50 ng/ml de gentamicina. Se utilizaron entre los pases 10 y 15.

2.2. Células musculares lisas vasculares

Se utilizaron células musculares lisas vasculares humanas (CMLVs), obtenidas a partir de arterias coronarias humanas de corazones explantados durante operaciones de trasplante de corazón, llevados a cabo en el Hospital de la Santa Creu i Sant Pau. Para obtenerlas, se siguieron las técnicas de explante establecidas y estandarizadas por nuestro grupo [175], que habían sido aprobadas por el comité ético del hospital en concordancia con el tratado de Helsinki. Estas células se cultivaron en *Medium-199* (M199, Life Technologies) suplementado con un 20% SBF, 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomina y 2 mM de L-glutamina. Los ensayos se realizaron con células de pases entre 3 y 6.

2.3. Monocitos

Los monocitos fueron aislados a partir de células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) procedentes de residuos leucocitarios de donantes sanos,

distribuidos por el *Banc de Sang i Teixits* (Departamento de Salud de la Generalitat de Catalunya). Las muestras consistían en aproximadamente 10 ml de concentrado leucocitario, que se mezcló a razón de 1:1 en PBS 2 mM de EDTA y se añadió sobre 15 ml de Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare). Las PBMCs se obtuvieron mediante gradiente de centrifugación de 45 min a 300 g.

Una vez aisladas, las PBMCs se lavaron con PBS/EDTA y se centrifugaron entre 3 y 4 veces a 300 g, 5 min. Las células se resuspendieron en medio *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI) 1640 GlutaMAX (Life Technologies) suplementado con el 10% de suero humano A/B (SH^{A/B}, Lonza), 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomina, se determinó el número de monocitos y se sembraron a una concentración de 5×10^5 monocitos/ml sobre placas de poliestireno de superficie modificada (BD Biosciences) para favorecer la adhesión de los monocitos. Para el conteo, se determinó el número de PBMCs utilizando un contador Multisizer 3 Coulter (Beckman Coulter, Inc.), se seleccionó la franja correspondiente al diámetro de monocitos y linfocitos [176], y se calculó la concentración de monocitos según su proporción respecto a los linfocitos [177], tal y como se muestra en la **Figura 17**. Tras 2 h, los cultivos se lavaron con PBS para eliminar las células no adheridas, y se añadió medio nuevo.

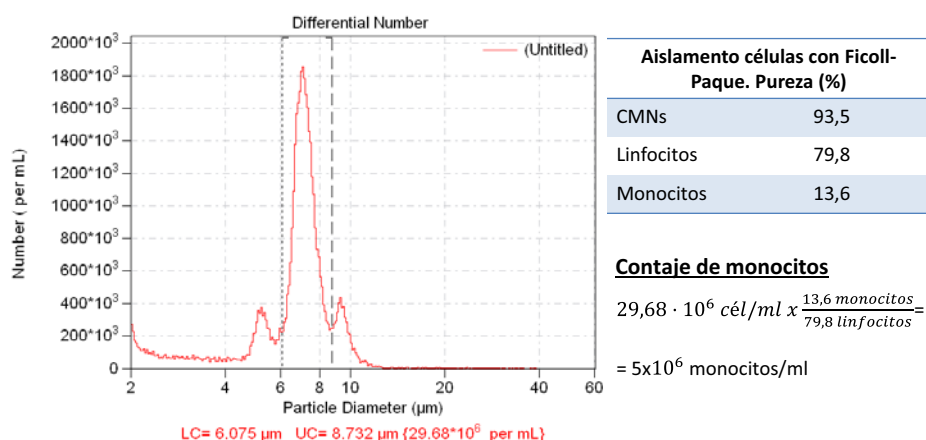


Figura 17. Contaje de monocitos. Ejemplo representativo de la metodología utilizada para determinar el número de monocitos de una suspensión de PBMCs. Datos obtenidos de BD Vacutainer CPT, REF62753 [177].

Debido a que el cultivo de monocitos provenía de una mezcla de diferentes tipos celulares, para determinar la pureza de los cultivos se analizó el

porcentaje de expresión de CD14 mediante citometría de flujo. Para ello, las células se recogieron de las placas con PBS 0,53 mM de EDTA y se incubaron con un anticuerpo monoclonal CD14-PerCP (Immunostep, dilución 1:10). Para cada medida, se adquirieron al menos 10.000 eventos en un citómetro de flujo Coulter Epics XL Flow Cytometer equipado con un láser de argón de 488 nm (Beckman Coulter). En cada ocasión, se utilizaron como controles negativos de la medida las mismas células incubadas a una concentración de 5×10^5 células/100 μ l con un anticuerpo isotipo IgG. Los datos se analizaron con el programa Expo32 (Beckman Coulter) (**Figura 18**).

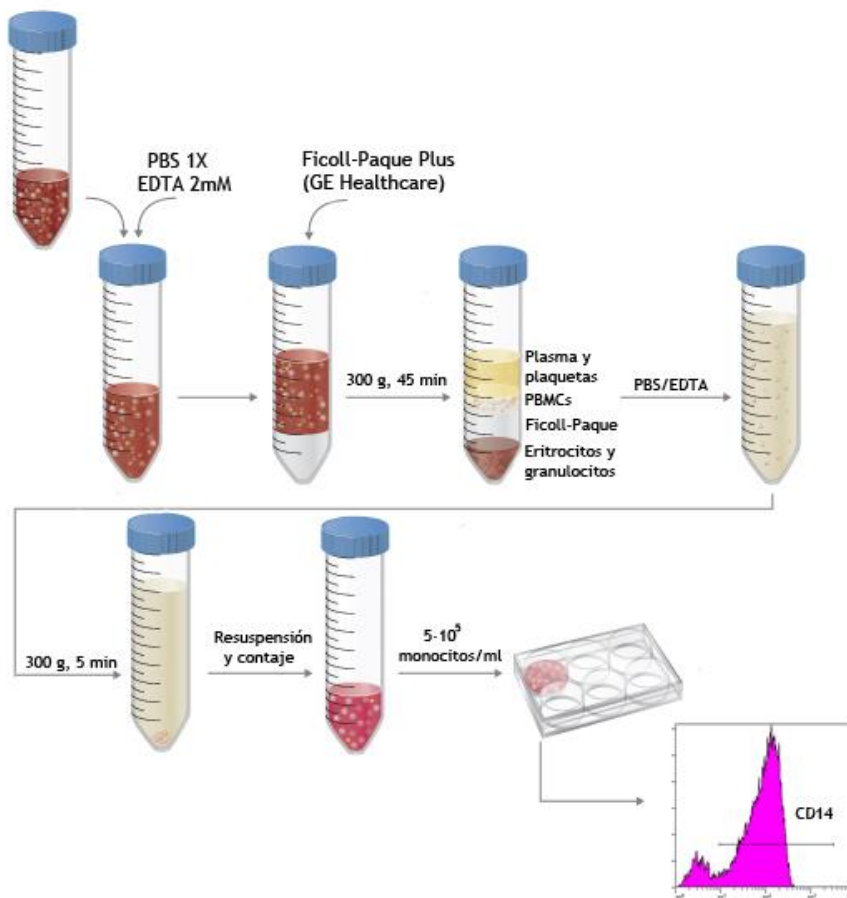


Figura 18. Aislamiento y siembra de monocitos a partir de residuos leucocitarios. Protocolo de separación por gradiente de centrifugación Ficoll-Paque, siembra de monocitos y comprobación de la pureza del aislamiento mediante citometría de flujo. Adaptado de <http://www.irvinesci.com/protocol-for-mesenchymal-stem-cell-isolation>, 2015 [178].

3. SILENCIAMIENTO DE GENES

Con el fin de estudiar las vías de señalización que regulan la expresión del FT en las CEs, se moduló la expresión génica del FT y de algunos elementos moleculares involucrados en la señalización. Uno de los métodos utilizados para manipular la expresión de estos genes fue el uso de ARNs de interferencia pequeños, los siRNAs (*small interference RNA*). Estos ARNs son altamente específicos para la secuencia de nucleótidos de su ARNm diana, por ello interfieren en la expresión del gen respectivo.

El silenciamiento de genes se realizó a través de tecnología de nucleofección, una técnica basada en la transfección de ácidos nucleicos a células a través de la electroporación de su membrana como consecuencia de aplicar un voltaje específico. Se utilizó el sistema de nucleofección y el kit V de Amaxa (Nucleofector®, Amaxa Inc.). Los siRNAs se transfectaron en células HMEC-1 y en monocitos, siguiendo las instrucciones del fabricante. Las especificaciones para cada tipo celular se recogen en la **Tabla 5**.

Tabla 5. Especificaciones del protocolo de nucleofección según el tipo celular.

HMEC-1	MONOCITOS
10 ⁶ células	5x10 ⁶ células
2 μM de siRNA	300 nM de siRNA
100 μl Nucleofector® Solution Programa T016	100 μl Nucleofector® Solution Programa X001

En todos los experimentos de silenciamiento génico se utilizó un control de siRNAs aleatorios para contrastar posibles cambios inespecíficos en el perfil génico o fenotípico de las células debido al uso de esta técnica. En la tabla siguiente se recogen los siRNAs utilizados.

Tabla 6. siRNAs específicos utilizados en el silenciamiento de genes.

Gen	Casa comercial	Referencia
FT*	Applied Biosystems	S4932
ETS1	Applied Biosystems	S4849
SMAD3	Applied Biosystems	S8400
PAR2	Applied Biosystems	S4926
Integrina- β 1	Applied Biosystems	s7575
Wnt5a	Applied Biosystems	s14873
FZD5	Applied Biosystems	s15416
LRP5	Applied Biosystems	s8293
NF- κ B p65	Cell Signalling	s6534
Control siRNA aleatorio	Applied Biosystems	AM4638

*Se utilizó un siRNA de FT con una secuencia 5'-GGACUUAUUUUUACACUUTT-3', que se encuentra en el exón 4 del gen FT, para asegurar el silenciamiento de flTF y asTF.

La eficiencia de los silenciamientos se midió con el análisis de los niveles de ARNm de las células transfectadas 24 h después de la nucleofección, a través de PCR cuantitativa. En el caso del FT, se utilizaron oligonucleótidos que amplificaban los exones 3 y 4 de su secuencia, para validar que el silenciamiento era eficiente tanto para flTF como para asTF.

4. AMPLIFICACIÓN, PURIFICACIÓN Y CLONAJE EN VECTORES DE EXPRESIÓN

En nuestro estudio de las vías de señalización del FT se incluyeron métodos estándar de clonaje de vectores plasmídicos con el gen de interés. A continuación se explica el procedimiento seguido.

4.1. Generación de construcciones

4.1.1. Obtención del inserto

El fragmento a clonar, llamado inserto, se obtuvo de dos maneras:

- **Amplificación por PCR.** Este método se utilizó para amplificar la secuencia de interés tomando como molde el ADN genómico o el ADNc (ADN copia de la cadena de ARNm). Se utilizaron los oligonucleótidos que contenían las dianas de restricción, previamente diseñados *in silico*. Las amplificaciones se realizaron con la polimerasa de alta afinidad Pfu DNA Polymerase (Fermentas), que tiene una tasa de error mínima. Los productos amplificados se purificaron después con el QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) y se preparó una reacción enzimática con las enzimas adecuadas y los productos de PCR.
- **Digestión enzimática.** Se utilizó cuando nuestro fragmento de interés se encontraba dentro de otro vector de expresión. Se preparó una digestión con las enzimas de restricción adecuadas (Fermentas) y las condiciones especificadas en la **Tabla 7**. Los productos de la digestión se separaron por electroforesis en un gel de agarosa y se purificaron con el QIAquick Gel extraction Kit (Qiagen).

Tabla 7. Condiciones específicas para la digestión enzimática.

Componentes		Condiciones de digestión	
		Temperatura	Tiempo
Tampón específico 10x	2-4 µl	37 °C	1-16 h
ADN	0.5-1 µg		
Enzima	0.5-2 µl		
H ₂ O	20 µl (volumen final)		

El tiempo de digestión y las concentraciones de los componentes variaron según las especificaciones de cada enzima.

4.1.2. Digestión y desfosforilación del vector receptor

Para generar extremos cohesivos en los vectores receptores, se digirieron con las enzimas de restricción específicas y se purificaron en un gel de agarosa. Los extremos 5' libres generados se desfosforilaron con la fosfatasa alcalina CIAP (*Calf Intestinal Alkaline Phosphatase*, 0,001 U/10 µg de vector, Life Technologies) para minimizar el riesgo de ligación del vector vacío.

4.1.3. Reacción de ligación

La ligación del ADN del inserto y el vector (proporción 3:1) se realizó mediante la enzima ligasa T4 (1 U/10 µl de reacción, Fermentas) y su tampón correspondiente. La mezcla se incubó a 16 °C durante 16 h.

4.1.4. Construcciones obtenidas

Se obtuvieron las siguientes construcciones:

- 1. pLVX-flTF-AcGFP-N1:** El ADNc de flTF se obtuvo a partir del clon MGC: 13630 IMAGE: 4073183 (Genycell Biotech), que se corresponde con la secuencia de ARNm *Ref. Seq mRNA NM 001993.2* y se amplificó por PCR con los oligonucleótidos que se muestran en la **Tabla 8**.
- 2. pLVX-flTF-DsRed-N1:** Obtenida también a partir del ADNc del flTF y los oligonucleótidos correspondientes (**Tabla 8**); esta construcción se utilizó posteriormente en mutagénesis dirigida.
- 3. pLVX-asTF-DsRed-N1:** El fragmento asTF se obtuvo a partir de una construcción de asTF clonada en un vector pTRiEx-3-Neo, en las dianas de restricción NcoI/XhoI, con el péptido líder endógeno, generosamente donada por el Dr. Bogdanov [88] (**Figura 19**). Este fragmento fue subclonado en el vector pLVX-DsRed-N1 con los oligonucleótidos y las enzimas de restricción indicados en la **Tabla 8**.

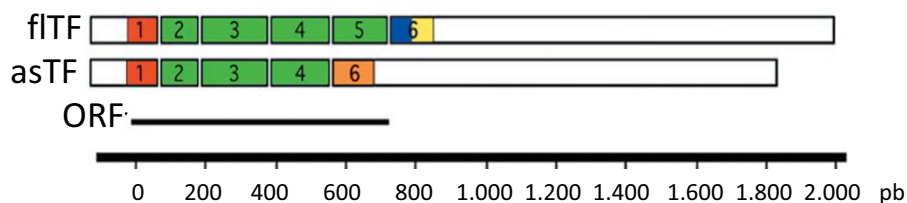


Figura 19. Representación esquemática de la secuencia de ARNm de la variante asTF clonada en el vector pLVX-DsRed-N1. En rojo, la secuencia líder. En verde, la secuencia correspondiente al dominio extracelular. En azul, el dominio transmembrana. En amarillo, el dominio citoplasmático. En naranja, la región C-terminal específica de asTF. En blanco, las regiones de ARNm que no se traducen. ORF: Punto de inicio de lectura. Número de acceso de GenBank: AF487337. Adaptado de Bogdanov, V.Y. *et al.* [88].

4. pGL3/pFT: El fragmento del promotor de FT (pFT) -40 a +91 pb, considerando el nucleótido +1 como el inicio de la transcripción, se obtuvo por PCR a partir de ADN genómico humano y de los oligonucleótidos de la **Tabla 8**. Posteriormente, se clonó en el plásmido pGL3 (Promega) mediante digestión enzimática.

Tabla 8. Oligonucleótidos y enzimas de restricción utilizados para generar las construcciones.

OLIGO	SECUENCIA	DIANA
fITF	For 5'-CGCGGCACA CTCGA GCCACCATGGAGACCCCTGCCTGGC-3'	XhoI
	Rev 5'-CGCGCATG GGGCC CTGAAACATT CAGTGGGGAGTTCTC-3'	Apal
asTF	For 5'-CGCGGCACA CTCGA GCCACCATGGAGACCCCTGCCTGGC-3'	XhoI
	Rev 5'-GCCGGCACA GGGCC CGTGGGGAGTTCTCCTTCCAGCT-3'	Apal
pFT	For 5'-CGCGCATG GGTACC ACCGCGACGGCAAGTGAC-3'	KpnI
	Rev 5'-CGCGGCACA CTCGAG GGGAGCTCGCAGTCTTGG-3	XhoI

For: Oligonucleótido sentido o *forward*, rev: oligonucleótido antisentido o *reverse*.

4.2. Mutagénesis dirigida

Se mutó la secuencia del promotor de CCL2 en los lugares de unión de ETS1 (-154 pb) y de SMAD3 (-253 pb). También se mutó la secuencia del gen fITF cambiando los residuos de Lys20, Asp58 y Phe140 del dominio extracelular por Ala, evitando así la unión del FVII. A continuación, se explica el procedimiento de mutagénesis dirigida utilizado.

La mutagénesis dirigida se realizó mediante el kit comercial QuikChange™ II Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene). Primero, se diseñaron los oligonucleótidos con la ayuda del programa TF SEARCH ANALYSIS

(<http://www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html>). La tabla siguiente muestra los oligonucleótidos *forward* utilizados, los oligonucleótidos *reverse* corresponden a la cadena complementaria. Las bases mutadas aparecen señaladas en rojo. Las secuencias de los promotores de CCL2 y de FT con las secciones mutadas se recogen en el apéndice.

Tabla 9. Oligonucleótidos *forward* usados para la mutagénesis dirigida. Mutaciones destacadas en rojo.

MUTACIÓN	SECUENCIA
Lugar de unión de ETS-1 (promotor CCL2)	5'-GCTTCCCTTCTACTTCGTCGAAATCCACAGGATGC-3'
Lugar de unión de SMAD3 (promotor CCL2)	5'-ACATCTGTGGTCAGAAATGGGCTTAATGGCACCCC-3'
Lys20 (gen <i>fITF</i>)	5'- GGAAATCAACTAATTTTCGCGACAATTTTGGAGTGGGAACCC-3'
Asp58 (gen <i>fITF</i>)	5'- GACACAGAGTGTGCCCTCACCGACGAG-3'
Phe140 (gen <i>fITF</i>)	5'- CAGAAGGAACAACACTGCCCTAAGCCTCCGGGA-3'

Para las reacciones de mutagénesis se siguieron las instrucciones de la casa Stratagene. Se usaron como molde 25 ng de las construcciones pGL3/pCCL2, amablemente donada por el Dr. Nicholas, J. [179] y pLVX-*fITF*-DsRed-N1. Se incubaron en un termociclador (Life Technologies) con las condiciones indicadas en la **Tabla 10**.

Tabla 10. Condiciones de la reacción

CICLOS	TEMPERATURA	TIEMPO
1	95 °C	30 s
	95 °C	30 s
16	55 °C	1 min
	65 °C	1 min/kb
1	4 °C	1 min

La posterior digestión del ADN molde y la transformación bacteriana se hicieron según las instrucciones del fabricante.

De esta manera se obtuvieron las construcciones **pGL3/pCCL2-ETS1mut**, **pGL3/pCCL2-SMAD3mut** y **pLVX-FTmut-DsRed-N1**. La correcta incorporación de la mutación fue determinada por secuenciación.

4.3. Transformación bacteriana

Para amplificar las diferentes construcciones, se transformaron en bacterias competentes *E. Coli* (cepa DH5 α) (Life Technologies) mediante choque térmico. En este paso se utilizaron las construcciones generadas y las siguientes construcciones adquiridas pcDNA3.2-Wnt5a-V5, CS2 Flag-Smad3, SMAD3 shRNA (Addgene [180]) y pCMV6-ETS1 (Origen).

El protocolo de transformación fue el siguiente: se añadió el ADN (5 μ l del producto de ligación o 1 ng del vector comprado) a 200 μ l de bacterias competentes, que fueron incubadas 30 min en hielo, 90 s a 42 $^{\circ}$ C y 5 min en hielo. Después, se añadió 800 μ l de solución SOC (*Super Optimal broth with Catabolite repression*), que es solución SOB (*Super Optimal Broth*, **Tabla 11**) suplementada con 20 mM de glucosa, y se incubaron las bacterias durante 1 h a 37 $^{\circ}$ C en agitación. Las bacterias transformadas se centrifugaron a 800 g, 1 min a temperatura ambiente y se resuspendieron en 100 μ l de SOB. Finalmente, se sembraron en placas de LB (Luria Bertani)-agar sólido con el antibiótico adecuado para la selección de las competentes y se incubaron durante 16 h a 37 $^{\circ}$ C hasta la aparición de colonias.

Tabla 11. Soluciones utilizadas en la transformación de bacterias.

Medio SOB		Medio LB	
Bacto Triptona	10 g	Triptona	10 g
Extracto de Levadura	2,5 g	Extracto de Levadura	5 g
NaCl	0,29 g	NaCl	5 g
KCl	0,09 g	NaOH 1N	1 ml
MgCl ₂ 2M	2,5 ml	H ₂ O	*v.f. 1 litro
H ₂ O	*v.f. 500 ml		

*v.f. = volumen final

4.4. Purificación del ADN

Las colonias generadas a partir de bacterias transformadas se recogieron y se precultivaron individualmente en 3 ml de LB con el antibiótico de selección adecuado durante toda la noche a 37 $^{\circ}$ C, en agitación. Al día siguiente, se utilizaron 2 ml de cada precultivo para hacer una purificación de ADN a pequeña escala (Wizard[®] Plus Minipreps DNA Purification System, Promega) con el fin de comprobar, mediante digestión enzimática y secuenciación, que las construcciones se habían generado correctamente.

Una vez comprobadas las construcciones, a partir de los precultivos se realizó una siembra en estría en LB-agar con antibiótico. Se incubaron las bacterias toda la noche a 37 °C, al día siguiente se inocularon las colonias aisladas en 5 ml de medio LB con antibiótico y se dejaron crecer durante todo el día a 37 °C. Al final del día, se inocularon 100 µl de los precultivos en 100 ml de LB con antibiótico, en un Erlenmeyer de 500 ml y se incubaron durante toda la noche. Al día siguiente, se recuperó 1 ml de cada cultivo para preparar un glicerolado (20% de glicerol) que se guardó a -80 °C. El resto se centrifugó a 1500 g durante 15 min a 4 °C. Se descartó el sobrenadante y el ADN se purificó a partir del sedimento bacteriano mediante el kit comercial QIAfilter Plasmid Midi Endotoxin Free kit (Qiagen).

5. SOBREENPRESIÓN GÉNICA POR TRANSDUCCIÓN VIRAL

La transducción de células mediante un sistema de expresión viral permite obtener una sobreexpresión estable de un gen de interés, debido a la capacidad del vector de expresión para integrarse en el genoma de la célula huésped.

En nuestro caso, se utilizó el sistema Lenti-X™ Lentiviral Expression System (Clontech), que incluye un vector de expresión pLVX-DsRed o -AcGFP. Estos vectores permiten expresar un gen de interés unido al monómero DsRed, que es un mutante de la proteína roja fluorescente de *Discosoma sp.*, o bien unido al AcGFP, que es un monómero de la proteína verde fluorescente de *Aequorea coerulea*. Estos vectores de expresión poseen secuencias LTR (*Long Terminal Repeats*) necesarias para la integración del transgen en el genoma de la célula diana, así como una secuencia de empaquetamiento ψ . Además, están dotados de un MCS (*Multi Cloning Site*) compuesto por diferentes dianas de restricción que permiten clonar el gen de interés bajo el control del promotor de citomegalovirus (CMV). Finalmente, los vectores incorporan un gen de resistencia a la puomicina (Puro^r), un antibiótico inhibidor de la síntesis proteica, que permite seleccionar las células infectadas (**Figura 20**).

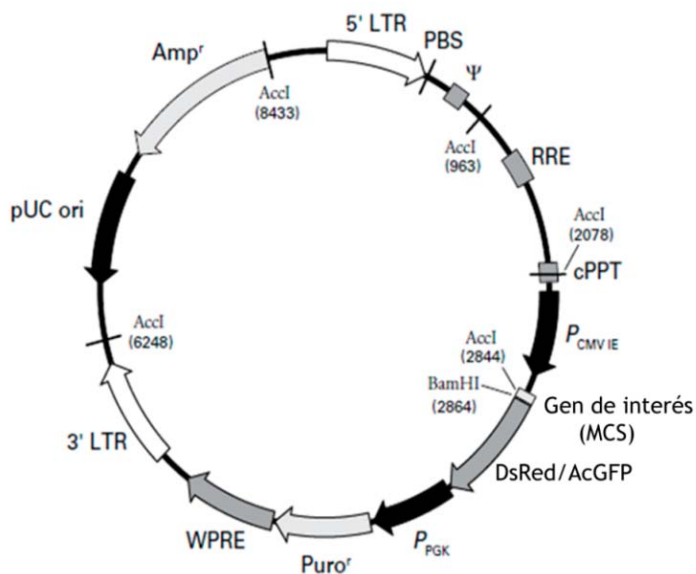


Figura 20. Mapa del vector pLVX-DsRed/AcGFP.

5.1. Producción de los virus

Las partículas víricas se produjeron mediante transfección de las células HEK-293T/17 (ATCC) con fosfato cálcico y las construcciones pLVX-flTF-AcGFP-N1, pLVX-asTF-DsRed-N1 y pLVX-FT*mut*-DsRed-N1 o los vectores pLVX-AcGFP-N1 y pLVX-DsRed-N1, que se tomaron como controles. Para ello, se sembraron 5×10^6 células en placas de 100 mm, en medio completo DMEM con alta concentración de glucosa (Life Technologies), 10% SBF, 1% L-glutamina y los antibióticos penicilina (100 U/ml) y estreptomycin (100 $\mu\text{g/ml}$). A las 8 h, se les añadió difosfato de cloroquina (Sigma Aldrich) a una concentración final de 25 μM en el medio de cultivo y se incubaron las células durante 5 min.

Se preparó una solución del vector de expresión lentiviral, los plásmidos que codifican para las proteínas virales (*Pol*, *IN*, *Tat*, *Rev*, *Gag*, *VSV-G*) (Tabla 12) y CaCl_2 . Seguidamente, se añadió 500 μl del tampón HBS 2x (Tabla 12) a la solución, a la vez que se burbujeaba con una pipeta Pasteur. A continuación, se añadió la solución a los cultivos de HEK293T/17.

Tabla 12. Soluciones utilizadas para la producción de virus.

SOLUCIÓN DE ADN		TAMPÓN HBS 2x	
Componentes	Cantidad	Componentes	Concentración
Vector expresión lentiviral	5 μg	Hepes	50 mM
Plásmido psPAX2	3,58 μg	KCl	10 mM
Plásmido pMD2G	1,43 μg	Dextrosa	12 mM
CaCl_2 2M	61 μl	NaCl	280 mM
H_2O	*v.f. 500 μl	Na_2HPO_4	1,5 mM

*v.f. = volumen final

Al cabo de 16 h de transfección, se renovó el medio completo. Las células transfectadas se incubaron durante 48 h, tiempo necesario para la producción y liberación del virus en el medio. Después, se recogió el sobrenadante viral, se filtró a 0,45 μm (Corning, Inc.) y se usó para la transducción de HMEC-1.

5.2. Determinación del título viral

El cálculo del título viral permite determinar la cantidad de partículas víricas capaces de infectar una célula mediante las unidades formadoras de colonias (*cfu*, *Colony Forming Units*). La determinación de la *cfu* permite definir la

multiplicidad de infección (MOI, *Multiplicity Of Infection*), que representa el número de partículas infecciosas por célula.

Para determinar el título viral, se sembraron células HeLa (10^5 células/pocillo de placa de 6) en medio completo DMEM con alta concentración de glucosa, 10% SBF, 1% L-glutamina y los antibióticos penicilina (100 U/ml) y estreptomycin (100 $\mu\text{g/ml}$), y se infectaron al día siguiente en un volumen final de 1 ml con diluciones seriadas de cada uno de los sobrenadantes producidos (10^{-1} ; 10^{-2} ; 10^{-3} ; 10^{-4} ; 10^{-5} ; 10^{-6}) en medio completo con polibreno (8 $\mu\text{g/ml}$, Sigma-Aldrich). El polibreno es un polícatión que aumenta la eficiencia de infección ya que permite neutralizar las cargas que provocan la repulsión entre el virus y la célula.

Después de 24 h de infección, se sustituyó el sobrenadante viral por medio completo y se incubaron las células durante 24 h. Transcurrido ese tiempo, se seleccionaron las células durante 7-10 días con 0,8 $\mu\text{g/ml}$ de puromicina (Sigma Aldrich) en medio completo, hasta la aparición de colonias individuales. El título del virus corresponde al número de colonias formadas multiplicado por el factor de dilución y dividido entre el volumen final de infección, es decir, si aparecen 6 colonias en la dilución 10^{-6} , el título viral sería 6×10^6 cfu/ml.

5.3. Transducción en HMEC-1

Las células HMEC-1 (60-70% de confluencia) fueron transducidas con una MOI=15 del sobrenadante viral en medio completo suplementado con 8 $\mu\text{g/ml}$ de polibreno durante 16 h a 37 °C, después se sustituyó el medio de infección por medio completo y 24 h más tarde, las HMEC-1 transducidas se seleccionaron con 1 $\mu\text{g/ml}$ de puromicina durante 7 días. La eficiencia de la transducción se estudió mediante PCR cuantitativa, western blot y microscopía de fluorescencia (Leica TCS SP2-AOBS). Esta población celular infectada se utilizó para posterior experimentación.

6. SOBREEXPRESIÓN TRANSITORIA POR PLÁSMIDOS

Se realizaron transfecciones transitorias con la ayuda del kit Effectene® (Qiagen), siguiendo las instrucciones del fabricante. Este kit comercial utiliza un potenciador (*enhancer*) de la condensación de ADN y un tampón optimizado para lograr altas eficiencias de transfección. Primero, el *enhancer* condensa las moléculas de ADN y el reactivo *Effectene Reagent* las recubre con lípidos catiónicos, generando un complejo potencialmente eficaz para transferir ADN a células eucariotas.

El procedimiento utilizado consistió en dos pasos. Primero, se mezcló el ADN plasmídico con el *enhancer* y un tampón que proporciona una composición óptima en sales para la condensación del ADN. A continuación, se añadió el *Effectene Reagent* y se incubó 10 min, permitiendo que se formasen complejos ADN-lípidos. Estos complejos se mezclaron con medio de cultivo y se añadieron directamente a las células.

Para las transfecciones transitorias en HMEC-1, se sembraron 2×10^5 células/pocillo en placas de 6 pocillos y se utilizaron 0,4 µg de los plásmidos CS2 Flag-Smad3, SMAD3 shRNA y pCMV6-ETS1-GFP. Las transfecciones en monocitos se llevaron a cabo con 10^7 células sembradas en placas de 60 mm y 1 µg de la construcción pcDNA3.2-Wnt5a-V5. Como controles negativos se utilizaron los mismos vectores vacíos. La eficiencia de la transfección se evaluó mediante la expresión de GFP, determinada con el análisis de PCR cuantitativa y de western Blot.

7. ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD DE PROMOTORES

Un promotor génico es la secuencia previa al punto de inicio de la transcripción del ADN y contiene la información necesaria para activar o desactivar el gen que regula.

El estudio de la actividad transcripcional de los promotores de CCL2 y FT se hizo mediante la determinación de la actividad luciferasa de las construcciones: pGL3/CCL2, pGL3/pCCL2-ETS1*mut*, pGL3/pCCL2-SMAD3*mut*, y pGL3/FT. En algunos casos, se cotransfectaron estas construcciones junto con los vectores de expresión CS2 Flag-Smad3, SMAD3 shRNA y pCMV-ETS1, según los intereses del estudio.

Las transfecciones se realizaron en HMEC-1 con el liposoma *Lipofectamine Reagent* (Life Technologies) según se describe a continuación: en primer lugar, para cada pocillo de una placa de 12 pocillos, se sembraron $1,2 \times 10^5$ células y al día siguiente, se mezclaron 0,5 μg de la construcción en pGL3 con 50 ng del vector reportero de pRL-null Renilla (Promega) y 2 μl del liposoma en 100 μl de medio OPTIMEM (Fisher Bioblock). Para los ensayos de cotransfección, se añadió también 50 ng/pocillo de los vectores CS2 Flag-Smad3, SMAD3 shRNA y pCMV-ETS1-GFP, además del plásmido pGL3/CCL2 con sus correspondientes mutaciones. Los complejos de ADN-liposoma se añadieron a las células y se incubaron durante 3 h. El medio de transfección se sustituyó por medio completo y se incubaron las células 24-48 h más. Después, se añadió el tratamiento en los casos correspondientes. La actividad luciferasa fue detectada con el Dual-Luciferase® Reporter Assay System (Promega), que permite detectar la actividad luciferasa de luciérnaga (*Photinus pyralis*) y la de Renilla. La lectura se realizó en el luminómetro Orion I (Berthold Detection Systems) y los resultados de la actividad luciferasa fueron normalizados por la actividad Renilla.

8. ENSAYOS DE MIGRACIÓN

8.1. Cicatrización de heridas

Se realizaron ensayos de reparación de heridas con células HMEC-1, HUVEC y CMLVs, mediante dos técnicas distintas.

Para analizar diferencias en la velocidad de reparación de las heridas entre diferentes tratamientos, los ensayos se realizaron en placas Ibidi especiales para migración (Culture-Insert μ -Dish 35 mm low, Ibidi). Estas placas permiten crear una herida de 500 μ m de grosor para cada condición. Se sembraron 70 μ l de suspensión celular (HMEC-1 a $4,5 \times 10^5$ células/ml y CMLVs a $2,5 \times 10^5$ células/ml) en cada pocillo. Al día siguiente, se extrajeron los insertos y se añadieron 800 μ l de medio con los diferentes tratamientos (**Figura 21**).

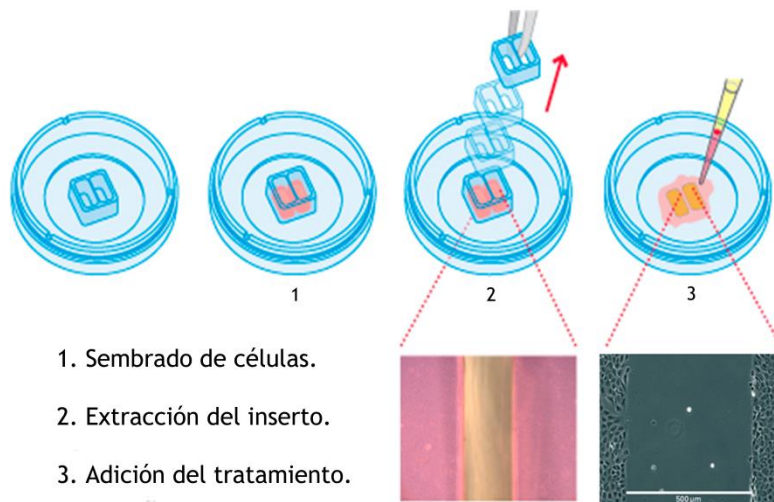


Figura 21. Procedimiento de los ensayos de migración en placas Ibidi Culture-Insert. Adaptado de www.ibidi.com [181].

Durante el proceso de migración, se capturaron imágenes a las 0, 2, 4, 6, 8 y 10 h, tiempo en el que se cerraron por completo las heridas. Las imágenes se adquirieron, digitalizaron y procesaron con un microscopio Leica DMIRE2 bajo el objetivo 10x y una cámara de vídeo SPOT Leica-DFC350FX. Las imágenes se analizaron con el programa ImageJ.

Por otro lado, se realizaron ensayos de migración con el objetivo de analizar los cambios de expresión génica y proteica producidos en las células. En estos casos, las células se cultivaron hasta la confluencia (90-95%). Después, se realizaron varias heridas de forma mecánica con una punta estéril de pipeta de 200 μ l, de manera que quedase la superficie de la placa cubierta de heridas para conseguir un porcentaje elevado de células en migración. A continuación, se lavaron los cultivos con PBS para eliminar las células muertas y se añadió el tratamiento correspondiente. Las células se dejaron migrar hasta el cierre completo de la herida o bien hasta un máximo de 24 h, según las condiciones del ensayo. Después de ese tiempo, se recogieron los sobrenadantes de los cultivos y las células para posterior análisis (**Figura 22**).

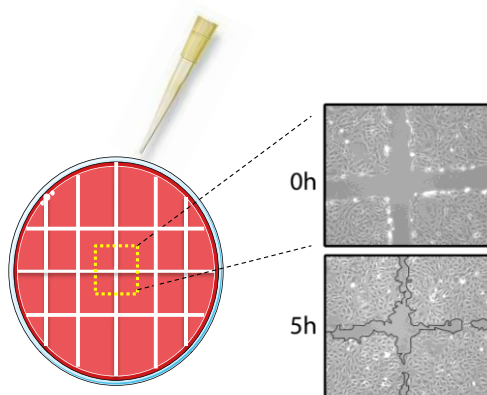


Figura 22. Esquema del ensayo de cicatrización de heridas mediante rasgado mecánico.

8.2. Migración con cámaras Boyden

El método de migración con cámaras Boyden consiste en un sistema formado por dos cámaras, una inferior y otra superior, que contienen una membrana de policarbonato con poros de 8 μ m. La superficie de las cámaras se trató con 10 μ g/ml de colágeno tipo I (Collagen Biomaterials) durante 2 h a 37 $^{\circ}$ C, 5% CO_2 y en atmósfera de humedad. Las CMLVs se mantuvieron en arresto durante 16 h y después se sembraron en las cámaras superiores, de 6,5 mm de diámetro, a una concentración de 5×10^4 células/pocillo, en 300 μ l de medio basal de fibroblasto (Clonetics) al 0,5% de albúmina de suero bovino (BSA). Las cámaras inferiores contenían medio condicionante de cultivos endoteliales que expresaban diferentes niveles de SMAD3 y ETS1. Después de 4 h a 37 $^{\circ}$ C, se eliminaron las células quiescentes de la cámara superior con un bastoncillo de algodón y las CMLVs migratorias de la cámara inferior se fijaron y se tiñeron

con Diff-Quick (VWR Scientific Products). El número total de células que habían migrado se determinó mediante el conteo de 5 campos distintos de cada pocillo, utilizando un microscopio óptico de contraste de fases (aumento, 20x), tal como describe Carrio *et al.* [182].

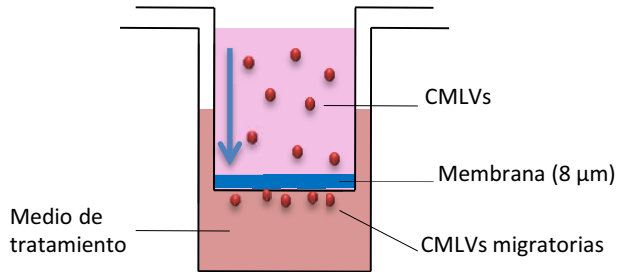


Figura 23. Esquema representativo del ensayo de migración con cámara de Boyden.

9. ANGIOGÉNESIS *IN VITRO*

9.1. Cultivo de células en un sistema tridimensional

Para simular condiciones no fisiológicas, las células fueron sembradas en sistemas tridimensionales (3DBM, *3 Dimensional Basement Membrane*) sobre una capa de Matrigel. El Matrigel deriva de células de sarcoma de ratón y está compuesto por laminina, colágeno IV, nidógeno/enactina y proteoglicanos, por lo que su composición es similar a la matriz extracelular de muchos tejidos. Para crear los cultivos 3DBM, se pretrataron placas con Matrigel durante 30 min a 37 °C, se sembraron las células y se dejaron depositar 30 min. Finalmente, se añadió el medio correspondiente al tratamiento con un 10% de matrigel.

Las CE en sistemas 3DBM son capaces de interactuar entre ellas y formar estructuras similares a vasos sanguíneos, llamados a partir de ahora tubos. La formación de tubos se estudió mediante la captación de imágenes a lo largo de 24 h, a través de un microscopio Leica DMIRE2 y una cámara Leica-DFC350FX. Se analizó la longitud de los tubos, la superficie cubierta y el número de nódulos (ramificaciones) presentes como parámetros de angiogénesis, utilizando el programa ImageJ.

A continuación se muestran dos ejemplos de formación de estructuras tubulares con células HMEC-1 y HUVEC (**Figura 24**).

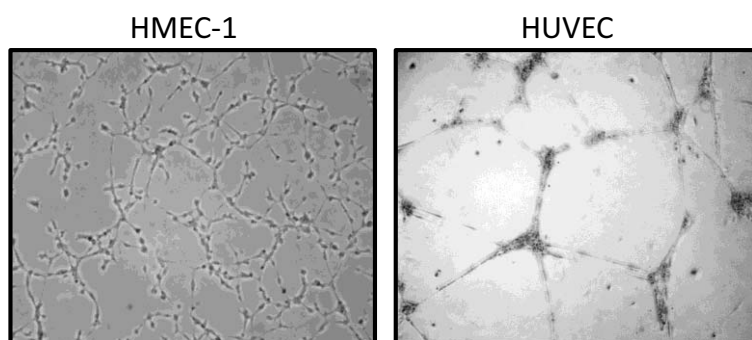


Figura 24. Formación de estructuras tubulares en un sistema de cultivo 3DBM. Ejemplos representativos de cultivos endoteliales de 24 h.

9.2. Tinción de células y determinación de cinéticas de movimiento

Los ensayos de angiogénesis *in vitro* permitieron también estudiar las cinéticas de movimiento entre células. Para este fin, se utilizaron sistemas 3DBM con dos tipos celulares: HMEC-1 y CMLVs o HMEC-1 y monocitos. Para diferenciar un tipo celular de otro, las células se marcaron con tinciones fluorescentes de membrana: PKH67, de color verde, y PKH26, de color rojo (Sigma-Aldrich) [183] (**Figura 25**). Los movimientos celulares de los cocultivos se determinaron mediante la captura de imágenes en intervalos de 10 min con un microscopio confocal de inversión y un objetivo PL APO 20x/0.7 multi-inmersión CS; el procesamiento de las imágenes se hizo con el programa TCS-AOBS de Leica.

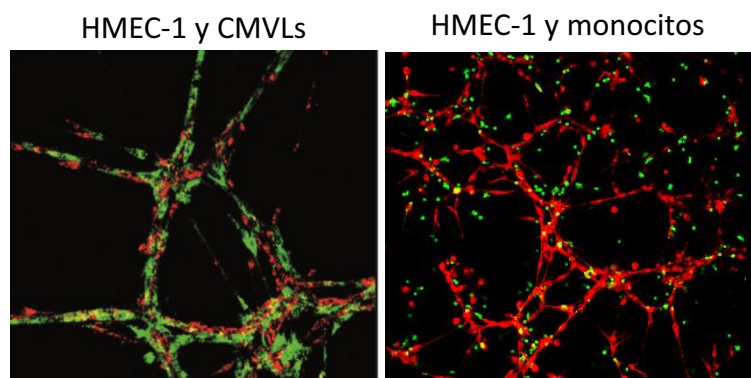


Figura 25. Tinción de células en cultivo 3DBM. A la derecha, un cocultivo de HMEC-1 (rojo) y CMLVs (verde), a la izquierda, un cocultivo de HMEC-1 (rojo) y monocitos (verde).

9.3. Extracción de células de los cultivos 3DBM

La extracción de células de los cultivos 3DBM se llevó a cabo con PBS 5mM de EDTA sin Ca^{2+} ni Mg^{2+} a 4 °C. Después, las células se resuspendieron en una cantidad apropiada del tampón de lisis celular adecuado para obtener ARN o proteína.

10. EFECTO DE LOS MONOCITOS SOBRE LAS CÉLULAS ENDOTELIALES

Para analizar el efecto que tienen los monocitos sobre las CEs en un contexto angiogénico, se plantearon varios ensayos en los que se pusieron en contacto los monocitos o su secretoma con CEs.

10.1. Separación de poblaciones de monocitos

Las diferentes poblaciones de monocitos (clásica, CD14⁺⁺CD16⁻; intermedia, CD14⁺⁺CD16⁺; y no-clásica CD14⁺CD16⁺⁺) se caracterizan por diferentes niveles de expresión de CD14 (receptor de LPS) y de CD16 (receptor FcγRIII) [63]. En nuestros estudios se separaron las poblaciones de monocitos según la presencia o ausencia de expresión de CD16, obteniendo un grupo de monocitos clásicos (CD16⁻) y un grupo de monocitos de clase intermedia y no-clásica (CD16⁺).

Se utilizó como método de separación columnas de selección magnética (MACS Columns MS y LD, Miltenyi Biotec) y el kit de aislamiento de células CD16⁺ (CD16⁺ Isolation kit, Miltenyi Biotec). Este método está basado en el uso de micropartículas superparamagnéticas, llamadas *Microbeads*, de 50 nm de diámetro, que están conjugadas con anticuerpos altamente específicos contra uno o varios antígenos de la superficie celular. Dado su reducido tamaño, las *Microbeads* no activan las células ni saturan los epítomos de la superficie celular. Además, no son tóxicas para las células y son biodegradables, de manera que no necesitan ser eliminadas tras su uso.

10.1.1. Principio de separación del método

El método de separación de poblaciones de monocitos permite el aislamiento de monocitos CD16⁺ a partir de PBMCs. Es importante destacar que entre el conjunto de PBMCs, varios tipos celulares expresan el antígeno CD16, entre ellos granulocitos (neutrófilos y eosinófilos), células Natural Killer (NK) y una proporción de linfocitos T [184]. Por este motivo, el aislamiento se llevó a cabo en dos pasos. Antes de la separación, las PBMCs se incubaron con un reactivo bloqueante de la fracción Fc (*Fc Blocking Reagent*), que evitaría uniones inespecíficas de los anticuerpos, y con un coctel de marcaje de células no monocitarias (*Non-Monocyte Depletion Cocktail*). Este coctel permitió

seleccionar neutrófilos, eosinófilos y NK y separarlos del conjunto de PBMCs a través de una columna con una matriz compuesta de esferas magnéticas unida a un separador magnético que crea un campo de atracción. Las células marcadas quedaron retenidas en la columna.

En un segundo paso, el eluido se incubó con *Microbeads* de marcaje CD16. De la misma manera que en el caso anterior, se llevó a cabo una separación magnética, en la cual las células CD16⁺ quedaron retenidas en la columna. Como paso final, la columna se extrajo del separador, suprimiendo así el campo magnético y las células retenidas fueron recuperadas.

Las especificaciones de las columnas y la concentración de células utilizadas están señaladas en la **Tabla 13**. La **Figura 26** muestra un esquema del procedimiento.

Tabla 13. Especificaciones de cada separación magnética.

Paso	Tipo de separación	Capacidad de marcaje	Capacidad total
1	Reducción	10 ⁸ células	5x10 ⁸ células
2	Selección positiva	10 ⁷ células	2x10 ⁸ células

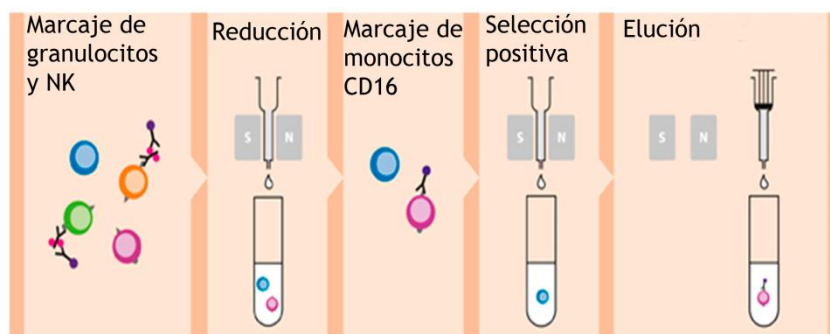


Figura 26. Procedimiento de separación magnética de poblaciones de monocitos por la expresión de CD16. Adaptado de www.miltenyibiotec.com [185].

Las dos poblaciones de monocitos se sembraron en medio RPMI 1640 GlutaMAX suplementado con el 10% de SH^A/_B, 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomina.

10.2. Obtención de medio condicionante de monocitos

Se recolectó el medio condicionante de los cultivos de monocitos (MCM) para utilizarlo como estimulación angiogénica de las CEs. El MCM se obtuvo de cultivos de monocitos tras 24 h en medio RPMI 1640 GlutaMAX suplementado con el 10% de SH^A/_B. Se centrifugó a 300 g, 10 min para eliminar restos celulares y se utilizó de forma inmediata.

10.3. Aislamiento y cuantificación de micropartículas positivas para factor tisular

Las micropartículas (MPs) celulares son vesículas generadas a partir de la membrana plasmática ante un estímulo o proceso apoptótico. La evaluación del FT presente en MPs se realizó mediante ultracentrifugación y posterior citometría de flujo. El protocolo utilizado permitió el aislamiento y el análisis de MPs de entre 100 nm y 1 µm de diámetro.

En primer lugar, se centrifugó el sobrenadante de los cultivos a 900 g, 15 min para eliminar cualquier resto celular. Después, se volvieron a centrifugar los sobrenadantes a 20.000 g, 45 min, sin freno. Se aspiró el sobrenadante resultante, dejando una pequeña cantidad de remanente (aproximadamente 100 µl por cada 10 ml de sobrenadante inicial). A esta cantidad se le añadieron 10 volúmenes de PBS-citrato 0,32%, pH 7,4. Se centrifugó de nuevo a 16.000 g, 30 min, sin freno. A continuación, se descartaron los sobrenadantes, dejando unos 100 µl de remanente. Puesto que las micropartículas secretadas exponen PS en la monocapa externa de la bicapa lipídica, la detección se realizó con anexina V, una proteína antiapoptótica que se une a la PS de forma Ca²⁺-dependiente. La tabla siguiente muestra los tubos de citometría que se analizaron con cada muestra.

Tabla 14. Marcajes necesarios para el análisis de MPs por citometría de flujo.

Tubo	Muestra	Anti-An.V	Anti-FT	Isotipo	Tampón Anexina	Citrato 0,32%
Control inespecífico de an. V	5 µl	5 µl	-	-	-	40 µl
An. V	5 µl	5 µl	-	-	40 µl	-
Control inespecífico de FT	5 µl	5 µl	-	5 µl	35 µl	-
FT	5 µl	5 µl	2,5 µl	-	37,5 µl	-

Tampón Anexina: Annexin Binding Buffer (BD Bioscience), Anticuerpo An.V: BD-horizon V450 Annexin V-Pacific Blue (BD Bioscience), Anticuerpo FT: Monoclonal mouse-anti-human TF-FITC (American Diagnostica).

El control de unión inespecífica se hizo en un tampón sin calcio. Se incubó cada muestra durante 30 min a temperatura ambiente, en la oscuridad y se inactivaron las reacciones con 450 µl del tampón correspondiente (Tampón An. V o citrato 0,32%). Inmediatamente, se analizaron las muestras por citometría de flujo, en un equipo FACSantoll™ Flow Cytometer (BD Bioscience), equipado con 3 láseres: un láser azul de 488 nm, un láser rojo de 633 nm y un láser violeta de 405 nm.

Las MPs fueron identificadas y cuantificadas en función de las características FSC/SSC (Detectores de dispersión frontal (*forward scatter*) y lateral (*side scatter*)) y basándonos en su tamaño, su unión a anexina V y su reactividad con el anticuerpo de FT. Los límites del subgrupo de MPs, llamado *gate*, se establecieron con el kit de calibración Flow-Check Size Range Calibration Kit (Polysciences) [186]. El umbral de límite de detección inferior fue establecido por encima del ruido de fondo del citómetro. La utilización de controles isotipo permitió determinar los eventos positivos para FT. Los datos se analizaron con el programa FACSDiva™ (BD Bioscience). La concentración de MPs se determinó siguiendo el procedimiento de Nieuwland [90].

11. EFECTO DE LAS CÉLULAS ENDOTELIALES SOBRE LOS MONOCITOS

11.1. Obtención de medio condicionante de HMEC-1

El medio condicionante de células HMEC-1 se obtuvo a partir de cultivos en monocapa de células (60 y el 90% de confluencia) que sobreexpresaban flTF y asTF (consultar apartado 5 de materiales y métodos, sobreexpresión génica por transducción viral). Las células fueron incubadas con medio EGM-2 Bulletkit (Lonza) durante 48 h. Los sobrenadantes se centrifugaron a 127 g, 5 min para eliminar los restos celulares y se utilizaron inmediatamente.

11.2. Expansión de la población de monocitos CD16⁺

Para comprobar la capacidad de expansión de los monocitos CD16⁺ ante un estímulo angiogénico, se cultivaron monocitos con diferentes dosis de medios condicionantes de HMEC-1. La **Tabla 15** especifica la composición de cada dosis en los tratamientos administrados.

Tabla 15. Dosis aplicadas en cada tratamiento a los monocitos.

Dosis	M. condicionante	M. fresco	HS ^A / _B
0%	0 ml	2 ml	10 %
25%	0,5 ml	1,5 ml	10 %
50%	1 ml	1 ml	10 %
75%	1,5 ml	0,5 ml	10 %
100%	2 ml	0 ml	10 %

Se analizaron los cambios de expresión de CD16 por citometría de flujo. Las células fueron recogidas de las placas con PBS/EDTA 0,53 mM e incubadas a una concentración de 5×10^5 células/100 μ l durante 30 min con el anticuerpo monoclonal murino anti-humano CD16-FITC (Inmunotools, dilución 1:10) después de 0, 4, 12 y 24 h de tratamiento. En cada ocasión, las muestras se incubaron con un anticuerpo isotipo IgG a la misma concentración, que fue utilizado como control negativo del análisis. Se capturaron como mínimo 10.000 eventos en un citómetro de flujo Epics XL Flow Cytometer equipado con un láser de argón de 488 nm.

11.3. Transdiferenciación y caracterización de monocitos a células con fenotipo endotelial.

Para estudiar el efecto de los estimulantes angiogénicos secretados por las CEs sobre cada población de monocitos, se separaron las dos poblaciones de monocitos CD16⁻ y CD16⁺, y se sembraron sobre placas pretratadas con 10 µg/ml de fibronectina humana (Sigma Aldrich) en medio completo de monocitos. A las 2 h, se lavaron las placas y se añadieron los diferentes tratamientos: medios condicionantes de HMEC-1 o medio EGM-2 Bulletkit (Lonza) suplementado con 50 nM de proteína FT humana recombinante (Prospec), 50 ng/ml de proteína CCL2 humana recombinante (ImmunoTools) o bien un coctel de TNFα (4 ng/ml, Sigma Aldrich), VEGF (50 ng/ml, R&D Systems) y bFGF (50 ng/ml, R&D Systems), que se utilizó como control positivo de diferenciación de monocitos a ELCs [74]. Se utilizó como control negativo medio completo de monocitos, que permite su diferenciación a macrófagos. Todos los cultivos se suplementaron con un 10% SH^A/_B.

El medio se renovó cada 48 h y se mantuvieron en cultivo 10 días. Se obtuvieron imágenes de los cultivos a diario, se digitalizaron y procesaron con un microscopio Leica DMIRE2 unido a una cámara de vídeo SPOT Leica-DFC350FX y bajo el objetivo 10x. A partir del día 8, las células que adquirieron morfología de huso (alargada, que va adelgazándose desde el centro hacia las puntas), se contabilizaron con el programa ImageJ.

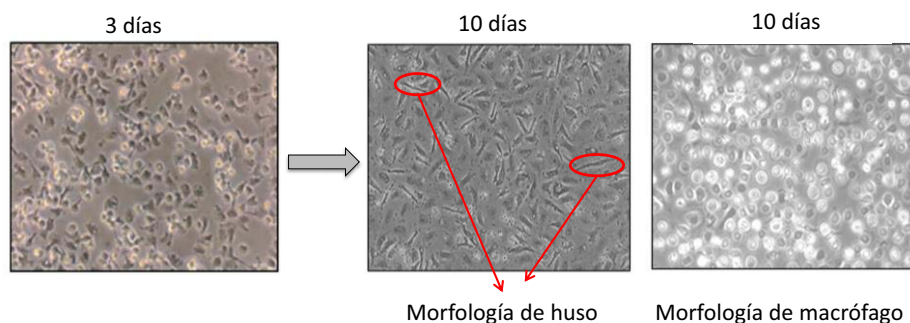


Figura 27. Ejemplo representativo del cambio de morfología observada en monocitos.

Los cultivos de ELCs fueron analizados por citometría de flujo. Las células se recogieron con PBS/EDTA 0,53 mM y se incubaron a una concentración de 5×10^5 células/100 µl con los anticuerpos de superficie anti-VE-Cadherina-PE

(eBioscience, dilución 1:20) y anti-vWF-FITC (Abcam, dilución 1:20) durante 30 min, a temperatura ambiente, protegidos de la luz, y con el anticuerpo interno anti-eNOS-PE (BD Bioscience, dilución 1:10), utilizando el kit de permeabilización y fijación IntraCell (Inmunostep). Para cada caso, se captaron como mínimo 10.000 eventos con el equipo Epics XL Flow Cytometer y un láser de argón de 488 nm. En cada caso, las muestras fueron incubadas con un anticuerpo isotipo IgG a la misma concentración, que se utilizó como control negativo.

12. INMUNOPRECIPITACIÓN DE CROMATINA

La técnica de inmunoprecipitación de cromatina permite analizar la unión de determinados factores de transcripción a una secuencia determinada del ADN o a un elemento de respuesta dentro de un promotor en condiciones *in vivo*.

Los estudios de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) se llevaron a cabo utilizando el kit ChIP assay (Millipore). Las células HMEC-1 se sembraron a una concentración de $2,5 \times 10^6$ células/placa 100 mm y al día siguiente se fijaron con paraformaldehído al 1%, durante 10 min, a temperatura ambiente. La reacción de fijación se detuvo con 125 mM de glicina y las células se recogieron con PBS a 4 °C suplementado con inhibidores de proteasas (Complete, Mini, EDTA-free (Roche)). En ese momento, se realizaron una serie de centrifugaciones a 1350 g, 5 min, a 4 °C, y los botones celulares se resuspendieron en sucesivos tampones de lisis (**Tabla 16**).

Primero, se realizó la lisis de la membrana celular. Después, se utilizó un tampón para eliminar los detergentes de la solución y a continuación, se realizó la lisis de los núcleos celulares. Acto seguido, se sonicaron las muestras a una intensidad de 7-8 V (Microson Ultrasonic Cell Disruptor) para romper los fragmentos de ADN y se añadió Tritón X-100 al 1%. Se comprobó que los fragmentos de ADN obtenidos tuvieran un tamaño entre 500 y 1000 pb mediante un gel de agarosa al 1,5%.

Se lavaron 50 μ l de bolas de agarosa acopladas a proteína A/G (Santa Cruz Biotechnology) con 950 μ l de PBS y se centrifugaron 1000 g, 1 min. Se repitió el lavado 3 veces. Finalmente, se resuspendieron las bolas en tampón de dilución (**Tabla 16**).

Tabla 16. Soluciones para la lisis celular y resuspensión de las bolas de agarosa.

Tampón lisis membrana celular		Tampón eliminación de detergentes	
Hepes-KOH pH 7,5	50 mM	Tris-HCl pH 8.0	10 mM
NaCl	140 mM	NaCl	200 mM
EDTA	1 mM	EDTA	1 mM
Glicerol	10%	EGTA	0,5 mM
NP40	1%	Inh. Proteasas	1%
Triton X-100	0,3%		
Inh. Proteasas	1%		
Tampón lisis núcleos		Tampón dilución de bolas agarosa	
Tris-HCl pH 8.0	10 mM	Tris-HCl pH 8.0	16,7 mM
NaCl	100 mM	NaCl	167 mM
EDTA	1 mM	EDTA	1,2 mM
EGTA	0,5 mM	Triton X-100	1%
Na-Deoxycholate	0,1%	SDS	0.01%
N-lauroylsarcosine	0,5%	Inh. Proteasas	1%
Inh. Proteasas	1%		

A continuación, se diluyeron 100 µl de ADN fragmentado con 900 µl de la solución con las bolas de agarosa, y se incubó la mezcla durante 30 min, a 4 °C, en agitación. Este paso permitió disminuir las interacciones inespecíficas generadas por las bolas. Después, se centrifugó a 1000 g, 1 min y se recuperó el sobrenadante, eliminando el precipitado de bolas. Se recogieron 50 µl de la muestra como *input* (cantidad de referencia de material de partida) y se añadieron 4 µg del anticuerpo anti-ETS1 (Santa Cruz, dilución 1:50) a la muestra restante, como control negativo se usó un isotipo IgG a la misma concentración. Se incubó la mezcla durante 16 h a 4 °C en rotación. Al día siguiente, se añadieron 50 µl de bolas de agarosa lavadas como se ha descrito y se incubaron las muestras durante 1 h a 4 °C, en rotación, permitiendo la unión entre las bolas y el anticuerpo. Transcurrido este tiempo, se centrifugaron los tubos a 1000 g, 1 min, a 4 °C.

El precipitado, que contenía los complejos anticuerpo-proteína-ADN acoplados a las bolas de agarosa, se lavó durante 5 min, a 4 °C, en agitación con 1 ml de los tampones indicados en la **Tabla 17**, sucesivamente.

Tabla 17. Tampones de lavado de los complejos anticuerpo-proteína-ADN.

1- Tampón de lavado bajo en sales		2- Tampón de lavado concentrado en sales	
SDS	0,1%	SDS	0,1%
Triton X 100	1%	Triton X 100	1%
EDTA	2 mM	EDTA	2 mM
Tris-HCl pH 8,0	20 mM	Tris-HCl pH 8,0	20 mM
NaCl	150 mM	NaCl	500 mM
3- Tampón de lavado LiCl		4- Tampón Tris-EDTA	
LiCl	0,5 M	Tris-HCl pH 8,0	10 mM
NP40	1%	EDTA	1 mM
Desoxicolato	1%		
EDTA	1 mM		
Tris-HCl pH 8,0	20 mM		

El precipitado final se resuspendió en 200 μ l de tampón de elución (SDS 1%, NaHCO_3 100 mM) y se incubó durante 15 min a 65 $^\circ\text{C}$ en agitación. Se aplicó el mismo procedimiento a las muestras *input*. Se centrifugaron los tubos a 18.200 g, durante 1 min y se recuperó el sobrenadante.

Para revertir la unión entre proteína y ADN, se añadió primero NaCl (200 mM) y se incubaron las muestras durante 4 h, a 65 $^\circ\text{C}$ en agitación, y después, Tris-HCl pH 6,5 1M, EDTA 0,5 M, y Proteinasa K 10 mg/ml, y se incubaron las muestras 1 h a 45 $^\circ\text{C}$. El ADN se purificó mediante extracción por columna (PCR purification kit, Qiagen).

Finalmente, el ADN extraído se analizó por PCR a tiempo real utilizando la FastStart Universal SYBR Green Master (Roche) con los oligonucleótidos de ETS1 (consultar apartado 15.5 de materiales y métodos, PCR por SYBR Green). Se cuantificó por PCR a tiempo real la cantidad relativa de ADN de las muestras precipitadas con anticuerpos específicos y con IgG (controles negativos) respecto al ADN-carga (*input*).

13. INMUNOPRECIPITACIÓN DE WNT5A-S³⁵-METIONINA/CISTEÍNA

Una forma de determinar la cantidad de Wnt5a secretada por monocitos y captada por las CEs fue mediante el marcaje radioactivo de esta proteína en el MCM utilizado para tratar las HMEC-1. El protocolo fue el siguiente: primero, se cultivaron monocitos con medio RPMI 1640 libre de metionina (Life Technologies) al 10% de SH^A/_B. Se añadió a los cultivos 0,65 mCi de S³⁵-metionina/cisteína de un hidrolizado de *E. Coli* (NEG 772, Perkin Elmer) para marcar radioactivamente la proteína Wnt5a de nueva síntesis que se secreta al medio. Tras 16 h, se recogieron los sobrenadantes, se centrifugaron a 300 g, 10 min, para eliminar restos celulares, y se trataron los cultivos de HMEC-1 con el MCM durante 4 h.

A continuación, se procedió al inmunoprecipitado de las proteínas celulares. Tanto los monocitos como las HMEC-1 se lisaron con tampón RIPA, que solubiliza las proteínas, suplementado con inhibidores de proteasas (Complete, Mini, EDTA-Free; Roche). El extracto celular se centrifugó a 14.000 g, 10 min, a 4 °C. Después, las muestras se incubaron con el anticuerpo mouse-anti-Wnt5a (Abcam, dilución 1:200) toda la noche y se añadió 20 µl de proteína G-sefarosa a cada muestra. Se incubó la mezcla a 4 °C, durante 3 h y se lavó 5 veces con tampón RIPA. De esta forma, se consiguió un inmunoprecipitado de Wnt5a que sería analizado posteriormente por western blot.

Los sobrenadantes marcados se concentraron utilizando el equipo Amicon Ultra-4 centrifugal filter 3K (Millipore) y se cargaron en un gel SDS-PAGE. Estos geles se fijaron con un 10% de ácido acético y un 20% de metanol, se sometieron a 50 °C durante 2 h y fueron visualizados con el equipo Typhoon FLA9500 Phosphorimager (GE Healthcare Life Sciences).

14. MOVILIZACIÓN DE CALCIO INTRACELULAR

Con el objetivo de determinar la vía de señalización de Wnt5a que tiene lugar en CEs, se midió la movilización del Ca^{2+} intracelular en HMEC-1 en presencia de proteína Wnt5a.

Para ello, los cultivos HMEC-1 se trataron con Fluo-4 AM (5 μM , Life Technologies) en presencia o ausencia de proteína Wnt5a humana recombinante (200 ng/ml, Abcam) durante 15 min a 37 °C, 5% de CO_2 y atmósfera de humedad. Los cambios en la intensidad de fluorescencia Fluo-5, emitidos a una longitud de onda de 485 nm, se midieron por microscopía confocal (Leica TCS SP2-AOBS) con un objetivo de multi-inmersión 20x/0,7. Se obtuvieron medidas de las regiones intracelulares de interés.

15. ANÁLISIS DE LOS NIVELES DE ARN MENSAJERO

15.1. Obtención de ARN celular

El ARN fue obtenido mediante la técnica de extracción RNeasy isolation kit (Qiagen), siguiendo las instrucciones del fabricante. Esta técnica permite la purificación eficiente del ARN combinando la lisis celular del isotiocianato de guanidina, que desnaturaliza ARNasas, con la retención del ARN en una membrana de sílice.

Las cultivos celulares se lisaron con el reactivo RLT (tampón de lisis que contiene tiocianato de guanidina) suplementado con β -mercaptoetanol (10 μ l/ml). Se rasparon las placas y el contenido se pasó a través de una aguja de diámetro 20G para conseguir un mayor lisado celular. Después, se añadió un volumen de etanol al 70%, y las muestras se añadieron a las columnas, en las que el ARN quedó retenido en la membrana. Se realizaron varias centrifugaciones y lavados para eliminar posibles contaminantes. Finalmente, el ARN se eluyó con H₂O libre de ARNasas. Una vez extraído el ARN, las muestras se congelaron a -80 °C hasta su análisis.

15.2. Cuantificación del ARN

Para cuantificar el ARN extraído de los cultivos se utilizó el espectrofotómetro NanoDrop 2.000 (Thermo Scientific), que permite determinar la concentración y pureza del ARN. Los ácidos nucleicos presentan una absorbancia máxima a 260 nm, aunque dependiendo de la cantidad de contaminantes de la muestra, el valor puede detectarse a 230 nm (longitud de onda mínima). Por otro lado, las proteínas tienen un máximo de absorción a 280 nm (principalmente por residuos de triptófano). Las lecturas a esta longitud pueden mostrar si existe algún contaminante proteico. Mediante el coeficiente entre las absorbancias a 230 nm y 260 nm se determinó la concentración del ARN, mediante el coeficiente entre las absorbancias a 260 nm y 280 nm se determinó la pureza. Se consideró como pureza adecuada los valores de A₂₆₀/A₂₈₀ aproximados a 2,0.

15.3. Síntesis del ADNc

Se realizó la síntesis de ADNc a partir de 1 µg de ARN, por transcripción reversa, utilizando el kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems). Se utilizaron secuencias aleatorias (*Random primers*) como oligonucleótidos y la enzima Multiscribe™ RT (50 U/ml) como transcriptasa reversa.

Tabla 18. Reactivos necesarios para la transcripción reversa del ARN.

Reacción de Transcripción Reversa	
Tampón retrotranscripción	2,0 µl
Mezcla dNTPs 25 mM	0,8 µl
<i>Random Primers</i> 3µg/µl	2,0 µl
Multiscribe™ RT	1,0 µl
H ₂ O libre de ARNasas	4,2 µl
ARN	1 µg/10 µl
TOTAL	20 µl

Se utilizó como control negativo una muestra con 10 µl de H₂O libre de ARNasas que se sometió al mismo procedimiento que las muestras de ARN. La mezcla se incubó en un equipo termociclador GeneAMP 9700 (Applied Biosystems) con el siguiente programa:

Tabla 19. Programa de síntesis del ADNc

Temperatura	Tiempo
25 °C	10 min
37 °C	120 min
85 °C	5 min
4 °C	indefinido

15.4. PCR a tiempo real por TaqMan® Gene Expression Assay

La expresión relativa de ARNm de los genes estudiados fue determinada mediante PCR a tiempo real con el método de TaqMan® Gene Expression Assay (Applied Biosystems), el equipo de detección ABIPRISM 7900HT y el programa SDS 2.4 (Applied Biosystems).

Este método permite medir a tiempo real la amplificación de productos a través de un sistema de dos oligonucleótidos cebadores y una sonda específica

MATERIAL Y MÉTODOS

para la secuencia diana. La sonda tiene un fluoróforo en su extremo 3' y una molécula inhibidora o *quencher* en el 5' que bloquea la emisión de fluorescencia por su proximidad al extremo 3' (10 nucleótidos). Esta sonda marcada hibrida específicamente en la parte central del producto de PCR a obtener. De este modo, cuando se efectúa la PCR, la sonda no emite fluorescencia hasta que la polimerasa la encuentra y la hidroliza mediante su actividad exonucleasa 5'-3', lo que provoca la separación del *quencher* del fluorocromo y la emisión de fluorescencia.

En todos los procedimientos de PCR a tiempo real, se incluyó una sonda de un gen endógeno control: GAPDH (Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa) o 18S (gen eucariótico ribosomal), además de las sondas correspondientes a los genes de estudio, para cuantificar los resultados obtenidos. Generalmente, estos genes control se expresan de forma constante e independientemente de las condiciones experimentales.

Los reactivos necesarios se recogen en la **Tabla 20**.

Tabla 20. Mezcla de reacción para PCR a tiempo real.

Reactivos	Análisis genes endógenos	Análisis genes de estudio
TaqMan® Universal PCR Master Mix	10 µl	10 µl
Sonda TaqMan®	1 µl	1 µl
H ₂ O libre de ARNasas	8 µl	7 µl
ADNc	1 µl	2 µl
TOTAL	20 µL	20 µL

Las condiciones en las que se llevaron a cabo las PCR a tiempo real fueron las siguientes:

Tabla 21. Descripción del programa de PCR a tiempo real.

Número de ciclos	Temperatura	Tiempo
1	50 °C	2 min
1	95 °C	10 min
45	95 °C	15 seg
1	60 °C	1 min

A continuación se recogen las sondas TaqMan® utilizadas:

Tabla 22. Sondas TaqMan® utilizadas en la PCR a tiempo real.

Sonda	Especie	Referencia	Casa comercial
18S	Humano/ Ratón	4319413E	Applied Biosystems
asTF	Humano	Petición específica [187]	IDT
CCL2	Humano	Hs00234140_m1	Applied Biosystems
CCL2	Humano	PPH00192E	Sabiosciences
ETS-1	Humano	Hs0048287_m1	Applied Biosystems
fITF	Humano	Petición específica [187]	IDT
GAPDH	Humano	432631E	Applied Biosystems
GAPDH	Humano	PPH00150E	Sabiosciences
Integrina β 1	Humano	Hs00559595_m1	Applied Biosystems
SMAD3	Humano	Hs00969210_m1	Applied Biosystems
TF	Humano	Hs00175225_m1	Applied Biosystems
TF	Ratón	Mm00438853_m1	Applied Biosystems

15.5. PCR a tiempo real por SYBR-Green

El SYBR-Green es un agente intercalante que se introduce en la estructura secundaria de la doble hélice del ADN y se acopla a los ácidos nucleicos que lo forman, de manera que se incrementa notablemente su tasa de emisión fluorescente. El complejo resultante ADN-SYBR-Green presenta un pico de absorción a 498 nm y un pico de emisión a 522 nm. Asimismo, los productos generados durante la reacción de PCR se pueden detectar y cuantificar en cada fase de síntesis del ADN, lo que permite conocer la expresión relativa de los ARNm.

La reacción de PCR se preparó mezclando el ADN purificado de los ensayos ChIP (apartado 13), los oligonucleótidos de ETS-1: *forward* 5' – GGAAAAGTGTCTCGTCCTGA – 3' y *reverse* 5' – TTATTGAAAGCGGGCAGAGG – 3' y la mezcla FastStart Universal SYBR Green Master (Roche). Esta mezcla contiene el resto de elementos necesarios para la reacción de PCR, incluyendo el agente intercalante SYBR Green y el fluoróforo ROX, que sirve de referencia pasiva.

Se realizó la PCR a tiempo real utilizando el programa indicado en la **Tabla 23**. La curva de disociación sirvió para determinar que las amplificaciones se habían realizado correctamente. La lectura se hizo con el equipo 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems).

Tabla 23. Programas de PCR a tiempo real con la técnica de SYBR Green.

Programa de PCR			Curva de disociación	
Número de ciclos	Temperatura	Tiempo	Temperatura	Tiempo
1	95 °C	10 min	95 °C	15 seg
40	95 °C	10 seg	60 °C	15 seg
1	60 °C	30 seg	95 °C	15 seg

15.6. Cuantificación

Para cuantificar los niveles de expresión génica obtenidos, se utilizó una cuantificación relativa de los niveles de ARNm. Este tipo de cuantificación mide los cambios en el estado basal de un gen de interés respecto al gen de expresión endógena. Para realizar este análisis es necesario normalizar los datos obtenidos en el gen de estudio y el endógeno. Para ello se realizó el método comparativo de Ct ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) [188].

16. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN PROTEICA

16.1. Obtención de muestras proteicas de cultivos celulares

Para extraer la proteína de células cultivadas en monocapa, se lavaron las placas con PBS y se añadió una cantidad adecuada de tampón de lisis RIPA suplementado con inhibidores de proteasas (Roche) (aproximadamente unos 250 µl/placa de 100 mm). Se rasparon las placas y el contenido se sonicó con el equipo Microson Ultrasonic cell disruptor XL a una intensidad de 7-8 V, para conseguir un mayor lisado celular. Las proteínas se guardaron a -20 °C hasta su análisis.

16.2. Subfraccionamiento nuclear y citoplasmático

La obtención de los extractos celulares de citoplasma y núcleo se realizó de la siguiente manera: en primer lugar, para obtener la fracción nuclear, las células se lavaron en PBS y se les añadió 1 ml de tampón CSK (*Cytoskeleton*, **Tabla 24**). Después se incubaron 20 min, en agitación constante, a 4 °C y se recogieron con la ayuda de una espátula. Se centrifugó la suspensión a 15.700 g, durante 10 min, a 4 °C. El sobrenadante resultante, correspondiente a la fracción citoplasmática, se almacenó a -20 °C y el precipitado, la fracción nuclear, se resuspendió en 100 µl de tampón soluble/insoluble (**Tabla 24**) y se incubó 10 min más, a 100 °C. Finalmente, se añadieron 100 µl del tampón CSK y la fracción nuclear también se almacenó a -20 °C hasta su análisis.

Tabla 24. Composición de los tampones utilizados para el subfraccionamiento celular.

TAMPÓN CSK		TAMPÓN SOLUBLE/INSOLUBLE	
Reactivo	Concentración	Reactivo	Concentración
NaCl	50 mM	Tris pH 7.5	15 mM
Pipes pH 6.8	10 mM	EDTA	5 mM
MgCl ₂	3 mM	EGTA	2,5 mM
Triton x100	0,5 %	SDS	10 µl/ml
PMSF	1,2 mM		
Sacarosa	300 mM		
Inhibidor de proteasas*	1%		

*Complete, Mini, EDTA-free (Roche).

16.3. Precipitación de proteínas de sobrenadantes celulares

Se preparó un precipitado de las proteínas del sobrenadante de los cultivos con el fin de aumentar su concentración. La precipitación consiste en la conversión de proteínas solubles a estado insoluble. La alteración de la solubilidad de una proteína puede lograrse modificando el pH, la temperatura o la fuerza iónica de la suspensión, o bien mediante la agregación de disolventes. En nuestro caso, se precipitaron las proteínas de los sobrenadantes mediante el agregado de un solvente orgánico, la acetona, que reduce drásticamente la solubilidad de las proteínas.

El procedimiento a seguir fue el siguiente: se preparó una mezcla (1:7, v/v) de la muestra y la acetona preenfriada a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, respectivamente. Después, la mezcla se mantuvo a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 2 h y a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 15 min, antes de centrifugarlas a 18.500 g, durante 15 min más, a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. A continuación, se eliminó el sobrenadante y se evaporaron los restos de acetona hasta la sequedad, a temperatura ambiente. Finalmente, el precipitado se disolvió en una cantidad apropiada de tampón RIPA suplementado con inhibidores de proteasas.

16.4. Cuantificación de las muestras

Se realizó la cuantificación de proteínas por el método del ácido bicinonínico (BCATM protein assay reagent, Pierce) basado en el método de Lowry [189], que emplea la reacción de Biuret (reducción de Cu^{2+} a Cu^{1+} por proteínas en medio básico) combinada con una reacción colorimétrica, en la que dos moléculas de ácido bicinonínico se unen a un ion Cu^{1+} , dando un producto de color púrpura. Se preparó una recta patrón con proteína BSA. Tanto las muestras como la recta patrón se incubaron con el reactivo correspondiente, siguiendo las instrucciones del fabricante, 30 min, a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, y se leyeron las absorbancias espectrofotométricas a 652 nm con el programa SoftMax (Molecular Devices).

16.5. Western Blot

La electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS descrita por Laemmli [190] es una técnica básica para la separación de proteínas según su peso molecular a través de una matriz de poliacrilamida. La metodología empleada se detalla a continuación: se prepararon extractos proteicos de $25\text{ }\mu\text{g}$ /muestra que se

calentaron a 95 °C durante 5 min en tampón de carga para desnaturalizar las proteínas, dándoles una condición reductora debido a la presencia del β -mercaptoetanol.

Tabla 25. Composición del tampón de carga de las proteínas.

TAMPÓN DE CARGA
250 mM Tris 0,5 M pH 6,8
10% SDS
12,5% β -mercaptoetanol
0,5% azul de bromofenol
50% glicerol

A continuación, se realizó una electroforesis discontinua, formada por dos geles de poliacrilamida con dodecil-sulfato sódico (SDS-PAGE), uno apilador (4% de poliacrilamida) que se encargó de concentrar las muestras en una banda estrecha, y un gel separador (10% - 12% de acrilamida) en el que las proteínas quedaron separadas según su peso molecular.

Tabla 26. Composición de los geles de acrilamida/bisacrilamida.

GEL SEPARADOR (10%)		GEL APILADOR (4%)	
Reactivo	Volumen	Reactivo	Volumen
Tris-HCl 1,5 M pH 8,8	1,25 ml	Tris-HCl 0,5 M pH 6,8	500 μ l
Acrilamida/Bisacrilamida*	1,67 ml	Acrilamida/Bisacrilamida	260 μ l
SDS 10%	50 μ l	SDS 10%	20 μ l
H ₂ O destilada*	2,01 ml	H ₂ O destilada	1,22 ml
Persulfato amónico 15%	25 μ l	Persulfato amónico 15%	10 μ l
TEMED	2,5 μ l	TEMED	2 μ l

*En función del porcentaje de acrilamida del gel, se ajustaron las cantidades de acrilamida y H₂O.

Una vez separadas, las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa a través de la aplicación de un voltaje de 400 mA durante 2 h, a 4 °C. Para comprobar la eficiencia de la cantidad de proteína transferida, se tiñeron las membranas con solución de Ponceau (Fluka) y se lavaron con H₂O destilada.

A continuación, se procedió a la incubación con anticuerpos para detectar las proteínas de estudio. Las membranas se incubaron durante 1 h con solución bloqueante (Fracción V de albúmina bovina (BSA, MP Biomedical) al 5% en

tampón de lavado TBS–Tween 0,05%) para evitar uniones inespecíficas y se incubaron en agitación suave con los anticuerpos primarios (especificaciones en la **Tabla 27**). Después, se lavaron las membranas con TBS-Tween 0,05% (dos veces, 5 min) y con TBS (dos veces, 5 min) a temperatura ambiente y en agitación fuerte, para eliminar el exceso de anticuerpo. Por último, se incubaron las membranas durante 1 h con los anticuerpos secundarios correspondientes unidos a peroxidasa de rábano (*HRP*) y se repitieron los lavados.

Finalmente, se añadió a las membranas Supersignal™ West Dura (Pierce) durante 5 min, protegidas de la luz. Así, se produjo una reacción quimioluminiscente que fue cuantificada mediante el sistema ChemiDoc™ XRS (Bio-Rad) y el software Quantity One (Bio-Rad).

Tabla 27. Especificaciones de los anticuerpos utilizados para western blot.

ANTICUERPOS PRIMARIOS			
Nombre	Tipo	Dilución	Casa comercial
Anti-β-actina	Policlonal	1:5000	Abcam
Anti-β-catenina	Monoclonal	1:1000	BD Biosciences
Anti-Akt	Policlonal	1:1000	Cell Signaling
Anti-CCL2/MCP-1	Monoclonal	1:250	R&D Systems
Anti-CCR2	Policlonal	1:1000	Abcam
Anti-ETS-1	Monoclonal	1:500	Abcam
Anti-fosfo MAPK (Thr202/Tyr204)	Policlonal	1:2000	Cell Signaling
Anti-fosfo NF-κB p65 (Ser ⁵³⁶)	Monoclonal	1:1000	Cell Signaling
Anti-fosfo SMAD3	Policlonal	1:1000	Cell Signaling
Anti-fosfo-Thr38 ETS-1	Policlonal	1:1000	Novus Biologicals
Anti-Frizzled 5	Policlonal	1:1000	Abcam
Anti-LRP5	Monoclonal	1:500	Abcam
Anti-p44/42 MAPK (137F5)	Policlonal	1:1000	Cell Signaling
Anti-NFAT	Monoclonal	1:1000	Cell Signaling
Anti-NF-κB p65	Monoclonal	1:1000	Cell Signaling
Anti-PAR2	Monoclonal	1:1000	Santa Cruz Biotech.
Anti-SMAD3	Policlonal	1:1000	Cell Signaling
Anti-TF	Policlonal	1:1000	American Diagnostica
Anti-Wnt5a	Monoclonal	1:500	Abcam
ANTICUERPOS SECUNDARIOS			
Nombre	Tipo	Dilución	Casa comercial
Donkey-anti-rabbit-HRP	Policlonal	1:5000	Dako
Goat-anti-mouse-HRP	Policlonal	1:10000	Dako
Goat-anti-rabbit-HRP	Policlonal	1:10000	Dako
Rabbit-anti-goat-HRP	Policlonal	1:10000	Dako
Rabbit-anti-mouse-HRP	Policlonal	1:10000	Dako

Las membranas se deshibridaron después de cada uso con glicina acídica y se trataron con el anticuerpo anti- β -actina y su correspondiente anticuerpo secundario, como control endógeno. Se revelaron como se ha descrito anteriormente.

16.6. ELISA de CCL2

Dado que la proteína CCL2 es secretada al medio extracelular, se cuantificó la cantidad de esta proteína presente en los sobrenadantes de los cultivos celulares por medio del kit de ELISA Quantikine® Human CCL2/MCP-1 (R&D Systems).

17. ENSAYOS IN VIVO

17.1 Angiogénesis *in vivo*

Con el objetivo de validar los resultados *in vitro*, se llevaron a cabo ensayos *in vivo* en ratones *nude* (*nu/nu*). Estos ratones tienen un timo no funcional que produce un número reducido de linfocitos T y resultan muy útiles para estudios de trasplante o inserciones de células humanas.

Se utilizaron cepas de ratones machos (R/Sopf, Balb/c, *nu/nu*, CBy.Cg-Foxn1 *nu/j*, Charles River Laboratories) de 6-7 semanas. Los animales fueron mantenidos en condiciones de luz/oscuridad estándar (ciclos de 12 h luz / 12 h oscuridad) a una temperatura de $21\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ y fueron alimentados *ad libitum* con una dieta comercial estándar (Harlan Iberica SL). La manipulación de los animales y la eliminación de los cadáveres se realizó de acuerdo con los principios y directrices establecidos por la *American Physiological Society for Animal Research*, y aprobados por el comité de ética, cumpliendo la ley 5/1995 del 21 de junio aprobada por la Generalitat de Catalunya.

Se realizaron experimentos para analizar la formación de tubos. Para ello, se prepararon suspensiones de 10^7 células HMEC-1 junto con CMLVs o con monocitos (proporción 1:1), así como suspensiones de $2,5 \times 10^6$ EOMA, en 300 μl de matrigel. Las células se inocularon en los ratones de forma subcutánea en la región dorsal. Los implantes de matrigel rápidamente se compactaron formando una esfera llamada *plug*. Los animales se sacrificaron en los días 1, 4 y 7 posteriores al implante para verificar que los *plugs* mantenían un estado intacto y para determinar que las modificaciones génicas realizadas en las células se mantenían a lo largo de todo el experimento, siguiendo las descripciones de Adini *et al.* [191]. A los 7 días del implante, se sacrificó el resto de animales. Tanto los *plugs* como la piel que los envuelve fueron fotografiados con una cámara digital DFC, de 8 bits de resolución y objetivo de 1,0 x 0,03; 1,0 x 0,09 y un microscopio Leica AF 6000 LX Stereo (**Figura 28**). Después, se extrajeron la piel y los *plugs* y se trataron para su posterior análisis.

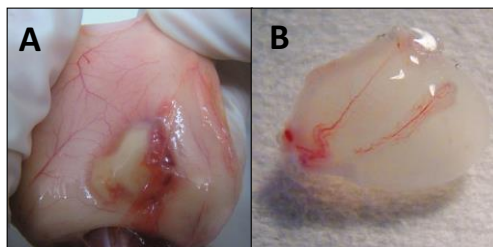


Figura 28. Fotografías de la piel y de los *plugs* de los ratones *nude*. A) Muestra representativa de la piel del ratón y del estado del *plug* 7 días después de ser insertado. B) Muestra representativa del *plug* extirpado al final del experimento.

17.2. Determinación del contenido de hemoglobina

Mediante la determinación del contenido de hemoglobina en los *plugs*, se evaluó la funcionalidad de los tubos formados, ya que esta técnica permite cuantificar la sangre que circula a través de los nuevos capilares.

La determinación del contenido de hemoglobina se llevó a cabo mediante el método de Drabkin modificado para el uso en tejido [192]. El reactivo Drabkin se utiliza para la determinación cuantitativa de la hemoglobina en sangre mediante una reacción colorimétrica. El reactivo contiene ferrocianuro potásico, cianida potásica y un detergente no-iónico que lisan los eritrocitos, liberando la hemoglobina, que es oxidada y convertida en cianmetahemoglobina (HiCN) y que presenta un pico de absorbancia a 540 nm.

Para llevar a cabo el método, los *plugs* de matrigel se pesaron y luego se homogeneizaron con 200 μ l de NaCl 0,9% en un sonicador Microson Ultrasonic Cell Disruptor XL, seguido de una centrifugación a 2.300 g, 7 min. Se recuperó el sobrenadante y se añadieron 100 μ l de cloroformo por cada 50 μ g de muestra para limpiarlo, se volvió a centrifugar a 15.700 g, 3 min. Después, se añadió a cada muestra 150 μ l de reactivo Drabkin (Sigma), se incubó durante 15 min, a temperatura ambiente y se leyó la absorbancia a 540 nm.

18. HISTOLOGÍA

Se realizaron cortes histológicos para ensayos de inmunohistoquímica de las siguientes muestras:

- *Plugs* de matrigel extraídos de los modelos murinos, obtenidos según se explica en el apartado anterior.
- Arterias coronarias humanas, obtenidas a partir de corazones extraídos en operaciones de trasplante llevadas a cabo en el Hospital de la Santa Creu i Sant Pau. El comité institucional del mismo hospital aprobó los protocolos de investigación utilizados en este estudio.

En primer lugar, las muestras se sumergieron en solución de fijación (paraformaldehído al 4%), durante 16-18 h y después en solución de criopreservación (**Tabla 28**), durante 2 días. Finalmente, las muestras se recubrieron con Tissue Tek® OCT™ (Sakura) y se congelaron a -80 °C.

Tabla 28. Composición de la solución de criopreservación.

Solución de criopreservación	
NaCl	1,8 g
Sacarosa	60 g
PB 0,4 M	50 ml
H ₂ O destilada	Hasta 200 ml

Se hicieron cortes seriados de los bloques de OCT™ congelados de 5 µm de grosor, se colocaron sobre portaobjetos recubiertos de poli-L-lisina y se tiñeron, bien con hematoxi-eosina o bien con anticuerpos, tal como se explica en el apartado siguiente.

19. INMUNOCITOQUÍMICA E INMUNOHISTOQUÍMICA

Se realizaron tinciones de inmunofluorescencia en células previamente fijadas con paraformaldehído al 4% y en cortes histológicos de *plugs* de matrigel y arterias coronarias, previamente calentados a 40 °C, durante 40 min.

Las muestras se permeabilizaron con Tween 0,5% durante 30 min, a 4 °C y se bloquearon con tampón de inmunofluorescencia (IF, **Tabla 29**) al 10% de suero de cabra, durante 1 h, a temperatura ambiente, para bloquear las uniones inespecíficas de los anticuerpos.

Tabla 29. Composición del tampón IF.

Tampón IF	
BSA	50 mg
Triton-x-100	100 µl
Tween 20x	25 µl
PBS	50 ml

Después, se prepararon soluciones con los anticuerpos primarios (**Tabla 30**), Hoechst 33342 (Life Technologies, dilución 1:500), anticuerpo IgG (Goat-anti-mouse F(ab) Fragment, Sigma; dilución 1:100), y 10% de suero de cabra en tampón IF. Se incubó durante 1 h, se lavó con el tampón IF y se incubaron las muestras con los anticuerpos secundarios adecuados (633 o 488, Life Technologies, dilución 1:100) en tampón IF al 10% de suero de cabra, durante 1 h. Los controles negativos se obtuvieron sin el anticuerpo primario. Finalmente, se cubrieron las muestras con el fijador Prolong Gold (Life Technologies) y un cubreobjetos. Las secciones teñidas se observaron en un microscopio confocal (Leica TCS SP2-AOBS).

Tabla 30. Anticuerpos utilizados en las inmunocitoquímicas e inmunohistoquímicas.

Nombre	Tipo	Dilución	Casa comercial
Anti- actina- α -FITC	Monoclonal	1:200	Sigma Aldrich
Anti-FT	Monoclonal	1:50	Dako
Anti-macrófago	Monoclonal	1:50	Abcam
Anti-VE-Cadherina	Monoclonal	1:50	Cell Signaling
Anti-vWF	Monoclonal	1:50	American Diagnostica
Anti-Wnt5a	Policlinal	1:50	Abcam

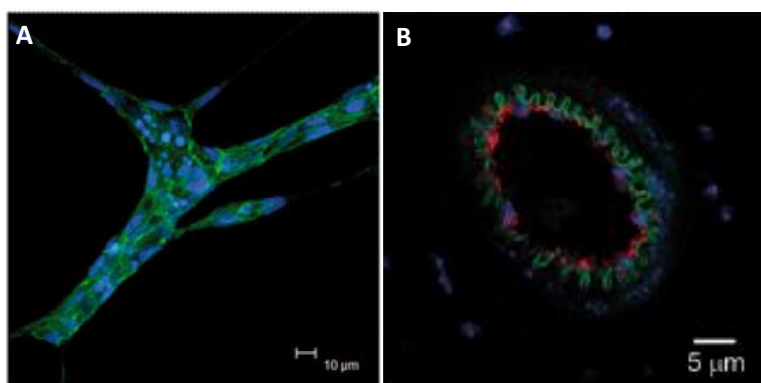


Figura 29. Ejemplos de tinción inmunofluorescente. A) Marcaje de VE-Cadherina (verde) en HMEC-1 cultivadas en 3DBM. B) Tinción de vWF (rojo) y actina- α (verde) en cortes de *plugs*. En azul, núcleos teñidos con Hoechst 33342.

20. ESTADÍSTICA

Los resultados se expresaron como media \pm error estándar de la media (SEM). Se analizó la normalidad mediante la prueba no paramétrica Kolmogórov-Smirnov. Tras verificar la normalidad de distribución, se analizaron las diferencias estadísticas utilizando el test T de Student para la comparación de dos grupos y el test ANOVA seguido por la prueba *post hoc* de Tukey, para la comparación de tres o más grupos. Para el análisis, se utilizó el programa IBM®SPSS Statistics 22 (SPSS Inc.). Se consideraron diferencias estadísticamente significativas valores de $p < 0,050$.

RESULTADOS

ARTÍCULO I

“Ets-1 transcription is required in tissue factor driven microvessel formation and stabilization”

Gemma Arderiu¹, Esther Peña¹, Rosa Aledo^{1,2}, Sonia Espinosa¹, Lina Badimon^{1,2}

¹Cardiovascular Research Center (CSIC-ICCC), Hospital de Sant Pau (UAB), IIB-Sant Pau. Barcelona, Spain. ²CiberOBN, Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain.

Estado: Artículo publicado en *Angiogenesis* (2012); 15: 657-669.

Factor de impacto (2013): **4,410**

RESUMEN

La formación y estabilización de microvasos inducida por factor tisular se regula mediante la transcripción de Ets-1.

El factor tisular (FT) es conocido como el principal activador de la cascada de coagulación, aunque también ejerce un papel como receptor en la señalización intracelular. La señalización del FT regula la transcripción de varios genes, así como la traducción proteica. Previamente, nuestro grupo ha descrito que el FT induce la formación de neovasos maduros a través de la expresión de CCL2. Si bien, el proceso de señalización inducido por el FT para promover la formación de nuevos microvasos todavía es desconocido.

El objetivo principal de este estudio fue investigar los mecanismos que tienen lugar durante la formación de microvasos inducida a través de FT. Hemos observado que el factor de transcripción ETS1 ejerce un papel fundamental en la señalización de microvasos a partir de la expresión de FT en células endoteliales microvasculares (CEm). Nuestros resultados muestran que el silenciamiento del FT en CEm reduce significativamente la activación de ETS1, y tiene un claro efecto en la inhibición de formación de tubos. La activación de

RESULTADOS

ETS1 revierte los efectos inhibitorios del silenciamiento del FT y provoca que la formación de tubos recupere su nivel habitual.

Los resultados obtenidos en este estudio confirman que el factor de transcripción ETS1 ejerce una función crítica en la angiogénesis inducida por el FT. También se demuestra que la activación de ETS1 producida por el FT tiene lugar mediante la fosforilación de las quinasas ERK1/2 y que produce la expresión de CCL2, ya que se une a la región promotora de este gen.

En conclusión, el FT de las CEs señala a través de ERK1/2 para activar ETS1 y desencadenar la formación de microvasos.

Ets-1 transcription is required in tissue factor driven microvessel formation and stabilization

Gemma Arderiu · Esther Peña · Rosa Aledo ·
Sonia Espinosa · Lina Badimon

Received: 14 June 2012 / Accepted: 28 July 2012 / Published online: 7 August 2012
© Springer Science+Business Media B.V. 2012

Abstract Tissue factor (TF) has well-recognized roles as initiator of blood coagulation as well as an intracellular signaling receptor. TF signaling regulates gene transcription and protein translation. Recently, we have shown that TF-induced mature neovessel formation is ultimately driven by CCL2 expression. However, the signaling process induced by TF to promote microvessel formation remains to be determined. This study was designed with the objective to investigate the mechanisms involved in TF-induced neovessel formation. Here, we have identified that Ets-1 expression is a downstream effector of TF signaling. TF-siRNA induced a highly significant reduction in Ets-1 expression levels and in Ets-1/DNA binding while inducing abrogation of microvessel formation. Activation of Ets-1 rescued the effect of TF inhibition and restored microvessel formation confirming the critical role of Ets-1 in TF-induced angiogenesis. VE-cadherin expression, a key regulator of endothelial intercellular junctions, and an Ets-1 target molecule was dependent of TF-inhibition. We show that TF signals through ERK1/2 to activate Ets-1 and induce CCL2 gene expression by binding to its promoter region. We conclude that endothelial cell TF signals through ERK1/2 and Ets-1 to trigger microvessel formation.

Keywords Angiogenesis · Tissue factor · Ets-1 · CCL2 · Endothelial cells

Introduction

Tissue factor (TF) is best known as the primary cellular initiator of blood coagulation [1, 2]. In addition to its role in coagulation, TF has non-hemostatic functions. TF contributes to a variety of pathological processes including inflammation, atherosclerosis, tumor growth, and angiogenesis [3, 4].

The clinical complications of atherosclerosis are caused by thrombus formation, which in turn results from rupture of unstable atherosclerotic plaques. Molecular pathways underlying the transition from advanced but stable plaques to vulnerable plaques at risk for rupture have been the subject of many studies. In this context, the most rupture prone atherosclerotic plaques (type IV *American Heart Association* classification) show the highest number of microvessels [5–7]. However, the mechanisms triggering and regulating plaque microvessel formation are unknown.

Angiogenesis is the process by which new blood vessels are formed from preexisting ones. Angiogenesis includes at least six sequential steps: detachment of pre-existing mural pericytes, extracellular matrix degradation by endothelial proteases, migration of endothelial cells (ECs), proliferation of ECs, tube formation by ECs, and reattachment of pericytes and smooth muscle cells (SMCs) [8]. Previously, we have shown that endothelial TF regulates microvessel formation inducing CCL2 (monocyte chemoattractant protein-1, CCL2/MCP-1) production in endothelial cells [9]. The secreted chemokine mediates TF-related angiogenic effect and recruits SMCs towards ECs facilitating the maturation and stability of the newly formed blood vessels [9].

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s10456-012-9293-x) contains supplementary material, which is available to authorized users.

G. Arderiu · E. Peña · R. Aledo · S. Espinosa ·
L. Badimon (✉)
Cardiovascular Research Center (CSIC-ICCC), Hospital de Sant Pau (UAB), IIB-Sant Pau, CiberOBN, Instituto de Salut Carlos III, C/ Sant Antoni M³ Claret 167, 08025 Barcelona, Spain
e-mail: lbadimon@csic-iccc.org

However, the intracellular mechanism that mediates TF-induced CCL2 production remains to be elucidated.

Many transcription factors in ECs are involved in the regulation of gene expression during angiogenesis. In this study we focused on Ets-1 (E26 transformation-specific-1), a member of the Ets transcription factor family. The Ets family is defined by a conserved DNA-binding domain that forms a winged helix-turn-helix structural motif that binds to a purine-rich consensus, GGA (A/T), in the promoter region of target genes. This family of transcription factors regulates a wide variety of biological processes [10], among them the expression of genes involved in EC function and angiogenesis [11]. Moreover, several studies have indicated the contribution of Ets-1 in CCL2 induction [12, 13]. Herein, we have investigated whether TF-induction of stable microvessel formation is regulated via activation of Ets-1.

Methods

Cell culture and silencing RNA (siRNA)

Immortalized human microvascular endothelial cell line (HMEC-1) [14], and primary cultures of human vascular smooth muscle cells (HVSMC) [15] were used. HMEC-1 were a kind gift from the Center of Disease Control (Atlanta, GA) and were cultured in MCDB131 media (Invitrogen) and supplemented with 10 % FBS, 2 mM glutamine (Invitrogen) and 50 mg/ml gentamicin (Invitrogen). Key experiments were repeated using primary endothelial cells HDMEC (Human Dermal Microvascular Endothelial Cell) (PromoCell). HVSMC were prepared from human coronary arteries of explanted hearts from transplant operations at the Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, and maintained in M199 (Invitrogen) with 10 % FBS. Cells were used between passages 3 and 6.

Three-dimensional cultures were prepared on basement membrane (3DBM) (BD Matrigel™, BD Biosciences) as described [16]. The co-culture system was run with HMEC-1 and HVSMC. To discriminate each cell type, cells were labeled with two different living cells fluorescent membrane dyes, PKH67 and PKH26 (Sigma-Aldrich) [17]. Cell movements were monitored by time lapse video microscopy at 15-min intervals. Cells were viewed using a PL APO 20×/0.7 Multi-immersion CS. Images were acquired, digitalized, and processed with Leica Software TCS-AOBS.

The delivery of siRNAs into HMEC-1 was done with a Nucleofector device and its corresponding kits (Amata, Inc.). Transfection protocols were performed following manufacturer's instructions using the T16 program. The scrambled siRNA or annealed pre-designed siRNA against

TF (s4932) and Ets-1 (s4849) were purchased from Applied Biosystems. After transfection, cells were plated into matrigel and 18 h later RNA and protein were isolated. In all experiments, a scrambled siRNA was used as control to evidence unspecific changes in gene expression profile or in cell phenotype that may have resulted from the use of siRNA.

Release of cellular structures and RNA extraction from 3D cultures

Cells grown in 3D were isolated from matrigel. Briefly, cells were washed with cold PBS without Ca²⁺ and Mg²⁺, containing 5 mM EDTA, and scraped into a centrifuge tube with a minimum volume of 30 ml cold PBS/EDTA. Cells were incubated on ice for 45 min, until the matrigel dissociated, and centrifuged at 115g for 2 min. The pellet was resuspended in an appropriate amount of lysis buffer for mRNA or protein isolation. Soluble and insoluble subcellular fractions were obtained as previously described [16].

Real time PCR

RNA from cell lysates was extracted by RNeasy isolation kit (Qiagen) and reverse transcribed. mRNA levels were analyzed by real time PCR. Assays were used for TF (Hs00175225m1), Ets-1 (Hs0048287m1) (Applied Biosystems), and CCL2 (PPH00192E) (Sabiosciences). Human GAPDH (4326317E) (Applied Biosystems) or (PPH00150E) (Sabiosciences) were used as endogenous controls. Real time PCR was performed as previously described [18]. mRNA expression levels were quantified and normalized by GAPDH.

Lentiviral expression of tissue factor cDNA and transfection

The cDNA of human TF (coagulation factor III or thromboplastin) (GI: 15029642) was obtained from clone MGC13630 IMAGE 4073183. The cDNA was amplified by PCR. The TF cDNA was cloned in pLVX-AcGFP-N1 (Clontech Laboratories Inc.) in NheI/XhoI cloning sites. Lentiviral vectors were transfected into the HEK 293T/17 packaging cell line (ATCC) using the Lenti-X HT Packaging System (Clontech Laboratories, Inc), and 48 h after transfection, viral supernatant was collected, passed through 0.45 μm filters and used for transduction of HMEC-1. Cells were transfected with control vector (pLVX-AcGFP-N1), and pLVX-AcGFP-N1-TF using 2 ml of virus-containing media in the presence of 8 μg/ml of polybrene (Sigma-Aldrich) for 16 h at 37 °C. 24 h later HMEC-1 were selected in 1 μg/ml puromycin (Sigma) for

7 days, and the pooled cell population was used for subsequent experiments. The construction was previously shown to be functional by testing TF procoagulant activity [15].

Scrambled or TF silenced ECs were seeded at approximately 0.2×10^6 cells in 6-well plates and were transfected with pCMV6-Ets-1-GFP and an empty vector as a control (Origene). Transient transfections were performed using an Effectene[®] transfection reagent (Qiagen) by procedures supplied by the manufacturer. Transfection efficiency was evaluated by GFP expression.

Immunoblot analysis

Equal amounts of protein were separated on SDS-PAGE gels and transferred to nitrocellulose membranes. After blocking for nonspecific binding, western-blotting was probed with a monoclonal anti-TF antibody (1:1,000) (American Diagnostica), monoclonal anti-Ets-1 antibody (1G11) (1:500) (Abcam), polyclonal anti-phospho Threonine 38 Ets-1 antibody (1:1,000) (Novus Biological), polyclonal anti-p44/42 MAPK (137F5) antibody (1:1,000), polyclonal anti-phospho-p44/42 MAPK (Thr202/Tyr204) antibody (1:2,000) (Cell Signaling), and monoclonal anti-CCL2/MCP-1 antibody (1:250) (R&D Systems), followed by goat anti-mouse-HRP (1:2,000) or donkey anti-rabbit-HRP (1:5,000). Excess of antibody was removed by extensive washing and blots were developed by ECL system (Amersham Biosciences). The membranes were then stripped and treated with polyclonal anti- β -actin antibody (1:1,000) (Abcam Inc. Cambridge, MA), followed by donkey anti-rabbit-HRP (1:5,000) and detected by ECL system. Band densities were determined with the ChemiDoc[™] XRS system (Bio-Rad) in chemiluminescence detection modus and Quantity-One software (Bio-Rad).

CCL2/MCP-1 assay

Quantitative determination of CCL2 concentrations in cell culture supernatant was determined using a Quantikine[®] Human CCL2/MCP-1 immunoassay (R&D Systems). Scrambled or silenced HMEC-1 cells were plated (2×10^5 cells/well) in a 12 well plated and supernatant were collected at 18 h.

Chromatin immunoprecipitation assays

Chromatin immunoprecipitation (ChIP) analysis was performed using ChIP assay kit (Millipore) according to the manufacturer's instructions. Briefly, HMEC-1 (control), TF overexpressed HMEC-1 and TF siRNA HMEC-1 were seeded at 2.5×10^6 cells/100 mm plate and the next day cultures were cross-linked by the addition of formaldehyde

at a 1 % final volume for 10 min at 37 °C. The cross-linking was quenched by adding 125 mM glycine, and cells were harvested by scrapping in ice-cold PBS with protease inhibitors (Roche Applied Science). Cell pellets were resuspended in SDS lysis buffer containing protease inhibitors prior to sonication on ice to release DNA fragments (average 1,000–500 bp) followed by microcentrifugation for 10 min at 4 °C, and resuspended in dilution buffer. The nuclear pellets were incubated with protein-A agarose/Salmon sperm DNA (50 % slurry) for 1 h at 4 °C, and incubated overnight with anti-Ets-1 (Santa Cruz) antibody or with IgG (Santa Cruz) as negative control with rotation at 4 °C. Immunoselected chromatin was washed successively in low and high salt, LiCl and Tris-EDTA buffers. To reverse formaldehyde cross-linking, chromatin complexes (including input samples) were incubated in 5 M NaCl at 65 °C for 4 h followed by Tris-EDTA-proteinase K buffer for 1 h at 45 °C. DNA purification was performed by phenol-chloroform extraction. Samples were subjected to real-time q-PCR with FAST SYBR green (Roche) to amplify a sequence (–198 to –56 bp, considering as +1 the start of transcription) with putative Ets-1 sites [19] using the following pair of primers: for-5'-GG AAAAAGTGTCTCGTCTGA-3' and rev-5'-TTATTGA AAGCGGGCAGAGG-3'. Quantitative real-time-PCR analysis for ChIP assay was calculated after normalization by input and mock adjusted (IgG). Fold enrichment from the background was quantified as $2^{(-\Delta\Delta C_t)}$.

Promoter activity by luciferase gene reporter assay

To measure a transcriptional activity, a construction of CCL2 promoter (–240 to –1 bp) in pGL3 provided by Dr. Nicholas [19], was transiently transfected in HMEC-GFP and HMEC-TF-GFP cells. The CCL2 promoter was mutated by site directed mutagenesis (Quickchange II Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) in order to eliminate an Ets-1 binding site at –140 bp, localized after TFS EARCH analysis (<http://www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html>), by using the primer 5'-GCTTCCCTTCTACTTT GGAAATCCACAGGATGC-3', and its corresponding reverse complementary oligonucleotide. HMEC-1 and TF overexpressing HMEC-1 cells were seeded at 70 % of confluency in 12-well plates, transfections were carried out with MCDB 131 10 % FBS using an Effectene[®] transfection reagent (Qiagen). Cells were incubated with 500 ng of each construction (CCL2/WT, CCL2/Ets-1-mut or control pGL3), and 50 ng of Renilla (Promega) as positive control of transfection. After 36 h of transient transfection luciferase assays were performed using the Luciferase assay kit (Promega) and their activities in the cell extracts were measured using a luminometer (Orion I, Berthold detection systems). Results were normalized to Renilla

activity and were expressed as mean \pm SD of three independent experiments performed in triplicate.

Angiogenesis assay in vivo

All animal experiments were performed under approved protocols of the institutional animal use and care committee. A co-culture of 5×10^6 HMEC-1 and HVSMC (at a ratio 1:1) prepared in 300 μ l of matrigel media were injected subcutaneously in nude mice. The cells implanted in matrigel plugs retained their viability and assured the sustained inhibition of TF or Ets-1 over the course of the entire experiment. Animals were euthanized at 1, 4 and 7 days post-injection. The skin of the mouse was easily pulled back to expose the matrigel plugs, which remained intact. These implants were then treated to obtain mRNA or were fixed, embedded, and stained with appropriate antibodies. To obtain mRNA, implants were treated as previously described by Adini et al. [20].

Hemoglobin assessment

Hemoglobin content was analyzed using the cyanhemoglobin method (Drabkin's method) modified by us for tissues. Briefly, fragments of matrigel plugs were weighed and homogenized in 200 μ l of 0.9 % NaCl saline using electric homogenizer following by centrifugation at 5,000 rpm for 7 min. Supernatant was cleared by adding 100 μ l of chloroform per 50 μ g of matrigel specimen with subsequent centrifugation at 13,000 rpm for 3 min. Hemoglobin in the specimen was converted to CN-derivative by adding 150 μ l of Drabkin's solution containing K3Fe(CN)₆, KCN, KH₂PO₄, and TritonX-100; the sample was incubated at room temperature for 15 min and A594 absorbance was measured using spectrophotometer.

Immunofluorescence staining

Cells were cultured in 3DBM for different times, fixed in 3.5 % paraformaldehyde washed with 50 mM/LPBS/glycine thrice for 20 min at room temperature, blocked with 10 % goat serum in immunofluorescence buffer (0.1 % BSA, 0.2 % Triton X-100, 0.05 % Tween 20 in PBS) for 1 h at room temperature, and with 2.5 % BSA with 1:100 fab fragment [anti-mouse IgG, F(ab) fragment of goat antibody, Sigma] in immunofluorescence buffer for 45 min at room temperature. Incubation with the primary antibody anti-VE-cadherin (Cell Signaling) was done at 1:50 dilution in immunofluorescence buffer plus 1:100 Fab fragment for 1 h at room temperature. After washing with immunofluorescence buffer, 1:100 Alexa Fluor anti-mouse 488 IgG was applied for 1 h at room temperature. Nuclei were counterstained with Hoechst 33342. Controls were stained with secondary antibodies only.

Stained cells were washed and covered with Prolong Gold antifade reagent (Molecular Probes). Images of immunostained cells were recorded on a Leica inverted fluorescence confocal microscope (Leica TCS SP2-AOBS, Wetzlar, Germany). Cells were viewed with HCX PL APO 20 \times 0.7 Multi-immersion CS objective. Fluorescent images were acquired in a scan format of 1,024 \times 1,024 pixels in a spatial data set (xyz or xzy) and were processed with the Leica Standard Software TCS-AOBS.

Blood vessels were visualized by immunofluorescent staining. Five-micrometer-thick frozen matrigel plug sections were prepared for immunostaining as described [21]. We used rabbit anti-human Von Willebrand factor (1:50) (Dako), this was followed by incubation with Alexa 633-conjugated goat anti-rabbit antibody (1:100) (Molecular Probes) and monoclonal anti- α -smooth muscle actin FITC conjugated (1:200) (Sigma Aldrich). Cell nuclei were counterstained with Hoechst 33342 (1:1,000) (Molecular Probes). Stained cells were washed and covered with Prolong Gold antifade reagent (Molecular Probes). Images of immunostained cells were recorded on a Leica inverted fluorescence confocal microscope (Leica TCS SP2-AOBS, Wetzlar, Germany). Cells were viewed with HCX PL APO 20 \times 0.7 Multi-immersion CS objective. Fluorescent images were acquired in a scan format of 1,024 \times 1,024 pixels in a spatial data set (xyz or xzy) and were processed with the Leica Standard Software TCS-AOBS. Controls with no primary antibody showed no fluorescence labeling.

Statistical analysis

We expressed data as mean \pm SEM and tested for statistical significance by the two-tailed Student's *t* test or ANOVA as needed, to determine statistical significance among treatments. *p* < 0.05 was considered statistically significant.

Results

TF induces Ets-1 expression in endothelial cells

We have recently demonstrated that endothelial TF regulates the formation of microvessels with a stable vascular phenotype and that human atherosclerotic plaques microvessels show TF expression in endothelial cells [9]. To gain further insight into the mechanism by which endothelial cell-derived TF regulates formation and stabilization of neovessels we investigated transcriptional factors involved in angiogenesis and vascular development. We focused our interest in the study of a member of the Ets family of transcription factors. We measured Ets-1 mRNA and protein levels in scrambled and TF siRNA HMEC-1. Levels of Ets-1

mRNA and protein were significantly reduced in TF silenced cells (Fig. 1a, b). Furthermore, TF silencing also decreased Ets-1 phosphorylation (on the Threonine 38 residue) (Fig. 1b). It is known that changes in protein phosphorylation may induce Ets-1 translocation to the nucleus and binding to specific DNA sequences [22]. Western blots

of nuclear and cytoplasmic extracts revealed that in TF silenced cells the majority of Ets-1 was retained in the cytoplasm (Fig. 1c), consistent with reduced induction of the transcription factor function. Similar results were obtained using primary endothelial cells (HDMEC, Supplemental Fig. S1).

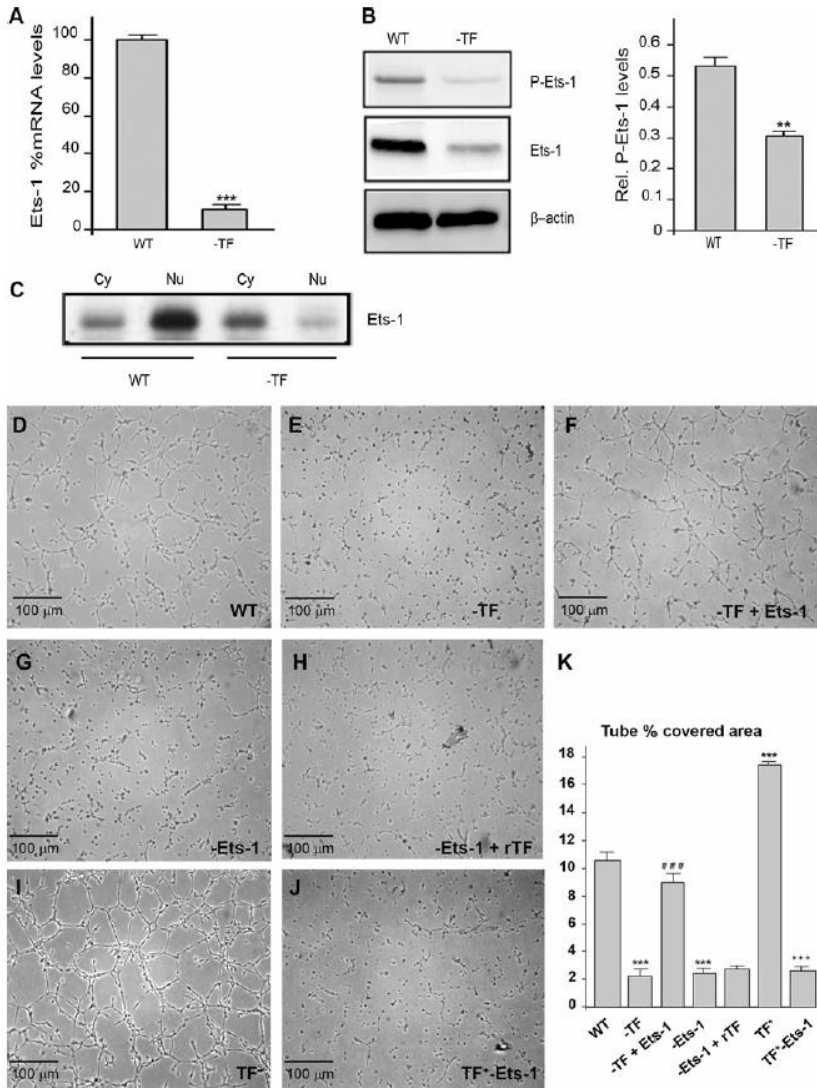


Fig. 1 TF induces microvessel formation in human microvascular endothelial cell through Ets-1. Control, scrambled siRNA (WT) and TF silenced (–TF) HMEC-1 were cultured on matrigel plates for 18 h. **a** Real-time PCR analysis of Ets-1 mRNA, levels of Ets-1 mRNA were quantified and normalized by GAPDH and relative values were expressed in histograms (n = 4). Results are expressed as mean ± SEM. ***p < 0.001 versus control. **b** Western blots show phosphorylation of Ets-1 on the Threonine 38 and the Ets-1 protein. Histogram shows densitometric analysis of the average levels of Ets-1 Threonine phosphorylation relative to total Ets-1 in each condition (n = 4). Results are expressed as mean ± SEM. *p < 0.01 versus control. **c** Panel shows western blot of Ets-1 in Triton-100 soluble (Cytoplasm) and insoluble (Nucleus) fractions in control or TF silenced cells (n = 3). **d–j** Phase contrast micrographs show morphology of HMEC-1 cultured in 3DBM for 18 h, original magnification ×20. **d** scrambled siRNA (WT). **e** TF siRNA (–TF). **f** 10 h after TF silencing cells were transiently transfected with pCMV6-Ets-1-GF and then cultured in 3DBM (–TF + Ets-1). **g** Ets-1 siRNA (–Ets-1). **h** 10 h after Ets-1 silencing, 3D cultures were treated with rTF (exogenous recombinant human TF) (–Ets-1 + rTF), and tube formation was analyzed 8 h later. **i** TF overexpressing cells (TF⁺). **j** TF overexpressing cells transfected with Ets-1 siRNA (TF⁺ – Ets-1)]. **k** Tube % area covered after 18 h of culture in matrigel. Values represent mean ± SEM from three independent experiments. ***p < 0.001 versus WT, ###p < 0.001 versus TF siRNA and +++p < 0.001 versus TF overexpression

Ets-1 activation. We transiently overexpressed Ets-1 with the pCMV6-Ets-1-GFP vector. Ets-1 overexpression reversed the inhibitory effect of TF silencing (Fig. 1d–f), and the total tube length and area covered by tubes were increased. The efficiency of Ets-1 overexpression was examined by confocal microscopy to observe GFP fluorescence (Supplemental Fig. S2). To confirm that these effects resulted from TF inhibition in ECs we used an alternative model. HMEC-1 and HDMEC were transfected with Ets-1 siRNA, downregulation of Ets-1 (Supplemental Fig. S3) blocked tube formation in matrigel assay (Fig. 1g; Supplemental Fig. S3). This inhibition in tube formation was not rescued by exogenous recombinant human TF (50 nM) [23] (Prospec-Tany Technogene Ltd) (Fig. 1h).

To further confirm that Ets-1 plays a critical role in TF-induced formation of tube-like structures, TF overexpressing HMEC-1 cells were transfected with Ets-1 siRNA. Overexpression of full-length human TF by lentiviral transduction in endothelial cells significantly enhanced the formation of tube-like structures compared with controls transfected with empty lentivirus (compare Fig. 1d and i). However, this increase was abrogated by Ets-1 silencing (Fig. 1j). Altogether, these sets of experiments indicate that Ets-1 is a critical transcription factor for TF-induced angiogenesis.

To exclude the possibility that there was apoptosis in response to TF or Ets-1 inhibition cultures were stained for TUNEL. We observed a negligible amount of tunnel-

TF induces microvessel formation through activation of Ets-1

To directly analyze the role of Ets-1 in TF signaling we examined if the TF silencing effects could be rescued by

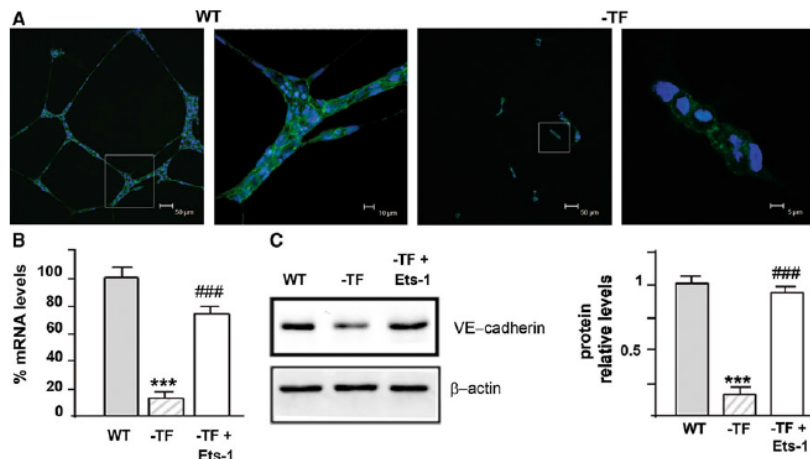


Fig. 2 TF induced VE-cadherin expression. **a** Immunofluorescence staining of control transfected HMEC-1 (WT) or TF silenced HMEC-1 (–TF), staining for VE-cadherin (green) and nuclear staining (blue). **b** Real-time PCR analysis of VE-cadherin mRNA in control transfected HMEC-1 (WT), TF silenced HMEC-1 (–TF) or TF silenced HMEC-1 transiently transfected with Ets-1 (–TF + Ets-1),

levels of VE-cadherin mRNA were quantified and normalized by GAPDH and relative values were expressed in histograms (n = 3). **c** Western blots show VE-cadherin protein (n = 3). Results are expressed as mean ± SEM. ***p < 0.001 versus control and ###p < 0.001 versus TF silenced cells. (Color figure online)

positive ECs after TF- or Ets-1-siRNA delivery (Supplemental Fig. S4).

VE-cadherin a target molecule for Ets-1 is regulated by TF

Ets-1 is a regulator of molecules involved in the angiogenic switch. One of these molecules is VE-cadherin [24, 25], a critical factor in the process of vascular maturation and integrity [26]. Because TF deficiency affects tube stabilization [9], we tested whether TF silencing affected VE-cadherin expression. In 3D cultures (Fig. 2a) control HMEC-1 showed homogeneous staining and distribution of VE-cadherin along cellular junctions. In contrast, VE-cadherin appeared with a low diffuse pattern in junctions of tube-like structures in TF-silenced cells. In addition, VE-cadherin mRNA and protein levels were significantly reduced in TF silenced cells. However, VE-cadherin levels

were rescued when TF-silenced cells were transiently transfected with the Ets-1 expression vector (Fig. 2b, c).

TF-induced CCL2 expression is under the control of Ets-1

Ets-1 is involved in the transcription of different angiogenic genes. Since our previous results showed that TF regulates CCL2 expression levels in ECs we investigated whether Ets-1 was involved in such regulation. As shown in Fig. 3a, TF silencing in ECs reduced Ets-1 and CCL2 protein expression. However, transient transfection of TF-silenced cells with pCMV6-Ets-1-GFP rescued TF, Ets-1 and CCL2 expression. Interestingly, Ets-1 transfection induces TF expression because Ets-1 also binds to the TF gene promoter and activates the novo TF mRNA synthesis [27]. In parallel, when Ets-1 was silenced, Ets-1 and CCL2 protein expression were decreased and the addition of

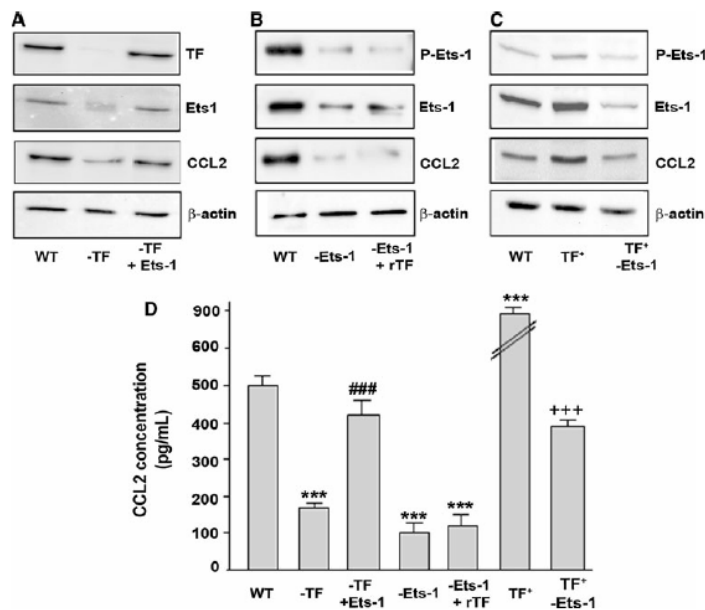


Fig. 3 TF-induced CCL2 expression is under the control of Ets-1. **a** Western blots showing TF, Ets-1 and CCL2 protein expression from scrambled siRNA (WT), TF silenced (-TF) or TF silenced cells transiently transfected with Ets-1 vector (-TF + Ets-1). Cells were culture in matrigel for 18 h. **b** Western blots showing p-Ets-1, Ets-1 and CCL2 protein expression from scrambled siRNA (WT), Ets-1 silenced (-Ets-1) or Ets-1 silenced with recombinant human TF (rTF) treatment (-Ets-1 + rTF). Cells were culture in matrigel for 18 and 8 h before protein extraction cells were treated with rTF. **c** Western

blots showing p-Ets-1, Ets-1 and CCL2 protein expression from scrambled siRNA (WT), overexpressing TF (TF⁺) or silenced Ets-1 in overexpressing TF cells (TF⁺ - Ets-1). Cells were culture in matrigel for 18 h. **d** CCL2 concentration in media from HMEC-1 in different conditions cultured in 3DBM for 18 h, values represent mean ± SEM from 3 different experiments. ****p* < 0.001 versus WT cells, ###*p* < 0.001 versus silenced cells and +++*p* < 0.001 versus TF overexpression

recombinant TF did not have any effect on p-Ets-1, Ets-1 or CCL2 protein expression levels (Fig. 3b). As a final proof of concept regarding TF/Ets-1 regulation of CCL2 expression, Ets-1 was silenced in TF overexpressing cells. ECs overexpressing TF had increased expression of p-Ets-1, Ets-1 and CCL2 protein which were accordingly reduced upon Ets-1 silencing (Fig. 3c).

Because CCL2 is a secreted protein, we analyzed CCL2 concentrations in ECs culture supernatants. CCL2 concentration was markedly reduced in TF or Ets-1 silenced cells (169.24 ± 8.1 and 98.6 ± 5 pg/mL, respectively, vs. 501.6 ± 13.66 pg/mL in control cells) (Fig. 3d). In agreement with the western blot-results, CCL2 levels were significantly increased when Ets-1 was rescued (423.3 ± 26.4 pg/mL). These results suggest that TF induced CCL2 release is under the control of Ets-1.

Finally, we examined the relation of TF/Ets-1 with the CCL2 promoter activity in EC. First, we carried out a ChIP assay to verify the binding of Ets-1 to the CCL2 promoter in TF silenced or overexpressing ECs. We selected a previously described sequence that includes Ets-1 binding sites [19] (Supplemental Fig. S5). As shown in Fig. 4a, binding of Ets-1 was significantly increased (threefold) in TF over-expressing ECs with respect to control cells and significantly decreased in TF-siRNA cells. Subsequently, we confirmed that the activity of the CCL2 promoter was increased in cells with high TF expression levels. ECs stably transfected with empty lentivirus-GFP or lentivirus-TF-GFP were transiently transfected with the CCL2 promoter-pGL3, or control-pGL3 with a luciferase gene reporter. Figure 4b shows an increase in CCL2 promoter activity versus control pGL3 in ECs (11×), with a more evident increase in cells over-expressing TF (60×). Moreover, analysis of the promoter activity after having mutated a putative Ets-1 binding box (at -140 bp) in TF over-expressing endothelial cells significantly reduced promoter activity by almost 40 % (Fig. 4c).

Taken together, these results indicate that TF-induced expression of CCL2 is transcribed by Ets-1.

Endothelial cell TF regulates the recruitment of HVSMC via Ets-1

To further investigate the role of Ets-1 in TF-induced EC recruitment of SMC, co-culture experiments of HMEC-1 and HVSMC cells were performed (matrigel assay for 18 h). Figure 5a shows that ECs form tube-like structures and that SMC localize around of EC providing support and stability to the capillary-like structures. When TF was silenced in HMEC-1 the formation of tube-like structures was almost abrogated and SMCs were not able to migrate toward ECs (Fig. 5b). Indeed, in such conditions ECs do not secrete CCL2 as shown in Fig. 3d. Similar results were

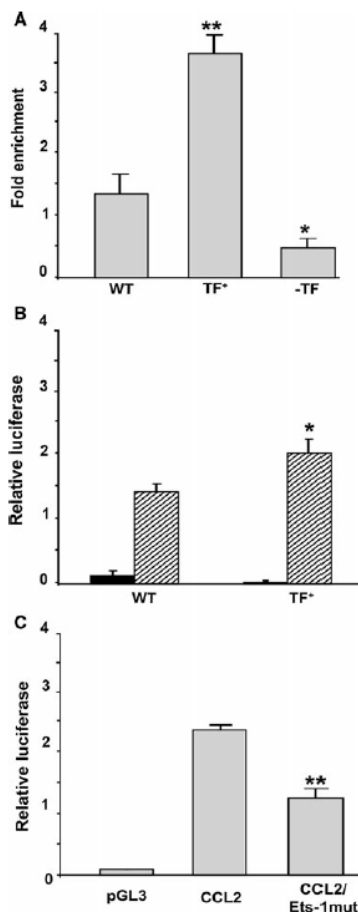


Fig. 4 TF activates binding of Ets-1 to the CCL2 promoter. **a** ChIP assay for the Ets-1 site by real-time PCR analysis of Ets-1 immunoprecipitated DNA from control HMEC-1 cells (WT), TF-overexpressed cells (TF) and TF siRNA cells (-TF). Error bars indicate standard error from mean values obtained from triplicate PCR reactions. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ versus WT cells. **b** CCL2 promoter activity in control cells (WT) and overexpression TF (TF). Luciferase activity was measured at 36 h after transfection with pGL3 (black bars) or CCL2 promoter (dash bars) construct and Renilla as internal control of transfection. Values represent the mean \pm SEM for triplicates samples in each of three separate experiments. * $p < 0.05$ versus control cells. **c** TF overexpressing cells were transiently transfected with different constructions of CCL2 promoter (CCL2/WT) and Ets-1-mutated (CCL2/Ets-1 mut). The luciferase activity was normalized to Renilla. Values represent the mean \pm SEM for triplicates samples in each of three separate experiments. ** $p < 0.01$ versus WT CCL2 promoter

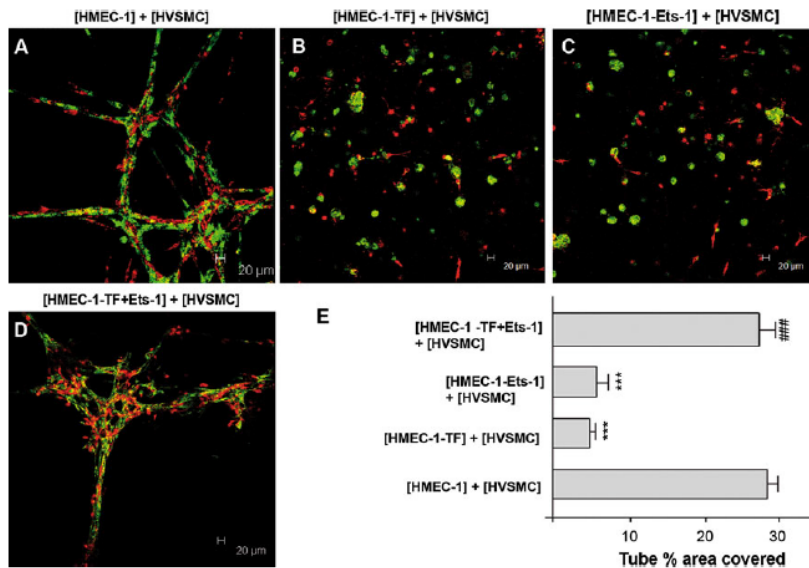


Fig. 5 Endothelial cell TF regulates the recruitment of HVSMC via Ets-1. Silencing of TF (-TF) or Ets-1 (-Ets-1) reduced tube formation in a HMEC-1 (red) and HVSMC (green) after 18 h of 3D co-culture system. This effect was rescued by transient transfection of

Ets-1 (+Ets-1). Values represent mean \pm SEM from three independent experiments. *** $p < 0.001$ versus control cells and ### $p < 0.001$ versus cells transfected with TF siRNA. (Color figure online)

obtained when Ets-1 was silenced in HMEC-1 (Fig. 5c). These effects were rescued by transient over-expression of Ets-1 in HMEC-1 (Fig. 5d, e).

We investigated whether TF-induced neovessel formation is regulated by Ets-1 in vivo by subcutaneously inoculating nude mice with matrigel plugs seeded with 1×10^7 cells. Co-cultures of scrambled siRNA-transfected cells or silenced TF-HMEC, silenced Ets1-HMEC and over-expressing Ets-1-HMEC and HVSMC cells were analyzed. The cells implanted in matrigel plugs retained their viability and had sustained inhibition of TF or Ets-1 over the course of the entire experiment (Supplemental Fig. S6). Macroscopic observation of the matrigel plugs retrieved from mice at day 7 post-implant showed that control cells induced angiogenesis with formation of thick neovessels (Fig. 6). However, when either TF or Ets-1 was silenced in ECs, microvessel formation was abrogated. The overexpression of Ets-1 on TF silenced ECs was able to rescue neovessel formation. These microvessels were functional as demonstrated by the presence of red cells within the vessel (Supplemental Fig. S7). The hemoglobin content normalized to the weight of the analyzed fragment of Matrigel was significantly lower in TF or Ets-1 silenced

plugs (48.94 ± 0.9 and 42.532 ± 0.05 respectively vs. 84.17 ± 1.813 mg/ml in control), and it was rescued by Ets-1 overexpression (72.324 ± 0.85). The level of organization of the microvessels was analyzed by immunohistochemistry. Sections of matrigel plugs were double immunostained with anti-Von Willebrand factor antibody (specific for endothelial cells) and anti α -actin smooth muscle cell. Figure 6 shows that after 7 days of implantation, ECs (red) formed a well organized structure and the recruited SMCs (green) could be observed around ECs. When TF was silenced in HMEC-1, there were no structured vessels; indeed, ECs were not able to become organized and SMCs did not migrate toward ECs. Similar results were obtained when Ets-1 was silenced in ECs. The effects of TF silencing were rescued by Ets-1 expression.

TF activates Ets-1 transcription through ERK1/2

Ets-1 transcriptional activity can be mediated by phosphorylation of Threonine-38 residues in response to different factors. To investigate the role of phosphorylation in TF-induced Ets-1 activation, we examined whether TF

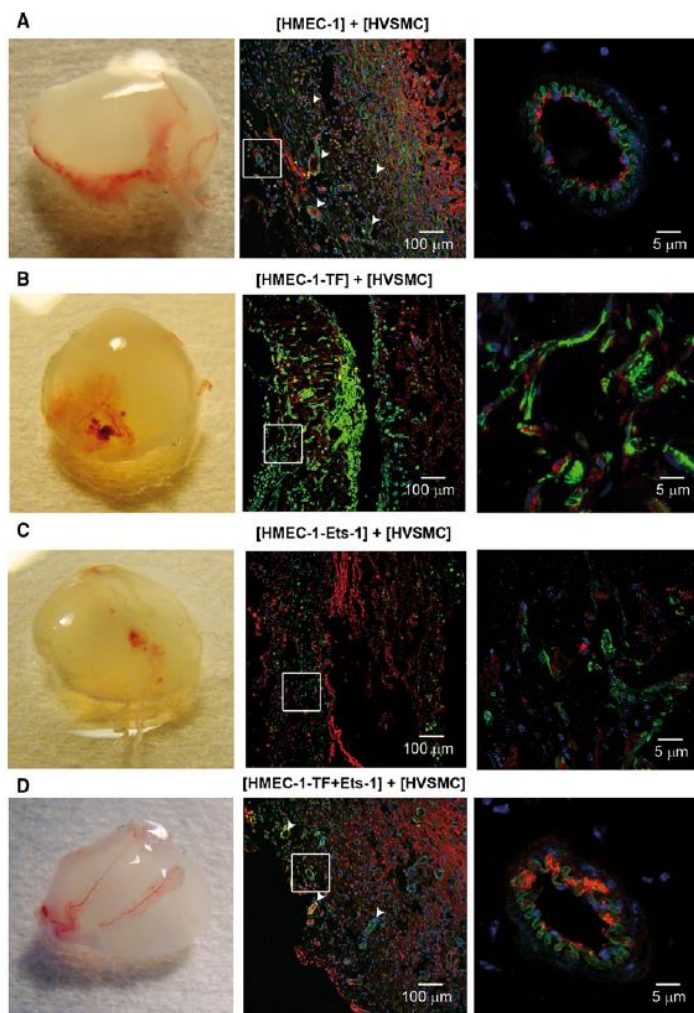


Fig. 6 Mature and stable blood vessels formed in matrigel plugs in vivo. Left panels show a macroscopic view of representative matrigel plugs; middle panels show double immunofluorescence staining of frozen sections with antibodies against endothelial cells marker (von Willebrand factor) (red), smooth muscle cells (α -actin) (green) and nucleus were stained with Hoechst 33342 (blue). White arrows

indicate neovessel formation. Right panels show a magnification of the area marked by square in the middle panel. a HMEC-1 and HVSMC control cells; b HMEC-1 TF siRNA and HVSMC; c HMEC-1 Ets-1 siRNA and HVSMC and d HMEC-1 TF siRNA and Ets-1 overexpression and HVSMC. Images are representative from 6 animals for each group. (Color figure online)

induces activation of ERK1/2 in HMEC-1 cells. Figure 7a shows by western blot de-phosphorylation of ERK1/2 in TF silenced cells. In addition, inhibition of ERK1/2 activity with U0129 (MEK1/2 inhibitor) significantly reduced Ets-1

phosphorylation (Fig. 7b). Moreover, U0129 also reduced CCL2 expression protein (Fig. 7c), supporting that TF signals through ERK1/2 to activate Ets-1 and consequent CCL2 secretion.

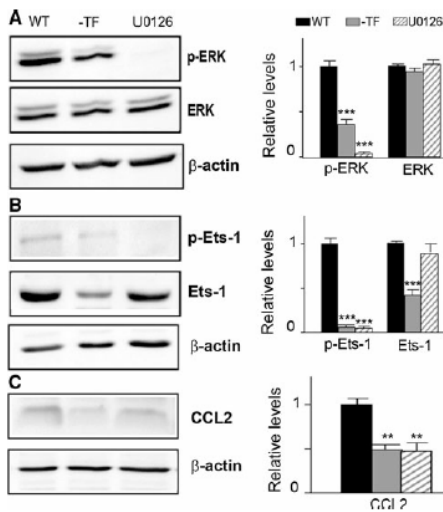


Fig. 7 ERK1/2 participates in Ets-1 activation by TF. Inhibition of ERK1/2 activation using U0126 inhibitor significantly reduced Ets-1 phosphorylation in Threonine 38 residues and CCL2 protein. Western blots are representative of 3 independent experiments. Histogram shows densitometric analysis of the average levels for phospho-protein relative to total protein or total protein to β -actin in each condition. Results are expressed as mean \pm SEM. *** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ versus WT

Discussion

We have previously shown that TF regulates neovessel formation and stabilization by CCL2 [9]. However, the transcription pathway of induction remained unknown. Here we demonstrate that TF induces CCL2-related neovessel formation through Ets-1 induced gene transcription. Indeed, we show that Ets-1 activation regulates CCL2 expression, which in turn is responsible for the recruitment of SMCs toward ECs.

We focused our studies on the Ets family of transcription factors (Ets-1, Erg-1 and Fli-1), because of their involvement in angiogenesis and vascular development [28, 29] Ets-1 is the first member of the Ets family which is expressed in mesoderm lineage cells including ECs during embryogenesis [30]. Ets-1 is a primary transcription factor that transforms ECs phenotype from quiescent to angiogenic [31]. Using real time PCR and western blot analysis, we show that Ets-1 expression is regulated by TF signaling in ECs. Ets-1 expression is downregulated in TF silenced cells suggesting that Ets-1 may be the transcription factor involved in the phenotypical changes induced by TF silencing. Ets-1 has shown to regulate angiogenesis by

several pro-angiogenic factors, such as VEGF [32], angiotensin II (Ang-II) [12] or TGF β [33]. Moreover, Ets-1 is able to regulate the expression of different molecules that control EC function [28, 34]. One of the molecules regulated by Ets-1 is VE-cadherin [24], a calcium-dependent endothelium specific adhesion molecule responsible for microvascular integrity and stabilization [35, 36]. TF silencing that abrogates stable microvessel formation shows reduced VE-cadherin expression.

The recruitment of pericytes and vascular SMCs toward ECs has a key role in mature microvessel formation. Our in vivo data shows the impact of TF and Ets-1 in the processes. We have demonstrated that CCL2 is a downstream gene of Ets-1 induced by TF. Several different studies had already reported the role for Ets-1 in CCL2 induction [13, 37]. As such, Ang-II induces CCL2 expression in endothelial and vascular smooth muscle cells in wild-type mice, but fails to do it in Ets-1 $^{-/-}$ mice [12]. Here, we provide evidence that in TF silenced ECs with downregulated Ets-1, Ets-1 rescue increases CCL2 expression, and promotes new tube formation. ChIP and luciferase assays revealed that TF enhanced the binding of Ets-1 to the CCL2 promoter in ECs. Ets-1 binding to the CCL2 promoter was previously shown in Ang-II-mediated vascular inflammation and in SMC-related CCL2 release [12, 13].

The novelty of our study is not focused on the relation between Ets-1-CCL2, but the regulation by TF of Ets-1 transcription to induce CCL2. We have additionally investigated the signaling between TF and Ets-1. Several kinases have been demonstrated to phosphorylate Ets-1 and modulate its activity. Activation of GTPase Ras leads to Ets-1 phosphorylation on Threonine 38 and subsequent activation [38, 39]. The effect of Ras is mediated by mitogen activated kinase ERK1 and ERK2 pathway, with phosphorylation by ERK1/2 strongly increasing Ets-1 binding activity [40]. TF signaling through TF-FVIIa also resulted in a transient activation of ERK1/2 (phosphorylation) [41]. Moreover, previous results from our group have demonstrated that TF signals through Akt-1 which in turn regulates Raf phosphorylation at Ser²⁵⁹ and the subsequent ERK1/2 phosphorylation ending up in Ets-1 transcription factor activation [42]. Our results demonstrate that TF signals through ERK1/2 to increase the binding activity of Ets-1 to the promoter region of target genes. Inhibition of TF-signaling decreased Ets-1 activity and CCL2 expression. In summary, our results indicate that the axis TF/Ets-1/CCL2 has an important function in the angiogenic process and in microvessel stabilization.

Acknowledgments We thank O. Garcia and M. Pescador for their excellent technical assistance. This work was supported in part by grants from Ministry of Science and Education of Spain (SAF2010/16549), and Instituto de Salud Carlos III (CIBEROBN-CB06/03) (to LB), and (CP07/00224) (to GA). We thank the Fundación de

Investigación Cardiovascular and the Fundación Jesus Serra for their support.

Conflict of interest The authors declared no conflict of interest.

References

1. Davie EW, Fujikawa K, Kisiel W (1991) The coagulation cascade: initiation, maintenance, and regulation. *Biochemistry* 30: 10363–10370
2. Edgington TS, Mackman N, Brand K, Ruf W (1991) The structural biology of expression and function of tissue factor. *Thromb Haemost* 66:67–79
3. Tremoli E, Camera M, Toschi V, Colli S (1999) Tissue factor in atherosclerosis. *Atherosclerosis* 144:273–283
4. Lopez-Pedraza C, Barbarroja N, Dorado G, Siendones E, Velasco F (2006) Tissue factor as an effector of angiogenesis and tumor progression in hematological malignancies. *Leukemia* 20:1331–1340. doi:10.1038/sj.leu.2404264
5. Juan-Babot JO, Martinez-Gonzalez J, Berrozpe M, Badimon L (2003) Neovascularization in human coronary arteries with lesions of different severity. *Rev Esp Cardiol* 56:978–986
6. Moreno PR, Purushothaman KR, Fuster V, Echeverri D, Truszczynska H, Sharma SK, Badimon JJ, O'Connor WN (2004) Plaque neovascularization is increased in ruptured atherosclerotic lesions of human aorta: implications for plaque vulnerability. *Circulation* 110:2032–2038. doi:10.1161/01.CIR.0000143233.87854.23
7. Vimani R, Kolodgie FD, Burke AP, Finn AV, Gold HK, Tulenko TN, Wrenn SP, Narula J (2005) Atherosclerotic plaque progression and vulnerability to rupture: angiogenesis as a source of intraplaque hemorrhage. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25: 2054–2061. doi:10.1161/01.ATV.0000178991.71605.18
8. Carmeliet P (2003) Angiogenesis in health and disease. *Nat Med* 9:653–660. doi:10.1038/nm0603-653
9. Arderiu G, Pena E, Aledo R, Juan-Babot O, Badimon L (2011) Tissue factor regulates microvessel formation and stabilization by induction of chemokine (C–C motif) ligand 2 expression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 31:2607–2615. doi:10.1161/ATVBAHA.111.233536
10. Wasyluk B, Hahn SL, Giovane A (1993) The Ets family of transcription factors. *Eur J Biochem* 211:7–18
11. Wemert N, Raes MB, Lassalle P, Dehouck MP, Gosselin B, Vandebunder B, Stehelin D (1992) c-Ets1 proto-oncogene is a transcription factor expressed in endothelial cells during tumor vascularization and other forms of angiogenesis in humans. *Am J Pathol* 140:119–127
12. Zhan Y, Brown C, Maynard E, Anshelevich A, Ni W, Ho IC, Oettgen P (2005) Ets-1 is a critical regulator of Ang II-mediated vascular inflammation and remodeling. *J Clin Invest* 115: 2508–2516. doi:10.1172/JCI24403
13. Aoki T, Kataoka H, Nishimura M, Ishibashi R, Morishita R, Miyamoto S (2010) Ets-1 promotes the progression of cerebral aneurysm by inducing the expression of MCP-1 in vascular smooth muscle cells. *Gene Ther* 17:1117–1123. doi:10.1038/gt.2010.60
14. Ades EW, Candal FJ, Swerlick RA, George VG, Summers S, Bosse DC, Lawley TJ (1992) HMEC-1: establishment of an immortalized human microvascular endothelial cell line. *J Invest Dermatol* 99:683–690
15. Camino-Lopez S, Badimon L, Gonzalez A, Canals D, Pena E, Llorente-Cortes V (2009) Aggregated low density lipoprotein

- induces tissue factor by inhibiting sphingomyelinase activity in human vascular smooth muscle cells. *J Thromb Haemost* 7: 2137–2146. doi:10.1111/j.1538-7836.2009.03638.x
16. Arderiu G, Cuevas I, Chen A, Carrio M, East L, Boudreau NJ (2007) HoxA5 stabilizes adherens junctions via increased Akt1. *Cell Adh Migr* 1:185–195
17. Kitahara T, Hiromura K, Ikeuchi H, Yamashita S, Kobayashi S, Kuroiwa T, Kaneko Y, Ueki K, Nojima Y (2005) Mesangial cells stimulate differentiation of endothelial cells to form capillary-like networks in a three-dimensional culture system. *Nephrol Dial Transpl* 20:42–49. doi:10.1093/ndt/gfh572
18. Otero-Vinas M, Llorente-Cortes V, Pena E, Padro T, Badimon L (2007) Aggregated low density lipoproteins decrease metalloproteinase-9 expression and activity in human coronary smooth muscle cells. *Atherosclerosis* 194:326–333
19. Choi YB, Nicholas J (2010) Induction of angiogenic chemokine CCL2 by human herpesvirus 8 chemokine receptor. *Virology* 397:369–378. doi:10.1016/j.virol.2009.11.024
20. Adini A, Fainaru O, Udagawa T, Connor KM, Folkman J, D'Amato RJ (2009) Matrigel cytometry: a novel method for quantifying angiogenesis in vivo. *J Immunol Methods* 342:78–81. doi:10.1016/j.jim.2008.11.016
21. Carrio M, Arderiu G, Myers C, Boudreau NJ (2005) Homeobox D10 induces phenotypic reversion of breast tumor cells in a three-dimensional culture model. *Cancer Res* 65:7177–7185. doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-1717
22. Oikawa T, Yamada T (2003) Molecular biology of the Ets family of transcription factors. *Gene* 303:11–34
23. Pradier A, Eteilaie C (2008) The influence of exogenous tissue factor on the regulators of proliferation and apoptosis in endothelial cells. *J Vasc Res* 45:19–32. doi:10.1159/000109074
24. Gory S, Dalmon J, Prandini MH, Kortulewski T, de Launoit Y, Huber P (1998) Requirement of a GT box (Sp1 site) and two Ets binding sites for vascular endothelial cadherin gene transcription. *J Biol Chem* 273:6750–6755
25. Lelievre E, Mattot V, Huber P, Vandebunder B, Soncin F (2000) ETS1 lowers capillary endothelial cell density at confluence and induces the expression of VE-cadherin. *Oncogene* 19:2438–2446. doi:10.1038/sj.onc.1203563
26. Vittet D, Buchou T, Schweitzer A, Dejane E, Huber P (1997) Targeted null-mutation in the vascular endothelial-cadherin gene impairs the organization of vascular-like structures in embryoid bodies. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:6273–6278
27. Group ER, Donovan-Peluso M (1996) Lipopolysaccharide induction of THP-1 cells activates binding of c-Jun, Ets, and Egr-1 to the tissue factor promoter. *J Biol Chem* 271:12423–12430
28. Sato Y (2001) Role of ETS family transcription factors in vascular development and angiogenesis. *Cell Struct Funct* 26:19–24
29. Dejane E, Taddei A, Randi AM (2007) Foxs and Ets in the transcriptional regulation of endothelial cell differentiation and angiogenesis. *Biochim Biophys Acta* 1775:298–312. doi:10.1016/j.bbcan.2007.05.003
30. Vandebunder B, Pardanaud L, Jaffredo T, Mirabel MA, Stehelin D (1989) Complementary patterns of expression of c-ets 1, c-myc and c-myc in the blood-forming system of the chick embryo. *Development* 107:265–274
31. Sato Y, Abe M, Tanaka K, Iwasaka C, Oda N, Kanno S, Oikawa M, Nakano T, Igarashi T (2000) Signal transduction and transcriptional regulation of angiogenesis. *Adv Exp Med Biol* 476:109–115
32. Iwasaka C, Tanaka K, Abe M, Sato Y (1996) Ets-1 regulates angiogenesis by inducing the expression of urokinase-type plasminogen activator and matrix metalloproteinase-1 and the migration of vascular endothelial cells. *J Cell Physiol* 169:522–531. doi:10.1002/(SICI)1097-4652(199612)169:3<522::AID-JCP12>3.0.CO;2-7

33. Tanaka K, Abe M, Sato Y (1999) Roles of extracellular signal-regulated kinase 1/2 and p38 mitogen-activated protein kinase in the signal transduction of basic fibroblast growth factor in endothelial cells during angiogenesis. *Jpn J Cancer Res* 90: 647–654
34. Oda N, Abe M, Sato Y (1999) ETS-1 converts endothelial cells to the angiogenic phenotype by inducing the expression of matrix metalloproteinases and integrin beta3. *J Cell Physiol* 178:121–132. doi:10.1002/(SICI)1097-4652(199902)178:2<121::AID-JCP1>3.0.CO;2-F
35. Corada M, Mariotti M, Thurston G, Smith K, Kunkel R, Brockhaus M, Lampugnani MG, Martin-Padura I, Stoppacciaro A, Ruco L, McDonald DM, Ward PA, Dejana E (1999) Vascular endothelial-cadherin is an important determinant of microvascular integrity in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:9815–9820
36. Falcon BL, Hashizume H, Koumoutsakos P, Chou J, Bready JV, Coxon A, Oliner JD, McDonald DM (2009) Contrasting actions of selective inhibitors of angiotensin-1 and angiotensin-2 on the normalization of tumor blood vessels. *Am J Pathol* 175: 2159–2170. doi:10.2353/ajpath.2009.090391
37. Russell L, Garrett-Sinha LA (2010) Transcription factor Ets-1 in cytokine and chemokine gene regulation. *Cytokine* 51:217–226. doi:10.1016/j.cyto.2010.03.006
38. Yang BS, Hauser CA, Henkel G, Colman MS, Van Beveren C, Stacey KJ, Hume DA, Maki RA, Ostrowski MC (1996) Ras-mediated phosphorylation of a conserved threonine residue enhances the transactivation activities of c-Ets1 and c-Ets2. *Mol Cell Biol* 16:538–547
39. Chen YF, Shin SJ, Lin SR (2005) Ets1 was significantly activated by ERK1/2 in mutant K-ras stably transfected human adrenocortical cells. *DNA Cell Biol* 24:126–132. doi:10.1089/dna.2005.24.126
40. Goetze S, Kintscher U, Kaneshiro K, Meehan WP, Collins A, Fleck E, Hsueh WA, Law RE (2001) TNFalpha induces expression of transcription factors c-fos, Egr-1, and Ets-1 in vascular lesions through extracellular signal-regulated kinases 1/2. *Atherosclerosis* 159:93–101
41. Poulsen LK, Jacobsen N, Sorensen BB, Bergenheim NC, Kelly JD, Foster DC, Thastrup O, Ezban M, Petersen LC (1998) Signal transduction via the mitogen-activated protein kinase pathway induced by binding of coagulation factor VIIa to tissue factor. *J Biol Chem* 273:6228–6232
42. Arderiu G, Pena E, Aledo R, Badimon L (2012) Tissue factor-akt signaling triggers microvessel formation. *J Thromb Haemost*. doi:10.1111/j.1538-7836.2012.04848.x

Supplementary Material

“Ets-1 transcription is required in tissue factor driven microvessel formation and stabilization”

Gemma Arderiu¹, Esther Peña¹, Rosa Aledo^{1,2}, Sonia Espinosa¹, Lina Badimon^{1,2}

¹Cardiovascular Research Center (CSIC-ICCC), Hospital de Sant Pau (UAB), IIB-Sant Pau. Barcelona, Spain. ²CiberOBN, Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain.

Supplemental data Figure 1

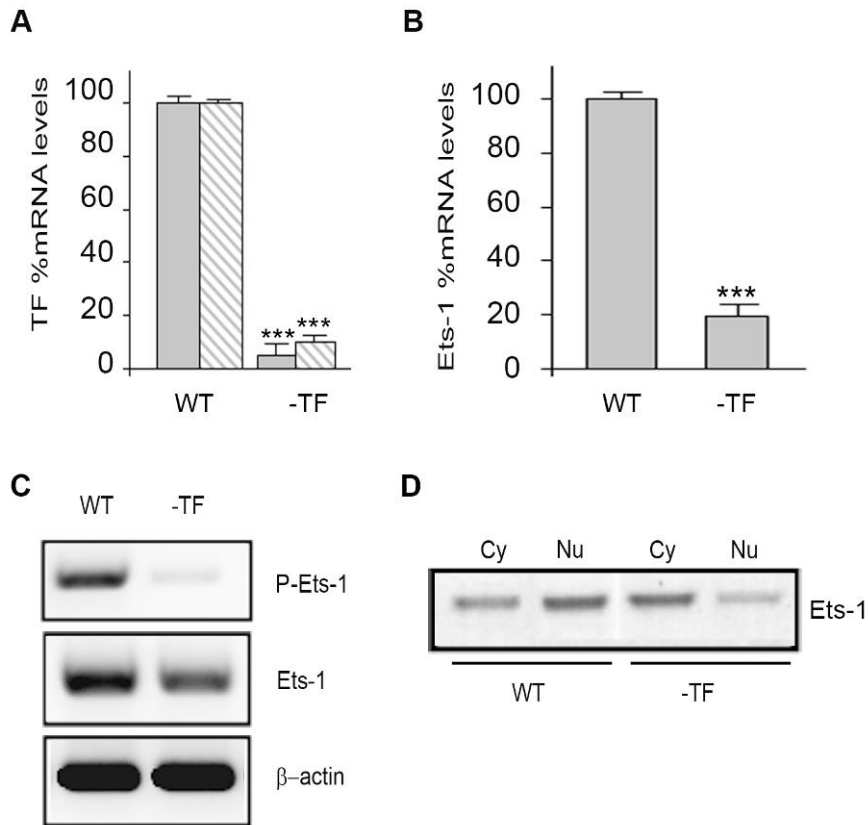
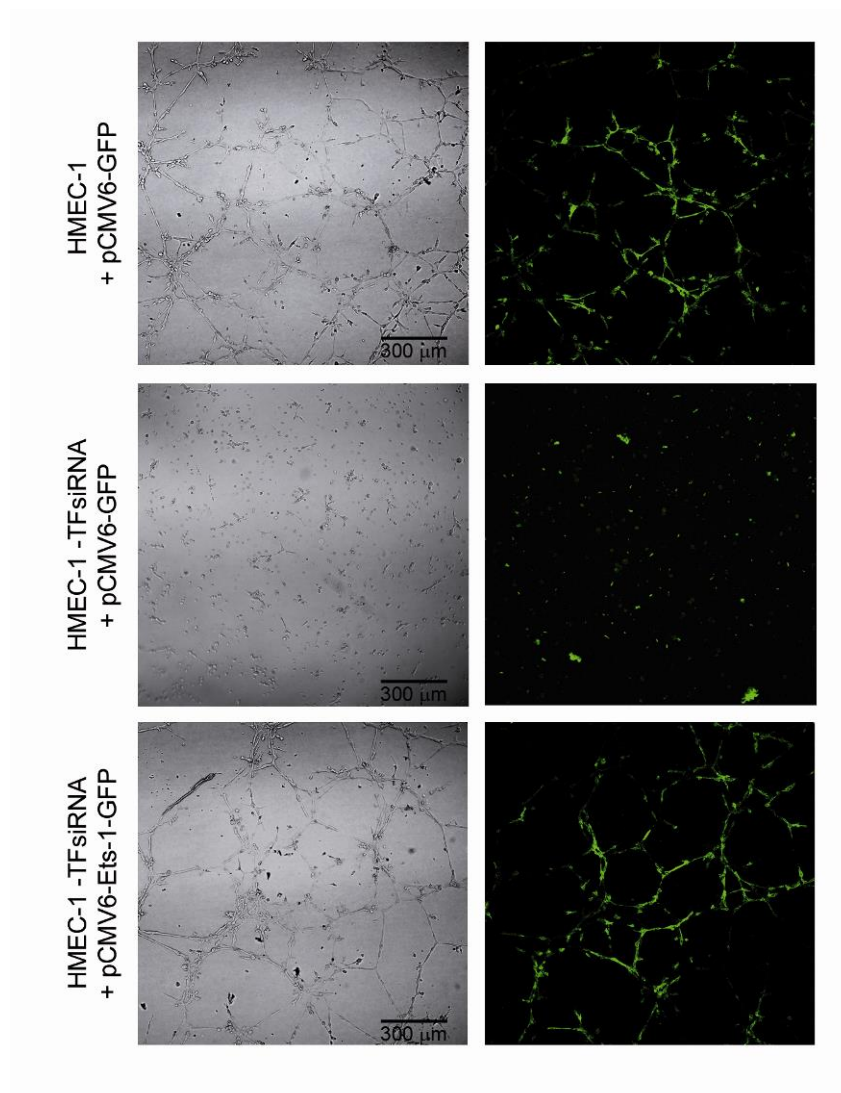


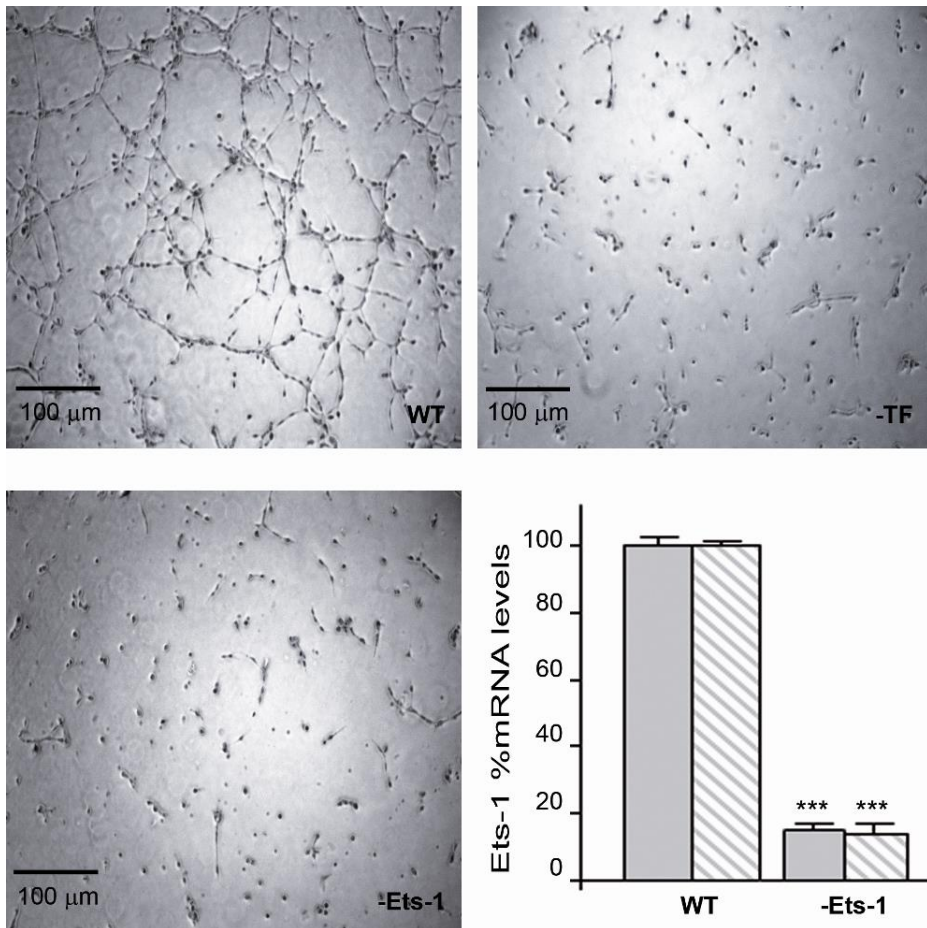
Figure 1: TF regulates Ets-1 expression in human primary microvascular endothelial cell (HDMEC). Control, scrambled siRNA (WT) and TF silenced (-TF) cells were cultured on matrigel plates for 18 hours. **a** Real-time PCR analysis of TF mRNA levels in HMEC-1 (full bar) and HDMEC (dash bar) transfected with scrambled (control) or specific TF-siRNA. Levels of mRNA were quantified and normalized by GAPDH. *** $p < 0.001$ versus control ($n = 3$). **b** Real-time PCR analysis of Ets-1 mRNA in HDMEC, levels of Ets-1 mRNA were quantified and normalized by GAPDH and relative values were expressed in histograms *** $p < 0.001$ versus control ($n = 4$). **c** Western blots show phosphorylation of Ets-1 on the Threonine 38 and the Ets-1 protein from HDMEC protein lysates ($n = 3$). **d** Panel shows western blot of Ets-1 in Triton-100 soluble (Cytoplasm) and insoluble (Nucleus) fractions in control or TF silenced cells ($n = 3$).

Supplemental data Figure 2



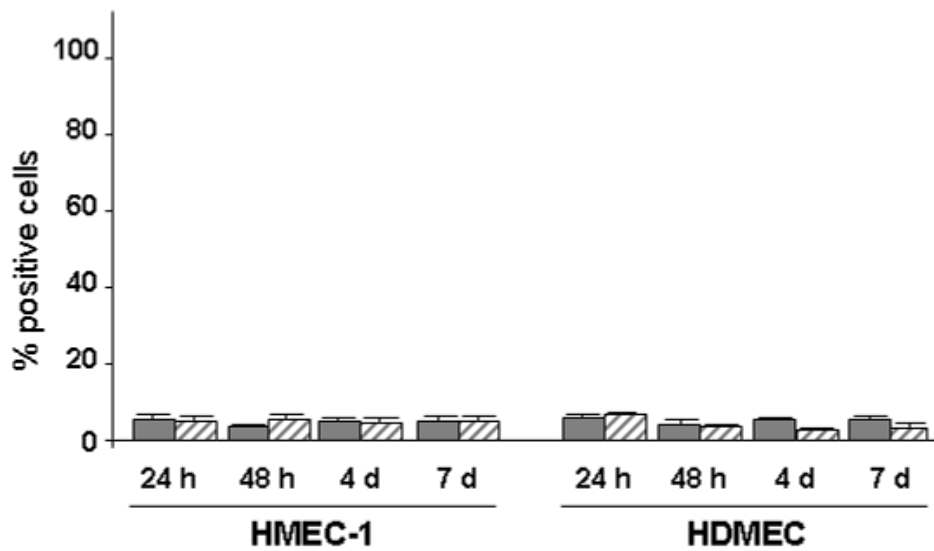
Ets-1 induces angiogenesis in TF silenced cells. Confocal images of control or TF silenced endothelial cells with transient transfected with pCMV6-GFP or pCMV6-Ets-1-GFP. Cells are culture in 3DBM for 18 hours. Representative images of n = 3.

Supplemental data Figure 3



Inhibition of TF or Ets-1 blocks capillary-like tube formation in human dermal microvascular endothelial cells. Phase contrast micrographs showing the morphology of HDMEC treated with scrambled, TF- or Ets-1siRNA, 18 hours after culturing on 3D BM co-cultures. Original magnification x20 (n = 3). Effects were similar to obtained in HMEC-1. Real-time PCR analysis of Ets-1 mRNA in HMEC-1 (full bar) and HDMEC (dash bar), levels of Ets-1 mRNA were quantified and normalized by GAPDH and relative values were expressed in histograms, ***p<0.001 (n = 3).

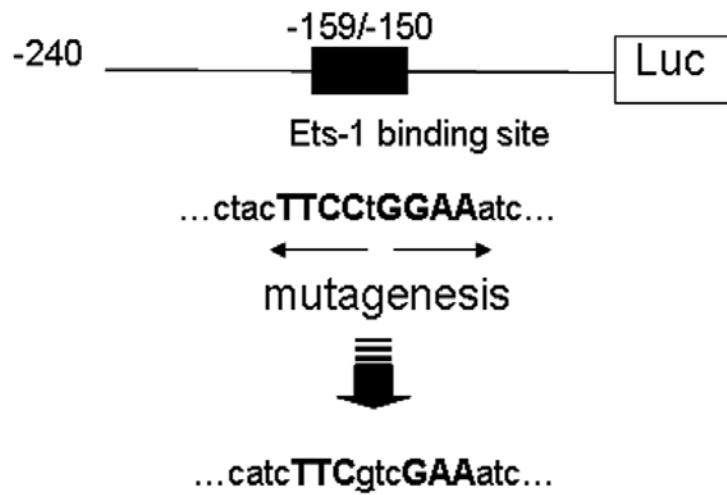
Supplemental data Figure 4



Tissue factor silencing does not induce apoptosis in endothelial cells in 3D cultures.

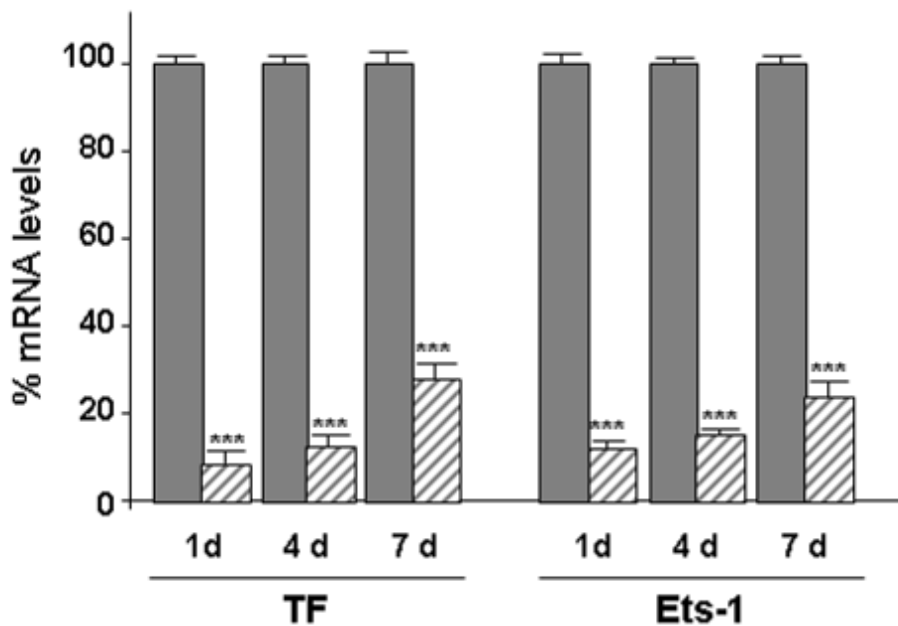
Quantification of apoptotic cells at 24 or 48 hours and 4 or 7 days after siRNA transfection. Full bars represent cells transfected with scrambled RNA and dash bars represent cells transfected with TF siRNA (n = 3).

Supplemental data Figure 5



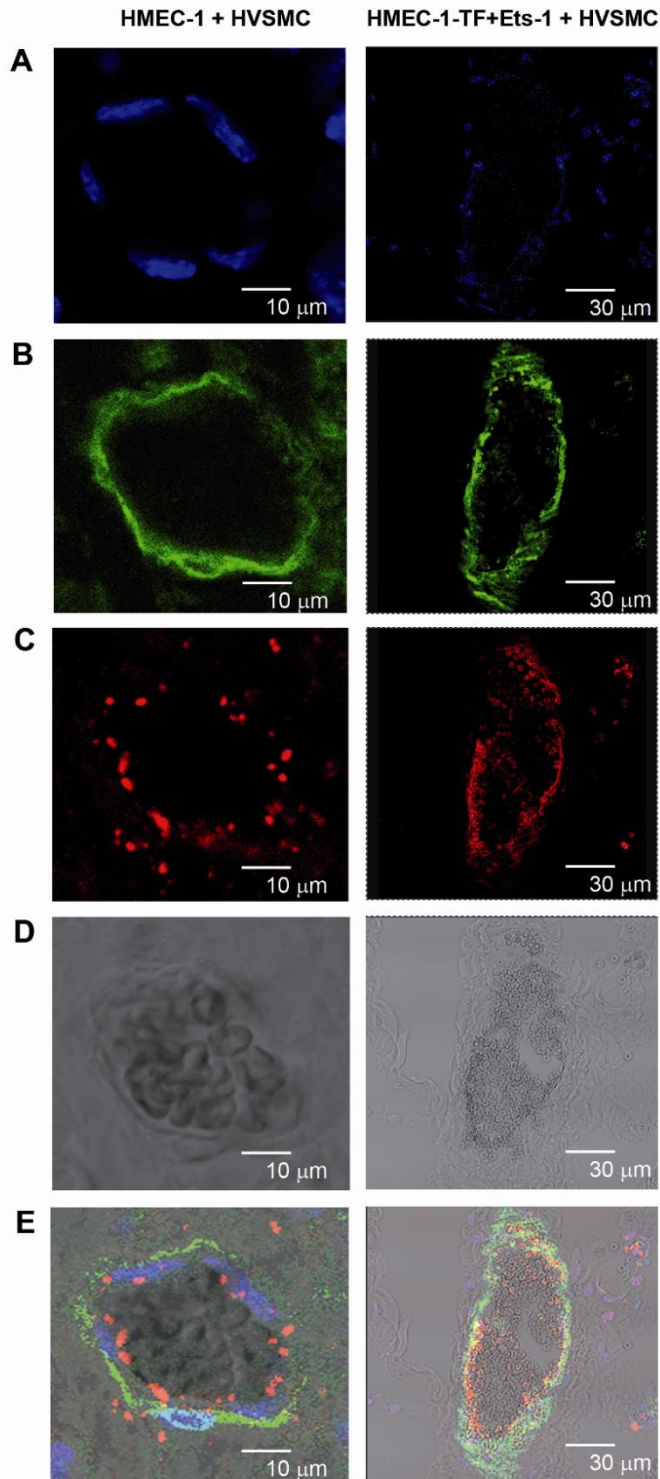
Mutated region of CCL2 promoter (gift of J Nicholas) with Ets-1 binding sites (-159 to -150) after TFSEARCH v 1.3 analysis (score>90.0).

Supplemental data Figure 6



Sustained inhibition of TF and Ets-1 expression levels in endothelial cells during angiogenesis assay *in vivo*. Real-time PCR analysis of TF and Ets-1 mRNA from cells seeded in matrigel plugs. Cells were transfected with scrambled siRNA (full bar) and cells transfected with TF or Ets-1 siRNA (dash bar). Levels of TF and Ets-1 mRNA were quantified and normalized by GAPDH and relative values were expressed in histograms. Values represent means \pm SD from three independent experiments. *** $p < 0.001$ versus cells transfected with scrambled siRNA, $n = 3$.

Supplemental data Figure 7



Functional blood vessels. Functional blood vessels formed in matrigel plugs *in vivo*, images show immunofluorescence staining of frozen sections with antibodies against: **a** nuclei staining; **b** smooth muscle cells (α -actin); **c** endothelial cell marker (von Willebrand factor); **d** differential interface contrast (DIC) image; and **e** merge image. Images are representative from 6 animals for each group.

ARTÍCULO II

“PAR2/SMAD3 in microvascular endothelial cells is indispensable for vascular stability via tissue factor signaling”

Gemma Arderiu¹, Sonia Espinosa¹, Esther Peña¹, Rosa Aledo^{1,2}, Lina Badimon^{1,2}

¹Cardiovascular Research Center (CSIC-ICCC), Hospital de Sant Pau (UAB), IIB-Sant Pau. Barcelona, Spain. ²CiberOBN, Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain.

Estado: Artículo en revisión en *Journal of Molecular Cell Biology*.

Factor de impacto (2013): **8,432**

RESUMEN

PAR2/SMAD3 en células endoteliales microvasculares es indispensable para la estabilidad vascular a través de la señalización del factor tisular.

La señalización del factor tisular (FT) modula varias funciones celulares. En el artículo anterior hemos demostrado que el FT induce la activación de ETS1 en células endoteliales microvasculares (CEm). Este factor de transcripción se une a la región promotora de CCL2 e induce su expresión y secreción, estimulando así el reclutamiento de CMLVs y la estabilización de los nuevos microvasos formados.

Los miembros de la familia ETS tienen la propiedad de ejercer su regulación en combinación con otros factores de transcripción. El objetivo de este estudio fue investigar si existen factores de transcripción adicionales que participen en la formación de microvasos maduros inducidos por el FT.

Nuestros resultados indican que además de ETS1, el factor de transcripción SMAD3 contribuye a la estabilización de estructuras tubulares formadas a partir de la inducción del FT en CEm. De hecho, SMAD3 coopera con ETS1 para inducir la formación de vasos maduros a través de la expresión de CCL2.

Además, mediante la sobreexpresión del FT en CEm, hemos observado que ETS1 señala de forma dependiente de Akt; mientras que SMAD3 actúa independientemente de Akt. Asimismo, mientras que la vía FT/Akt/ETS1 induce la expresión de CCL2 de forma independiente de PAR2; la vía FT/SMAD3 depende de la presencia de PAR2 para activar la expresión de CCL2. La activación de SMAD3 dependiente de PAR2 está mediada a través de la fosforilación de la quinasa PKC. El silenciamiento en la expresión de SMAD3 en CEm reduce la fosforilación de las quinasas ERK1/2 y disminuye la actividad de sus promotores diana, entre ellos, CCL2. Nuestros ensayos *in vivo* mostraron que el silenciamiento de FT y de ETS1 reduce drásticamente la formación de nuevos vasos sanguíneos, y que el silenciamiento de SMAD3 y de PAR2 da lugar a una angiogénesis activa pero inestable, con presencia de hemorragias.

Por lo tanto, la angiogénesis inducida por el FT en CEm parece ser el resultado de dos vías de señalización distintas: por un lado, la formación de microvasos inducida por el FT se regula a través de la vía Akt/ETS1 y por otro, la estabilización de los microcapilares está regulada por PAR2/SMAD3. El proceso angiogénico es consecuencia de la cooperación entre los factores de transcripción ETS1 y SMAD3 en respuesta a la señalización desencadenada por el FT en CEm.

PAR2/SMAD3 in microvascular endothelial cells is indispensable for vascular stability via tissue factor signaling

Gemma Arderiu, Sonia Espinosa, Esther Peña, Rosa Aledo, Lina Badimon
Cardiovascular Research Center (CSIC-ICCC); Hospital de Sant Pau (UAB) and
IIB-Sant Pau, Barcelona, Spain

First corresponding author: Gemma Arderiu
Cardiovascular Research Center
C/ Sant Antoni M^a Claret 167
08025 Barcelona, Spain
Tel: 34 93 556 58 80, Fax: 34 93 556 55 59
E-mail: garderiu@csic-iccc.org

Second corresponding author: Lina Badimon
Cardiovascular Research Center
C/ Sant Antoni M^a Claret 167
08025 Barcelona, Spain
Tel: 34 93 556 58 80, Fax: 34 93 556 55 59
E-mail: lbadimon@csic-iccc.org

Short Title: PAR2/SMAD3 regulates TF-angiogenesis

Key words: Angiogenesis, microvascular endothelial cells, SMAD3, tissue factor and PAR2.

Authorship

GA: Designed research, performed research, collected data, analyzed and interpreted the data, performed statistical analysis, and wrote the manuscript.

SE: Performed research, collected data, analyzed and interpreted the data and performed statistical analysis

EP: Performed research, collected data, analyzed and interpreted the data.

RA: Performed research, collected data, analyzed and interpreted the data.

LB: Designed research, analyzed and interpreted the data, and wrote the manuscript.

ABSTRACT

Tissue factor (TF) signaling regulates gene expression and protein synthesis leading to the modulation of cell function. Recently, we have demonstrated in microvascular endothelial cells (mECs) that TF signaling induces activation of ETS1 transcription factor. Because combinatorial control is a characteristic property of ETS family members, involving interaction between ETS1 and other transcription factors, here we have investigated whether additional transcription factors are involved in TF-induced angiogenesis. We show by *in vitro* and *in vivo* experiments that in addition to ETS1, SMAD3 contributes to tube-like stabilization induced by TF in mECs. Whereas the ability of TF overexpressing cells to induce gene expression through ETS1 is dependent of AKT signaling, SMAD3 induces ETS1 by an alternative AKT-independent pathway. Moreover, while TF/AKT/ETS1 pathway to induce CCL2 is PAR2 independent, PAR2 is required for TF/SMAD3-induced CCL2 expression. PAR2-dependent activation of SMAD3 is mediated by PKC phosphorylation. In addition, disruption of SMAD3 expression in mECs reduces ERK1/2 phosphorylation and decreases target gene promoter activity. In conclusion, in mECs TF induced-angiogenesis seems to be the result of two signaling pathways: TF induced-microvessel formation is regulated through β 1-integrin/AKT1/ETS1; and TF induced-microvessel stabilization is regulated via PAR2/SMAD3 that is indispensable for maintenance of vascular integrity.

INTRODUCTION

In normal arteries, tissue factor (TF) is constitutively expressed in the endothelial cells (ECs) of the adventitia vasa vasorum, but it is not normally expressed in arterial/venous luminal ECs (Drake et al., 1989; Wilcox et al., 1989; Fleck et al., 1990). TF has been identified in inflammatory cells found in atherosclerotic plaque and in the intraplaque extracellular debris. Upon plaque rupture this TF-pool triggers thrombus formation (Toschi et al., 1997). Rupture of coronary plaques is the most important mechanism underlying the sudden onset of acute coronary syndromes (L. Badimon et al., 1992; J. J. Badimon et al., 1993). Unveiling the molecular pathways implicated in the transition from advanced but stable to vulnerable plaques has been the objective of many studies. In this context, the formation of microvessels (angiogenesis) in the core of the advanced atherosclerotic plaque has been proposed as a contributing factor to the risk of rupture (Juan-Babot et al., 2003; Virmani et al., 2005).

TF, the primary cellular initiator of blood coagulation (Bach, 1988; Edgington et al., 1991), is a transmembrane glycoprotein that forms a complex with the plasma serine protease factor VII (FVII). The TF/FVIIa complex not only triggers the coagulation cascade but also transduces cell signaling via activation of protease-activated receptors (PARs) (Belting et al., 2005; Rao and Pendurthi, 2005; Versteeg and Ruf, 2006) and regulates specific target genes involved in angiogenesis (Pendurthi et al., 1997; Camerer et al., 1999). PARs are a family of G-protein-coupled receptors (PAR1, PAR2, PAR3, PAR4) that are uniquely activated by the proteolytic cleavage of their extracellular portion (Macfarlane et al., 2001). This cleavage unmask a new N-terminus, which serves as a tethered ligand that binds to the second extracellular domain of the protein, resulting in a variety of cellular responses. Only PAR2 is directly cleaved by the TF-bound FVIIa and regulates proangiogenic growth factor expression as well as cell integrins modulating crosstalk with the TF cytoplasmic domain (Ahamed and Ruf, 2004).

Recently, we have demonstrated that monocyte-secreted-Wnt5a binds to FZD5 in microvascular endothelial cells (mECs), triggers the noncanonical Wnt signaling pathway to stimulate NF- κ B and TF expression and induces angiogenesis (Arderiu et al., 2014). Within the molecular mechanisms that control angiogenesis, we reported that TF expression in mECs via intracrine regulation through AKT-Raf/ERK 1/2 and ETS1 expression induces the formation of microvessels (Arderiu et al., 2012a; Arderiu et al., 2012b).

Moreover, ETS1 through its response element in the promoter of the CCL2 gene induces its expression and secreted CCL2 facilitates the recruitment of vascular smooth muscle cells (VSMC) to the peri-endothelial space stabilizing mECs and forming mature mEC-VSMC networks (Arderiu et al., 2011).

ETS proteins are a family of transcription factors that control biological processes, by recognizing the GGA core motif in the promoter or enhancer region of target genes (Wasylyk et al., 1993). Protein-protein interactions regulate DNA binding, subcellular localization, target gene selection and transcriptional activity of ETS proteins. Combinatorial control is a characteristic property of ETS family members (R. Li et al., 2000), involving interaction between ETS and other key transcriptional factors such as AP1 (Wasylyk et al., 1990), AML-1 (Kim et al., 1999), TFE3 (Tian et al., 1999) and SP1 (Dittmer et al., 1994). Such interactions coordinate cellular processes in response to diverse signals. Because transcription factors involved in TF signaling are poorly known, here we explored other possible regulators in addition to ETS1.

As with ETS1 proteins, activation of SMAD proteins often synergize with other transcription factors; in particular, SMAD3 shares with ETS1 the ability to cooperate with AP1 (Zhang et al., 1998), AML-1 (Pardali et al., 2000), TFE3 (Hua et al., 1998) and SP1 (Moustakas and Kardassis, 1998). Moreover, it has been described that in breast cancer cells there are SMAD3/ETS synergies to regulate protein expression (Lindemann et al., 2001). SMAD3 is recognized as a pro-angiogenic factor due to the fact that it mediates TFG β 1-stimulated VEGF-A expression (Nakagawa et al., 2004). In addition, TFG β 1 induces angiogenesis through CCL2 expression via SMAD3 signaling (Ma et al., 2007).

In this study, we evaluated the hypothesis that TF signals through more than one signaling pathway to regulate different transcription factors and gene expression in mECs in order to trigger microvessel formation and ensure the stability of newly formed microvessels. Our results reveal new insights into the control of TF-induced angiogenesis, and the indispensable role of PAR2-SMAD3 in microvessel stabilization.

RESULTS

Tissue factor dependent angiogenesis-related genes

Confluent monolayers of mECs, with a quiescent phenotype, expressed negligible amounts of TF; however, activated mECs growing in 3DBM acquired an angiogenic phenotype and formed tube-like structures, simultaneously showing a rapid and marked TF upregulation (Supplementary Figure S1A). TF silencing (TF⁻) induced inhibition of tube-like formation and on the opposite, TF overexpression (TF⁺), induced a significant increase in the formation of complex capillary structures (Supplementary Figure S1B and C). Thus TF expression levels are directly regulating tube-like formation in mECs. Angiogenesis targeted PCR array analysis was performed in these cells to examine transcript abundance in control scrambled siRNA (WT), TF siRNA (TF⁻) and TF overexpressing (TF⁺) mECs. According to our previous data (Arderiu et al., 2011) 4 hours (time of maximal TF expression) and 24 hours (when tubes are completely formed) were selected to perform the transcriptomic studies. PCR array analysis revealed a significant number of upregulated and downregulated genes depending on TF expression in mECs (Supplementary Table S1). We focused our next studies in gene expression after 4 hours of incubation.

Systems biology approach to identify signaling pathways

To identify the most relevant biological mechanisms, pathways and functions regulated by the identified genes, results were analyzed by bioinformatics using Ingenuity Pathways Analysis (IPA) software (Ingenuity® Systems, <http://www.ingenuity.com>). The top interacting gene networks responding to TF expression were found to be highly significantly enriched for “cellular movement” ($p = 10^{-73}$ to 10^{-13} in TF silenced cells and $p = 10^{-42}$ to 10^{-10} in TF overexpressing cells) (Supplementary Table S2). Pathway analysis of significant networks predicted that transcription factors ETS1 and SMAD3 were involved in TF-regulated angiogenesis. Finally, gene networks were then algorithmically generated based on their connectivity and assigned a score (Supplementary Figure S2). These transcription factors regulate expression of downstream genes that were modulated by TF expression levels. CCL2 appeared regulated by both ETS1 and SMAD3 transcription factors in mECs, being downregulated when TF was silenced and upregulated when TF was overexpressed. We next validated this bioinformatics-based finding.

SMAD3 in TF induced tube-like formation

Previously, we have demonstrated that ETS1 is necessary to induce TF-dependent angiogenesis (Arderiu et al., 2012b), therefore, here we focused on the role of SMAD3 on TF-induced angiogenesis. Gene expression of SMAD3 was validated by real time-PCR and afterwards by protein analysis in mECs (Figure 1A and B). We observed that SMAD3 and phospho-SMAD3 were significantly decreased in TF silenced mECs and upregulated in TF overexpressing cells. It is known that changes in protein-phosphorylation induce protein translocation to the nucleus and binding to specific DNA sequences (Darnell et al., 1994; Attisano and Wrana, 2002; Oikawa and Yamada, 2003). In agreement, western blots of nuclear and cytoplasmic extracts revealed that, in TF overexpressing cells, SMAD3 protein was mainly found in the nucleus (Figure 1C), consistent with increased induction of transcription factor function.

To directly analyze the role of SMAD3 in TF induced angiogenesis, TF silenced mECs were transiently transfected with SMAD3 (Figure 1D). SMAD3 overexpression reversed the inhibitory effect of TF silencing. Area covered by tubes, branching points and tube length were significantly increased (Figure 1E). Similar results were obtained when ETS1 was overexpressed, as previously shown in Arderiu et al. (Arderiu et al., 2012b) and shown here as new control experiments (Supplementary Figure S3). Moreover, co-transfection with both transcription factors resulted in significantly higher increases in tube-like formation than with either ETS1 or SMAD3 alone, and even higher than in control wild type cells. These results indicated that TF induce angiogenesis through both transcription factors, SMAD3 and ETS1.

SMAD3 and ETS1 in TF signaling-induced microvascular tube like formation.

ETS family members act both positively and negatively in the regulation of different steps of the angiogenic process, with the initiation of gene transcription arising from the combined activity of different transcriptional regulators. SMADs interact with other transcription factors to form an active transcriptional complex, and it has been described that in breast cancer cells, SMAD3/ETS synergies to regulate protein expression (Lindemann et al., 2001). Therefore we next studied the possible relation between ETS1 and SMAD3 regulation of gene transcription in mECs during TF-induced signaling. First, TF overexpressing cells with silenced ETS1 gene were transiently transfected with SMAD3. Results show that ETS1 silencing in TF overexpressing mECs inhibited tube formation and these effects could be partially rescued by SMAD3

upregulation (Figure 2A and B). Second, TF overexpressing cells with silenced SMAD3 gene were transiently transfected with ETS1. SMAD3 silencing reduced tube formation, although results were not as significant as when ETS1 was silenced (area covered by tubes was 10 ± 1.25 SMAD3 silencing and 4 ± 0.75 silencing ETS1 respectively vs 25 ± 1.5 control). ETS1 overexpression had a greater effect and the rescued tube formation in SMAD3 silenced cells was more significant than the effect of SMAD3 overexpression in ETS1 silenced cells (Figure 2C and D) (20 ± 1.8 and 11 ± 1.15 respectively vs 25 ± 1.5 control). However in the absence of SMAD3, ETS1 overexpression did not fully rescue tube formation (13 ± 1.8 vs 25 ± 1.5 control * $p < 0.05$) (Supplementary Figure S4). Altogether, these results suggest that both transcription factors contribute to tube formation, but ETS1 acts as the dominant TF-activated transcription factor and SMAD3 reinforces the early TF-induced effect on angiotube formation (4 hours).

SMAD3 and ETS1 in TF-induced CCL2

To further confirm the relation between SMAD3 and ETS1 in TF-activated angiogenesis in mECs, we studied CCL2 expression, a target gene for both transcription factors (see Supplemental Figure S2 and earlier work) (Feinberg et al., 2004; Ma et al., 2007; Arderiu et al., 2012b). To elucidate the effect of SMAD3 on the ability of ETS1 to regulate CCL2 expression, we silenced ETS1 in TF overexpressing cells and transfected them with SMAD3. ETS1 silencing significantly decreased CCL2 mRNA and protein levels and the effect was significantly rescued by SMAD3 (Figure 3A). Moreover, SMAD3 silencing decreased CCL2 and was rescued by ETS1 overexpression. Furthermore, when we transfected ETS1 or SMAD3 individually in TF silenced cells, CCL2 mRNA and protein levels were increased. This effect was further increased by the presence of both transcription factors, ETS1 and SMAD3 (Figure 3B). These results indicated that both transcription factors are needed to regulate TF-induced CCL2 expression to the same levels of control mECs.

Similar results were observed in CCL2 promoter activation (Figure 3C). Co-transfection of CCL2 promoter constructs with expression vectors encoding ETS1 or SMAD3 individually or together show that both transcription factors individually increased CCL2 promoter activity and a higher effect on CCL2 promoter activity was observed in the presence of ETS1 and SMAD3 together. Additionally, we generated mutated CCL2 promoters by altering the ETS1 and SMAD3 response elements by site-directed mutagenesis (Supplementary Figure S5). Single or double mutant CCL2 promoters (Smad3-MUT, Ets-MUT,

Smad3/Ets-MUT) show a reduction in the promoter activity compared to wild type promoter (WT-CCL2 promoter) in Figure 3D. Co-transfection of these mutated promoters with ETS1 or SMAD3 expression vectors respectively show that the promoter activity is partially rescued in both cases, being more evident in ETS1 rescue (Figure 3D). These results indicate that the main transcription factor involved in TF regulated CCL2 expression is ETS1, but SMAD3 cooperates also in the activation of transcription.

All together these findings demonstrate a cooperation between ETS1 and SMAD3 signaling systems, and support the emerging notion that TF-induced angiogenesis is a highly regulated signaling network.

SMAD3 and ETS1 cooperate to activate CCL2 in an AKT-independent fashion

The ability of ETS1 to increase target gene expression in TF-induced angiogenesis is dependent on AKT, a pathway previously shown to be involved in CCL2 expression (Arderiu et al., 2012a). To explore the nature of cooperation between ETS1 and SMAD3 in the activation of CCL2 promoter activity, we examined the effect of pharmacological inhibition of AKT, using the AKT inhibitor LY294002 (Supplementary Figure S6). Figure 3E shows that in TF overexpressing cells inhibition of AKT signaling decreased CCL2 promoter activity, also when ETS1 was cotransfected. However, in SMAD3 cotransfected cells the CCL2 promoter activity was not affected by AKT inhibition, indicating that the activation of SMAD3 does not required AKT activation. Interestingly, the additive activation of CCL2 promoter observed when ETS1 and SMAD3 were cotransfected together was not blocked by AKT inhibitor, indicating that ETS1 when SMAD3 is overexpressed does not require AKT activation to induce CCL2 promoter activity.

SMAD3 through ERK1/2 cooperates with ETS1 to regulate CCL2 expression

To further establish the cooperation between SMAD3 and ETS1 in gene expression, we analyzed the MAPK pathway. In mammary carcinoma cells, SMAD3 regulates ERK1/2 phosphorylation (Fang et al., 2012), and our previous work in mECs show that TF signals through ERK1/2 to activate ETS1 and CCL2 expression (Arderiu et al., 2012b). Figure 3F shows that AKT inhibition activity by LY294002 in TF overexpressing mECs reduced p-ERK1/2 and p-ETS1 and that this effect was partially rescued by SMAD3 transfection. These data indicates that TF signaling in mECs activates ETS1 not only by AKT-ERK1/2, but also may signal through SMAD3-ERK1/2 to activate ETS1 and promote CCL2 transcription when AKT activity is unavailable.

To determine the direct relation between SMAD3 and ERK1/2 signaling in TF-signaling, we used RNA interference for SMAD3. Cells expressing shRNA SMAD3 had a significantly decreased SMAD3 expression, resulting in a partial loss of ERK1/2 phosphorylation, and consequently p-ETS1 and CCL2 were also partially decreased (Figure 3G).

All these results together suggest that TF activates ETS1 signaling through two different pathways, by AKT and by SMAD3.

PAR2 is required for SMAD3 phosphorylation by PKC activation

Previously, we had shown that TF through AKT activates ETS1 and stimulates angiogenesis independently of PAR2 signaling (Arderiu et al., 2012a). To study the influence of PAR2 in TF-SMAD3 signaling, PAR2 was silenced in mECs. PAR2 silencing decreased tube-like structure formation in matrigel cultures, however, the effect was significantly milder than the effect of TF silencing (reduction was 36.9.3% versus 73.7% in TF silenced cells) (Figure 4A). In addition, silencing of PAR2 significantly decreased SMAD3 phosphorylation (Figure 4B). Next, we used a PAR2-agonist (HA-5042: Bachem AG, Bubendorf, Switzerland) (30 μ M) in TF silenced mECs. PAR2-agonist induced a mild rescue of tube-like formation in TF silenced cells and induced a high recovery of SMAD3 phosphorylation (Fig. 4C). These results indicated that SMAD3 regulation is dependent of PAR2 signaling.

SMAD2/3 are phosphorylated and translocated to the nucleus after stimulation by TGF- β (Nakao et al., 1997), and it has been described a transactivation of TGF- β by PAR2 (Chung et al., 2013). Combination of PAR2-agonist with recombinant protein TGF β 1 (PeproTech) did not induce significant increases in SMAD3 phosphorylation in mECs (Figure 4C). In addition, SMAD3 phosphorylation was not affected by TGF- β receptor subunit I inhibitor (SB431532: Sigma) in PAR2-agonist treated cells. Therefore, PAR2 activates SMAD3 phosphorylation via independent mechanisms of TGF- β receptor. In an effort to identify alternative mechanisms for the SMAD3 activation by PAR2, we studied PKC signaling. PAR-mediated signaling via G proteins activates multiple downstream pathways, including those regulated by PKC α (Ahamed and Ruf, 2004). PAR2 activation induced PKC phosphorylation and inhibition of PKC α by Gö6976 (Abcam) showed a significantly reduction of SMAD3 phosphorylation in response to PAR2 agonist (Figure 4D).

We further studied TF signaling mechanisms in mECs by analyzing the role of β 1-integrin in TF activated angiogenesis. It has been described that TF-FVIIa

signaling counteracts β 1 integrin suppression by phosphorylation of the TF cytoplasmic domain (Dorfleutner et al., 2004) and locally triggering PAR2 activation (Camerer et al., 2000; Albrektsen et al., 2007). Silencing of β 1 integrin (Supplementary Figure S7) significantly reduced tube formation, with a significant reduction of phospho-AKT and phospho-ETS1 (Figure 5), obtaining similar results than in TF silenced cells, but it did not significantly affected phospho-SMAD3. FVIIa-treated cells showed similar tube formation than wild type control cells, but FVIIa induced an increase in the levels of phospho-ETS1, and in phospho-SMAD3. Tissue factor pathway inhibitor (TFPI) (American Diagnostica, Inc) (Hembrough et al., 2003) treatment and mutation of TF-FVII binding site in mECs (to interfere with PAR2 signaling) showed a reduction in tube-like formation and reduced levels of phospho-SMAD3, but these treatments did not affect phospho-AKT nor phospho-ETS1.

All together these results indicate that TF, through β 1 integrin signaling, activates AKT-ETS1 independently of PAR2, while SMAD3 activation is dependent of TF-FVIIa-PAR2 signaling (Figure 5C).

TF-angiogenesis: ETS1 induces tube formation and SMAD3 induces tube stabilization

To examine the potential complementary effects of these two transcription factors in TF-induced tube formation, we performed *in vitro* angiogenesis assays in TF overexpressing cells with silenced SMAD3 or ETS1 cells. Figure 6 shows that TF overexpressing cells move quickly and at 2 hours they align themselves end-to-end and elongate to form tubes, and form network-like structures that are maintained up to 24 hours. SMAD3 silenced cells, take longer to elongate and form tubes (6 hours), after they have the same behavior of control cells (TF⁺), form typical networks, but these are not maintained over the time. ETS1 silenced cells initially have the same behavior of SMAD3, they take longer to form networks but they become well formed over time. These results indicated that ETS1 induce tube formation and SMAD3 the stabilization of tube-like structures.

***In vivo* effects of ETS1 and SMAD3 on angiogenesis**

Next, to evidence that TF-PAR2-SMAD3 induces microvessel stabilization *in vivo*, we performed two different experimental approaches. First, we subcutaneously inoculated nude mice with 1×10^7 mECs with (i) scrambled siRNA mECs; (ii) TF siRNA; (iii) ETS1 siRNA; (iv) SMAD3 siRNA; and (v) PAR2 siRNA in matrigel plugs. The cells implanted in matrigel plugs retained their

viability and silencing was sustained over the course of the entire experiment (data not shown). Angiogenesis was evaluated after 7 days in skin surrounding the plug (Figure 7A and B and Supplementary Figure S8) and into the matrigel plug (Figure 7C and D). Skin surrounding the implanted matrigel plug with scrambled RNA mECs showed well-developed zones of neovascularization compared with PBS control samples (Supplementary Figure S9). Both in the skin and into the plug, we observed that the main vessels were thick and showed frequent branching and abundant blood-filled channels containing red blood cells. In contrast, when TF was silenced, neovascularization was abolished and was comparable to that found in skin surrounding control samples, and in the plug, there were no structured vessels. When we implanted matrigel plugs with ETS1 siRNA, neovascularization in skin surrounding the plug was significantly suppressed, only thin main branches with few ramifications were found, inside the plugs we observed small vessels without branching. In contrast, when we silenced SMAD3 in mECs, branches were developed around the main vessel in skin and plugs; however, these microvessels were not stable showing leaking zones. In addition, when PAR2 was silenced in mECs, active angiogenesis, with thick and tortuous main vessels with many secondary branches were observed but these microvessels were not stable as demonstrated by the presence of red cells around the vessel.

In the second approach, we investigated angiogenesis in a murine hemangioma cell line (EOMA). A hemangioma is a benign and usually self-involuting tumor of endothelial cells that line blood vessels. They are characterized by developing increased number of normal or abnormal vessels filled with blood. EOMA cells did not express TF but express PAR2 compared with mouse aortic endothelial cells (Supplementary Figure S10). We infected EOMA cells with a lentiviral vector expressing TF and evaluated growth and morphology in *in vitro* and *in vivo* experiments. We observed that in contrast to control EOMA cells which form cyst-like structures when cultured on 3DBM (Figure 8A), TF expressing EOMA cells formed branching structures which partially restored the branching networks formed by angiogenic HMEC-1 that express endogenous TF.

Next, we predicted that restoring TF would also block the growth of endotheliomas *in vivo*. We subcutaneously inoculated nude mice with 2.5×10^6 EOMA (control) or TF expressing EOMA cells. After seven days, large hemangiomas were observed in mice receiving control EOMA cells, while

tumors in mice receiving TF expressing EOMA cells were visibly smaller (Figure 8C and D).

HVSMC migration toward mECs is regulated by ETS1 and SMAD3 during TF-signaling in mECs

Previously, we have demonstrated that secreted CCL2 from mECs stabilizes the angiogenic effect of TF by recruiting smooth muscle cells toward endothelial cells facilitating maturation of new microvessels (Arderiu et al., 2011). Here we show that CCL2 expression depends on ETS1 and SMAD3. Thus, it is fair to hypothesize that both ETS1 and SMAD3 are in charge of recruiting smooth muscle cells to endothelial cells to form mature microvessels. We used two different approaches; wound healing assay and migration chambers, to test our hypothesis. In both cases, we combined HVSMC and mECs with different levels of SMAD3 or ETS1 expression. Results indicated that both ETS1 and SMAD3 signaling contribute to induce HVSMC recruitment toward mECs (Supplementary Figure S11).

DISCUSSION

Angiogenesis is involved in different pathophysiological processes. In atherosclerotic plaques it has been associated with the risk of plaque rupture (Virmani et al., 2005). Recently, we have reported that endothelial microvessels within the coronary atherosclerotic plaque core express TF, while the luminal ECs over the same plaques do not express TF. Indeed, only intraplaque microvessels express TF and CCL2 (Arderiu et al., 2011). Because of the recognized importance of intraplaque angiogenesis in the fate and complication of the plaques, here, we aimed at advancing our understanding of the pathways and transcription factors involved in TF-induced angiogenesis. In this study, using bioengineered cells to express different levels of TF, we identify a complex network of transcription factors. We report an ETS1/SMAD3 cooperation that substantially enhances the effect of TF in angiogenesis, ETS1 inducing tube formation and SMAD3 contributing to their stabilization. We indeed show that PAR2/SMAD3 signaling in mECs is indispensable for maintenance of vascular integrity via TF-induced angiogenesis.

A wide range of transcription factors regulates the angiogenic process. IPA analysis, taking together all the significantly changed genes, predicted that several transcription factors were involved in the regulation of TF-induced angiogenesis. ETS1 previously studied by our group (Arderiu et al., 2012b), was predicted by IPA as the most relevant transcription factor in TF-dependent angiogenesis. Additionally, we found SMAD3 to be significantly modified by TF signaling. ETS proteins constitute a family of conserved sequence specific DNA-binding proteins that function as transcription factors. Activation of gene transcription by ETS often involves synergisms with other transcription factors (Li et al., 2000). As with the ETS proteins, activation of genes by SMAD proteins often involves synergisms with other transcription factors (Hua et al., 1998). Here we show that ETS1 and SMAD3 cooperate to regulate CCL2 gene expression. Interestingly, it has been shown that SMAD3 and ETS1 co-immunoprecipitate and form a transcriptionally active complex with the transcriptional cofactor p300 (Pei et al., 2003).

TF signals through AKT to induce ETS1 activity and CCL2 expression (Arderiu et al., 2012a). Here, we further show that whereas the ability of TF to activate the CCL2 promoter through ETS1 is dependent on AKT activation, in the presence of co-transfected SMAD3 TF does not require AKT, suggesting that the activation of SMAD3 can bypass the requirement for AKT in ETS1 activation

of target promoter genes. Our results indicate that in absence of AKT kinase activity, SMAD3 through ERK1/2 phosphorylates ETS1 that translocates to the nucleus and induces gene expression. In fibroblasts, complexes between SMAD3, p38 α and ERK1/2 have also shown to regulate gene expression (Leivonen et al., 2013). Furthermore, while TF-AKT-ETS1 pathway is PAR2-independent, SMAD3 activation is triggered by TF-PAR2 signaling independently of AKT1 pathway.

SMADs are intracellular proteins that transduce extracellular signals from transforming growth factor beta ligands (TGF β) to the nucleus where they activate downstream gene transcription. Recently, Chung et al. (Chung et al., 2013) have demonstrated that PAR2 activates SMAD2 pathway by TGF β -receptor transactivation. However, here we demonstrated that in mECs inhibition of TGF β -receptor was not sufficient to inhibited SMAD3 phosphorylation stimulated by TF-PAR2 signaling. We proposed that SMAD3 activation by TF-PAR2 is processed through PKC α . There are clear evidences showing that TGF β -independent mediators, such as MAPK, can activate SMAD2 (J. H. Li et al., 2004). MAPK signaling may be mediated by PKC α (Mauro et al., 2002). Moreover, consistent with our results, PAR2 has shown to activate MAPK pathways (Liu and Mueller, 2006) and ERK1/2 by PKC-dependent pathway in murine cells (DeFea et al., 2000) and SMAD3 signaling is regulated by PKC in fibroblast cells (Yakymovych et al., 2001). These results are summarized in Figure 6C showing that the TF signaling network to induce angiogenesis has a crossed regulation via ETS1 and SMAD3 pathways.

To conclude, these results indicate that in mECs TF signals through two different pathways to activate different transcription factors and induce neovessel formation and finally stabilization. Thus, we have described two signaling pathways, TF-induced neovessel formation through TF-AKT1-ETS1 and the new pathway were TF-PAR2-dependent signaling via SMAD3 is indispensable to induce neovessel stabilization.

MATERIAL AND METHODS

SMAD3/ETS1 transcriptional cooperation in response to TF-PAR2 signaling has been investigated in mECs. For details on cell models, animal models and transfection protocol; silencing RNA and lentiviral infection and transfection; release of cellular structures and RNA or protein extraction from three dimensional cultures; promoter activity by luciferase gene reporter assays; wound healing assay and transwell migration assay; angiogenesis assay and tumor formation *in vivo*, an expanded methods section is available in the Online Data Supplement.

ACKNOWLEDGMENT

We thank Olaya Garcia for their excellent technical assistance. We thank the Fundación de Investigación Cardiovascular and the Fundación Jesus Serra for their support.

FUNDING

This work was supported by grants from Ministry of Science and Education of Spain (SAF2013-42962-R to L.B.) and from Instituto de Salud Carlos III (RIC-RD12/0042/0027 and TERCEL RD12/0019/0026 to L.B.), and (CPII13/00012, PI12/02332 to G.A.). All grants were co-financed by European Union Funds, Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER) "Una manera de hacer Europa".

CONFLICT OF INTEREST

None

NONSTANDARD ABBREVIATIONS

AKT1	V-Akt Murine Thymoma Viral Oncogene Homolog 1
CCL2	Chemokine (C-C Motif) Ligand 2
ECs	Endothelial cells
ETS1	v-ets avian erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 1
mECs	Microvascular endothelial cells
PKC	Protein Kinase C, alpha
PAR2	F2RL1, Coagulation Factor II (Thrombin) Receptor-Like 1
SMAD3	SMAD family member 3
TF	Tissue factor
VSMCs	Vascular smooth muscle cells
3DBM	Three dimensional basement membrane culture

REFERENCES

- Ades, E.W., Candal, F.J., Swerlick, R.A., et al. (1992). HMEC-1: establishment of an immortalized human microvascular endothelial cell line. *J Invest Dermatol* 99, 683-690.
- Ahamed, J., and Ruf, W. (2004). Protease-activated receptor 2-dependent phosphorylation of the tissue factor cytoplasmic domain. *J Biol Chem* 279, 23038-23044.
- Albrektsen, T., Sorensen, B.B., Hjorto, G.M., et al. (2007). Transcriptional program induced by factor VIIa-tissue factor, PAR1 and PAR2 in MDA-MB-231 cells. *J Thromb Haemost* 5, 1588-1597.
- Aoki, T., Kataoka, H., Nishimura, M., et al. (2010). Ets-1 promotes the progression of cerebral aneurysm by inducing the expression of MCP-1 in vascular smooth muscle cells. *Gene Ther* 17, 1117-1123.
- Arderiu, G., Cuevas, I., Chen, A., et al. (2007). HoxA5 stabilizes adherens junctions via increased Akt1. *Cell Adh Migr* 1, 185-195.
- Arderiu, G., Espinosa, S., Aledo, R., et al. (2014). Monocyte crosstalk to microvascular endothelial cells through Wnt5a-FZD5 induces TF-angiogenesis. *J Molecular Cell Biol In press*, S100.
- Arderiu, G., Pena, E., Aledo, R., et al. (2012a). Tissue factor-Akt signaling triggers microvessel formation. *J Thromb Haemost* 10, 1895-1905.
- Arderiu, G., Pena, E., Aledo, R., et al. (2012b). Ets-1 transcription is required in tissue factor driven microvessel formation and stabilization. *Angiogenesis* 15, 657-669.
- Arderiu, G., Pena, E., Aledo, R., et al. (2011). Tissue factor regulates microvessel formation and stabilization by induction of chemokine (C-C motif) ligand 2 expression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 31, 2607-2615.
- Attisano, L., and Wrana, J.L. (2002). Signal transduction by the TGF-beta superfamily. *Science* 296, 1646-1647.
- Bach, R.R. (1988). Initiation of coagulation by tissue factor. *CRC Crit Rev Biochem* 23, 339-368.
- Badimon, J.J., Fuster, V., Chesebro, J.H., et al. (1993). Coronary atherosclerosis. A multifactorial disease. *Circulation* 87, II3-16.
- Badimon, L., Chesebro, J.H., and Badimon, J.J. (1992). Thrombus formation on ruptured atherosclerotic plaques and rethrombosis on evolving thrombi. *Circulation* 86, III74-85.
- Belting, M., Ahmed, J., and Ruf, W. (2005). Signaling of the tissue factor coagulation pathway in angiogenesis and cancer. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25, 1545-1550.

- Camerer, E., Huang, W., and Coughlin, S.R. (2000). Tissue factor- and factor X-dependent activation of protease-activated receptor 2 by factor VIIa. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 5255-5260.
- Camerer, E., Rottingen, J.A., Gjernes, E., et al. (1999). Coagulation factors VIIa and Xa induce cell signaling leading to up-regulation of the egr-1 gene. *J Biol Chem* 274, 32225-32233.
- Carrio, M., Arderiu, G., Myers, C., et al. (2005). Homeobox D10 induces phenotypic reversion of breast tumor cells in a three-dimensional culture model. *Cancer Res* 65, 7177-7185.
- Choi, Y.B., and Nicholas, J. (2010). Induction of angiogenic chemokine CCL2 by human herpesvirus 8 chemokine receptor. *Virology* 397, 369-378.
- Chung, H., Ramachandran, R., Hollenberg, M.D., et al. (2013). Proteinase-activated receptor-2 transactivation of epidermal growth factor receptor and transforming growth factor-beta receptor signaling pathways contributes to renal fibrosis. *J Biol Chem* 288, 37319-37331.
- Darnell, J.E., Jr., Kerr, I.M., and Stark, G.R. (1994). Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science* 264, 1415-1421.
- DeFea, K.A., Zalevsky, J., Thoma, M.S., et al. (2000). beta-arrestin-dependent endocytosis of proteinase-activated receptor 2 is required for intracellular targeting of activated ERK1/2. *J Cell Biol* 148, 1267-1281.
- Dittmer, J., Geggone, A., Gitlin, S.D., et al. (1994). Regulation of parathyroid hormone-related protein (PTHrP) gene expression. Sp1 binds through an inverted CACCC motif and regulates promoter activity in cooperation with Ets1. *J Biol Chem* 269, 21428-21434.
- Dorfleutner, A., Hintermann, E., Tarui, T., et al. (2004). Cross-talk of integrin alpha3beta1 and tissue factor in cell migration. *Mol Biol Cell* 15, 4416-4425.
- Drake, T.A., Morrissey, J.H., and Edgington, T.S. (1989). Selective cellular expression of tissue factor in human tissues. Implications for disorders of hemostasis and thrombosis. *Am J Pathol* 134, 1087-1097.
- Edgington, T.S., Mackman, N., Brand, K., et al. (1991). The structural biology of expression and function of tissue factor. *Thromb Haemost* 66, 67-79.
- Fang, W.B., Jokar, I., Zou, A., et al. (2012). CCL2/CCR2 chemokine signaling coordinates survival and motility of breast cancer cells through Smad3 protein- and p42/44 mitogen-activated protein kinase (MAPK)-dependent mechanisms. *J Biol Chem* 287, 36593-36608.
- Feinberg, M.W., Shimizu, K., Lebedeva, M., et al. (2004). Essential role for Smad3 in regulating MCP-1 expression and vascular inflammation. *Circ Res* 94, 601-608.
- Fleck, R.A., Rao, L.V., Rapaport, S.I., et al. (1990). Localization of human tissue factor antigen by immunostaining with monospecific, polyclonal anti-human tissue factor antibody. *Thromb Res* 59, 421-437.

- Gao, S., Alarcon, C., Sapkota, G., et al. (2009). Ubiquitin ligase Nedd4L targets activated Smad2/3 to limit TGF-beta signaling. *Mol Cell* 36, 457-468.
- Hembrough, T.A., Swartz, G.M., Papathanassiou, A., et al. (2003). Tissue factor/factor VIIa inhibitors block angiogenesis and tumor growth through a nonhemostatic mechanism. *Cancer Res* 63, 2997-3000.
- Hua, X., Liu, X., Ansari, D.O., et al. (1998). Synergistic cooperation of TFE3 and smad proteins in TGF-beta-induced transcription of the plasminogen activator inhibitor-1 gene. *Genes Dev* 12, 3084-3095.
- Juan-Babot, J.O., Martinez-Gonzalez, J., Berrozpe, M., et al. (2003). [Neovascularization in human coronary arteries with lesions of different severity]. *Rev Esp Cardiol* 56, 978-986.
- Kim, W.Y., Sieweke, M., Ogawa, E., et al. (1999). Mutual activation of Ets-1 and AML1 DNA binding by direct interaction of their autoinhibitory domains. *EMBO J* 18, 1609-1620.
- Leivonen, S.K., Lazaridis, K., Decock, J., et al. (2013). TGF-beta-elicited induction of tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP)-3 expression in fibroblasts involves complex interplay between Smad3, p38alpha, and ERK1/2. *PLoS One* 8, e57474.
- Li, J.H., Huang, X.R., Zhu, H.J., et al. (2004). Advanced glycation end products activate Smad signaling via TGF-beta-dependent and independent mechanisms: implications for diabetic renal and vascular disease. *FASEB J* 18, 176-178.
- Li, R., Pei, H., and Watson, D.K. (2000). Regulation of Ets function by protein - protein interactions. *Oncogene* 19, 6514-6523.
- Lindemann, R.K., Ballschmieter, P., Nordheim, A., et al. (2001). Transforming growth factor beta regulates parathyroid hormone-related protein expression in MDA-MB-231 breast cancer cells through a novel Smad/Ets synergism. *J Biol Chem* 276, 46661-46670.
- Liu, Y., and Mueller, B.M. (2006). Protease-activated receptor-2 regulates vascular endothelial growth factor expression in MDA-MB-231 cells via MAPK pathways. *Biochemical and biophysical research communications* 344, 1263-1270.
- Ma, J., Wang, Q., Fei, T., et al. (2007). MCP-1 mediates TGF-beta-induced angiogenesis by stimulating vascular smooth muscle cell migration. *Blood* 109, 987-994.
- Macfarlane, S.R., Seatter, M.J., Kanke, T., et al. (2001). Proteinase-activated receptors. *Pharmacological reviews* 53, 245-282.
- Mauro, A., Ciccarelli, C., De Cesaris, P., et al. (2002). PKCalpha-mediated ERK, JNK and p38 activation regulates the myogenic program in human rhabdomyosarcoma cells. *J Cell Sci* 115, 3587-3599.
- Moustakas, A., and Kardassis, D. (1998). Regulation of the human p21/WAF1/Cip1 promoter in hepatic cells by functional interactions between Sp1 and Smad family members. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 6733-6738.

- Nakagawa, T., Li, J.H., Garcia, G., et al. (2004). TGF-beta induces proangiogenic and antiangiogenic factors via parallel but distinct Smad pathways. *Kidney international* 66, 605-613.
- Nakao, A., Imamura, T., Souchelnytskyi, S., et al. (1997). TGF-beta receptor-mediated signalling through Smad2, Smad3 and Smad4. *EMBO J* 16, 5353-5362.
- Oikawa, T., and Yamada, T. (2003). Molecular biology of the Ets family of transcription factors. *Gene* 303, 11-34.
- Otero-Vinas, M., Llorente-Cortes, V., Pena, E., et al. (2007). Aggregated low density lipoproteins decrease metalloproteinase-9 expression and activity in human coronary smooth muscle cells. *Atherosclerosis* 194, 326-333.
- Pardali, E., Xie, X.Q., Tsapogas, P., et al. (2000). Smad and AML proteins synergistically confer transforming growth factor beta1 responsiveness to human germ-line IgA genes. *J Biol Chem* 275, 3552-3560.
- Pei, H., Yordy, J.S., Leng, Q., et al. (2003). EAPII interacts with ETS1 and modulates its transcriptional function. *Oncogene* 22, 2699-2709.
- Pendurthi, U.R., Alok, D., and Rao, L.V. (1997). Binding of factor VIIa to tissue factor induces alterations in gene expression in human fibroblast cells: up-regulation of poly(A) polymerase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 12598-12603.
- Rao, L.V., and Pendurthi, U.R. (2005). Tissue factor-factor VIIa signaling. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25, 47-56.
- Ruf, W., Schullek, J.R., Stone, M.J., et al. (1994). Mutational mapping of functional residues in tissue factor: identification of factor VII recognition determinants in both structural modules of the predicted cytokine receptor homology domain. *Biochemistry* 33, 1565-1572.
- Szotowski, B., Goldin-Lang, P., Antoniak, S., et al. (2005). Alterations in myocardial tissue factor expression and cellular localization in dilated cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 45, 1081-1089.
- Tian, G., Erman, B., Ishii, H., et al. (1999). Transcriptional activation by ETS and leucine zipper-containing basic helix-loop-helix proteins. *Molecular and cellular biology* 19, 2946-2957.
- Toschi, V., Gallo, R., Lettino, M., et al. (1997). Tissue factor modulates the thrombogenicity of human atherosclerotic plaques. *Circulation* 95, 594-599.
- Versteeg, H.H., and Ruf, W. (2006). Emerging insights in tissue factor-dependent signaling events. *Semin Thromb Hemost* 32, 24-32.
- Virmani, R., Kolodgie, F.D., Burke, A.P., et al. (2005). Atherosclerotic plaque progression and vulnerability to rupture: angiogenesis as a source of intraplaque hemorrhage. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25, 2054-2061.
- Wasylyk, B., Hahn, S.L., and Giovane, A. (1993). The Ets family of transcription factors. *Eur J Biochem* 211, 7-18.

RESULTADOS

- Wasylyk, B., Wasylyk, C., Flores, P., et al. (1990). The c-ets proto-oncogenes encode transcription factors that cooperate with c-Fos and c-Jun for transcriptional activation. *Nature* 346, 191-193.
- Wilcox, J.N., Smith, K.M., Schwartz, S.M., et al. (1989). Localization of tissue factor in the normal vessel wall and in the atherosclerotic plaque. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 2839-2843.
- Yakymovych, I., Ten Dijke, P., Heldin, C.H., et al. (2001). Regulation of Smad signaling by protein kinase C. *FASEB J* 15, 553-555.
- Zhang, Y., Feng, X.H., and Derynck, R. (1998). Smad3 and Smad4 cooperate with c-Jun/c-Fos to mediate TGF-beta-induced transcription. *Nature* 394, 909-913.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. SMAD3 is involved in TF-induced microvascular endothelial cell tube-like formation. **(A)** Real-time PCR analysis of SMAD3 mRNA levels in scrambled siRNA (WT), TF siRNA (TF⁻) or TF overexpressed (TF⁺) cells cultured in matrigel for 4 hours. Results are expressed as % mRNA expression \pm SEM (**p<0.01 and ***p<0.001 vs WT, n = 3). **(B)** Western blots show phospho-SMAD3 (Ser423/424) and SMAD3 proteins from scrambled (WT), TF siRNA (TF⁻) or TF overexpressing (TF⁺) endothelial cells cultured in matrigel for 4 hours. To test for the equal loading, western blots were reprobed for β -actin (n = 3). Histogram shows densitometric analysis of the average levels for protein to β -actin. Results are expressed as \pm SEM from three independent experiments (*** p<0.001 vs WT). **(C)** Panel shows western blot of SMAD3 in Triton-100 soluble (Cytoplasm) and insoluble (Nucleus) fractions in control, TF silenced or overexpressed cells (n = 3). **(D)** Western blots show TF and SMAD3 protein from control scrambled siRNA-treated cells (WT), cells with silenced TF (TF⁻), and cells with silenced TF with SMAD3 overexpression (TF⁻/SMAD3⁺) cultured in 3DBM for 4 hours. Histogram shows densitometric analysis of the average levels in each condition normalized for β -actin (n = 4). Results are expressed as mean \pm SEM (***p<0.001 vs WT and ###p<0.001 vs TF silenced). **(E)** Phase contrast micrographs show morphology of WT, TF⁻, TF⁻ with SMAD3 overexpression (TF⁻/SMAD3⁺) cells cultured in 3DBM for 4 hours, original magnification x20. Charts show areas covered by tubes (%), branching points and tube length. Histograms represent means \pm SEM from three independent experiments (***p<0.001 vs WT and ##p<0.01 and ### p<0.001 vs TF silenced).

Figure 2. ETS1 and SMAD3 in TF-microvascular endothelial cells tube-like formation. **(A)** Phase contrast micrographs show morphology of TF overexpressing cells (TF⁺), TF overexpressing cells with silenced ETS1 (TF⁺/ETS1⁻) or TF overexpressing cells with silenced ETS1 and overexpressed SMAD3 (TF⁺/ETS1⁻/SMAD3⁺), cells were cultured in 3DBM for 4 hours, original magnification x20. Charts show area covered by tubes (%), branching points and tube length. Histograms represent means \pm SEM from three independent experiments (*p<0.05, **p<0.01 and ***p<0.001). **(B)** Western blots show ETS1, phospho-SMAD3 (Ser 423/425) and SMAD3 protein. Histogram shows densitometric analysis of the average levels in each condition (n = 4). Results are expressed as mean \pm SEM (***p<0.001). **(C)** Phase contrast micrographs

show morphology of TF overexpressing cells (TF⁺), TF overexpressing cells with SMAD3 silenced (TF⁺/SMAD3⁻), or TF overexpressing cells with SMAD3 silenced and ETS1 overexpression (TF⁺/SMAD3⁻/ETS1⁺) cultured in 3DBM for 4 hours, original magnification x20, charts show area covered by tubes %, branching points and tube length. Histograms represent means \pm SEM from four independent experiments (*p<0.05, **p<0.01 and ***p<0.001). **(D)** Western blots show SMAD3, phospho-ETS1 (Thr 38) and ETS1 protein. Histogram shows densitometric analysis of the average levels in each condition (n = 4). Results are expressed as mean \pm SEM (***p<0.001).

Figure 3. SMAD3 cooperates with ETS1 to activate the CCL2 promoter independently of AKT activity. **(A)** Real-time PCR and western-blot analysis of CCL2 in TF overexpressing cells cultured in 3DBM for 4 hours: scrambled cells (TF⁺), ETS1 silenced (TF⁺/ETS1⁻), co-transfected with SMAD3 (TF⁺/SMAD3⁺), ETS1 silenced co-transfected with SMAD3 (TF⁺/ETS1⁻/SMAD3⁺), co-transfected with ETS1 (TF⁺/ETS1⁺), SMAD3 silenced (TF⁺/SMAD3⁻) and SMAD3 silenced co-transfected with ETS1 (TF⁺/SMAD3⁻/ETS1⁺). Results are expressed as mean \pm SEM. *p<0.05, **p<0.01 and ***p<0.001 (n = 3). **(B)** Real-time PCR and western-blot analysis of CCL2 in endothelial cells cultured in 3DBM for 4 hours: scrambled cells (WT), TF silenced (TF⁻), TF silenced co-transfected with ETS1 (TF⁻/ETS1⁺), TF silenced co-transfected with SMAD3 (TF⁻/SMAD3⁺), and TF silenced co-transfected with ETS1 and SMAD3 (TF⁻/ETS1⁺/SMAD3⁺). Results are expressed as mean \pm SEM. *p<0.05, **p<0.01 and ***p<0.001 (n = 3). **(C)** TF overexpressing HMEC cells were transfected with CCL2 promoter (-560 bp to +60 bp) and cotransfected with SMAD3 and ETS1 expression vectors or empty-vector as control. Promoter activity was measured by luciferase normalized by Renilla and represented as mean \pm SEM. *p<0.05 and ***p<0.001. **(D)** TF overexpressing HMEC cells were transfected with CCL2 promoter (-560 bp to +60 bp): WT, and mutated constructs of SMAD3 and ETS1 binding sites located at -253 and -154, respectively (Smad3-MUT and Ets1-MUT), and cotransfected with SMAD3 and ETS1 expression vectors or empty-vector as control. Promoter activity was measured by luciferase normalized by Renilla and represented as mean \pm SEM. *p<0.05 (n = 3). **(E)** CCL2 promoter was transfected in TF overexpressing cells in the absence or presence of ETS1 or SMAD3 expression vector as indicated and in the presence or absence of LY294002. Histograms represent the mean \pm SEM of three separate experiments run in triplicates (*p<0.05, **p<0.01 and ***p<0.001). **(F)** Western blots of phosphor-ERK1/2, ERK1/2, phosphor-ETS1, ETS1, and CCL2

proteins obtained from lysates of TF overexpressing cells co-transfected with SMAD3 cultured in 3DBM for 4 hours with or without LY294002. Histogram shows densitometric analysis of the average levels for protein to β -actin. Results are expressed as \pm SEM from four independent experiments (* p <0.05, ** p <0.01 and *** p <0.001). **(G)** Western blots of SMAD3, phosphor-ERK1/2, ERK1/2, phosphor-ETS1, ETS1 and CCL2 proteins obtained from lysates of TF overexpressing cells co-transfected with SMAD3 shRNA cultured in 3DBM for 4 hours. Histogram shows densitometric analysis of the average levels for protein to β -actin. Results are expressed as \pm SEM from four independent experiments (** p <0.01 and *** p <0.001 vs TF overexpressing cells).

Figure 4. SMAD3 activation requires TF-PAR2 signaling in microvascular endothelial cells. **(A)** Phase contrast micrographs show morphology of scrambled siRNA (WT), PAR2 siRNA (PAR2⁻), TF siRNA (TF⁻) transfected cells. TF⁻ cells were treated with PAR2 agonist (H-5042) (30 μ M) (TF⁻ + PAR2-a) and rescue of tube formation was analyzed (scale bar 100 μ m). Original magnification x20, charts show area covered by tubes %, branching points and tube length. Histograms represent means \pm SEM (n = 4) (** p <0.01 and *** p <0.001). **(B)** Western blot showing, PAR2, p-SMAD3, SMAD3, p-ETS1 and ETS1 protein expression in cells treated with scrambled siRNA (WT) or PAR2 siRNA (PAR2⁻). Histogram shows densitometric analysis of the average levels for protein to β -actin. Results are expressed as \pm SEM from four independent experiments (** p <0.01 and *** p <0.001 vs WT). **(C)** Western blot showing, p-SMAD3 and SMAD3 protein expression in cells treated with scrambled siRNA (WT) or TF siRNA (TF⁻) in absence or presence of PAR2 agonist (PAR2-a), TGF β (0.01 ng/ml) or TGF β -inhibitor (10 μ M). Histogram shows densitometric analysis of the average levels for protein to β -actin. Results are expressed as \pm SEM from four independent experiments (*** p <0.001). **(D)** Western blot showing, p-PKC α , PKC α and p-SMAD3 expression in cells treated with or without PAR2 agonist (PAR2-a) or PKC α inhibitor (Gö6976, 10 pM). Histogram shows densitometric analysis of the average levels for protein to β -actin. Results are expressed as \pm SEM from four independent experiments (*** p <0.001).

Figure 5. Role of β 1-integrin and FVIIa in TF-signaling during tube-like formation in mECs. **(A)** Phase contrast micrographs show morphology of mECs (WT), mECs with silenced β 1-integrin (β 1-inte⁻), mECs with 50nM of FVIIa (FVIIa) (Calbiochem), mECs with 50nM of TFPI (TFPI), mECs mutated in TF for

FVII binding site (mut-FVII bs), and TF silenced mECs (TF⁻) were cultured in 3DBM for 4 hours, original magnification x20. Charts show area covered by tubes (%), branching points and tube length. Histograms represent means \pm SEM from three independent experiments (* p <0.05 and *** p <0.001 vs WT). **(B)** Western blots show phospho-AKT, AKT, phospho-ETS (Thre 38), ETS1, phospho-SMAD3 (Ser 423/425) and SMAD3 protein. Histogram shows densitometric analysis of the average levels in each condition (n = 4). Results are expressed as mean \pm SEM (* p <0.05, ** p <0.01 and *** p <0.001). **(C)** Schematic diagram of transcription factor cooperation induced by tissue factor (TF) signaling to induce angiogenesis: TF activates the main transcription factor ETS1 through AKT and ERK1/2 signaling or through a cooperative transcription factor SMAD3 through PAR2 and ERK1/2 signaling to up regulate CCL2 gene expression.

Figure 6. ETS1 induces formation and SMAD3 stabilization in TF-induced mEC tube formation. Phase contrast micrographs show morphology of TF overexpressing cells (TF⁺), TF overexpressing cells with silenced SMAD3 (TF⁺/SMAD3⁻) and TF overexpressing cells with silenced ETS1 (TF⁺/ETS1⁻) cells were cultured in 3DBM for 24 hours, images were taken at different times (n = 3). Original magnification x20. Charts show area covered by tubes (%), branching points and tube length. Histograms represent means \pm SEM from three independent experiments (* p <0.05, ** p <0.01 and *** p <0.001).

Figure 7. Endothelial microvessels formed in matrigel plugs *in vivo*. Macroscopic view of representative skin tissues **(A)** and matrigel plugs **(C)** after 7 days matrigel plugs injection. Matrigel plugs contained 1×10^7 of: scrambled siRNA HMEC-1 cells (WT); TF siRNA HMEC-1 cells (TF); ETS1 siRNA HMEC-1 cells (ETS1); SMAD3 siRNA HMEC-1 cells (SMAD3); and PAR2 siRNA HMEC-1 cells (PAR2). Images are representative from 6 animals for each group. **(B)** and **(D)** are magnifications of **(A)** and **(C)** respectively.

Figure 8. TF promotes branching of hemangioma cells in 3DBM. **(A)** Phase contrast micrographs shows morphology of control transfected EOMA cells and EOMA cells expressing TF 24 hours after culturing on Matrigel. Tube-like structures were analyzed by measuring tube length, histograms represent means \pm SEM from three independent experiments (*** p <0.001). **(B)** Real-time PCR analysis of TF, ETS1, SMAD3 and PAR2 mRNA levels in scrambled siRNA (EOMA), or TF overexpressed (EOMA-TF⁺) cells cultured in matrigel for

24 hours. Results are expressed as % mRNA expression \pm SEM (** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ vs EOMA, $n = 3$). **(C)** Western blots show TF, phospho-ETS1, ETS1, phospho-SMAD3 (Ser423/424), SMAD3 and PAR2 proteins from scrambled (EOMA) or TF overexpressing (EOMA-TF⁺) cells cultured in matrigel for 24 hours. To test for the equal loading, western blots were reprobed for β -actin ($n = 3$). Histogram shows densitometric analysis of the average levels for protein to β -actin. Results are expressed as \pm SEM from three independent experiments (** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ vs WT). **TF blocks hemangioma growth in vivo.** Photographs showing visible hemangiomas in mice receiving 2.5×10^6 control transfected EOMA **(D)** or TF transduced EOMA cells **(E)**. Left panels show external appearance of the inoculation sites and right panels show the hematoxylin-eosin staining of tumors. Images are representative of six animals for group.

Figure 1

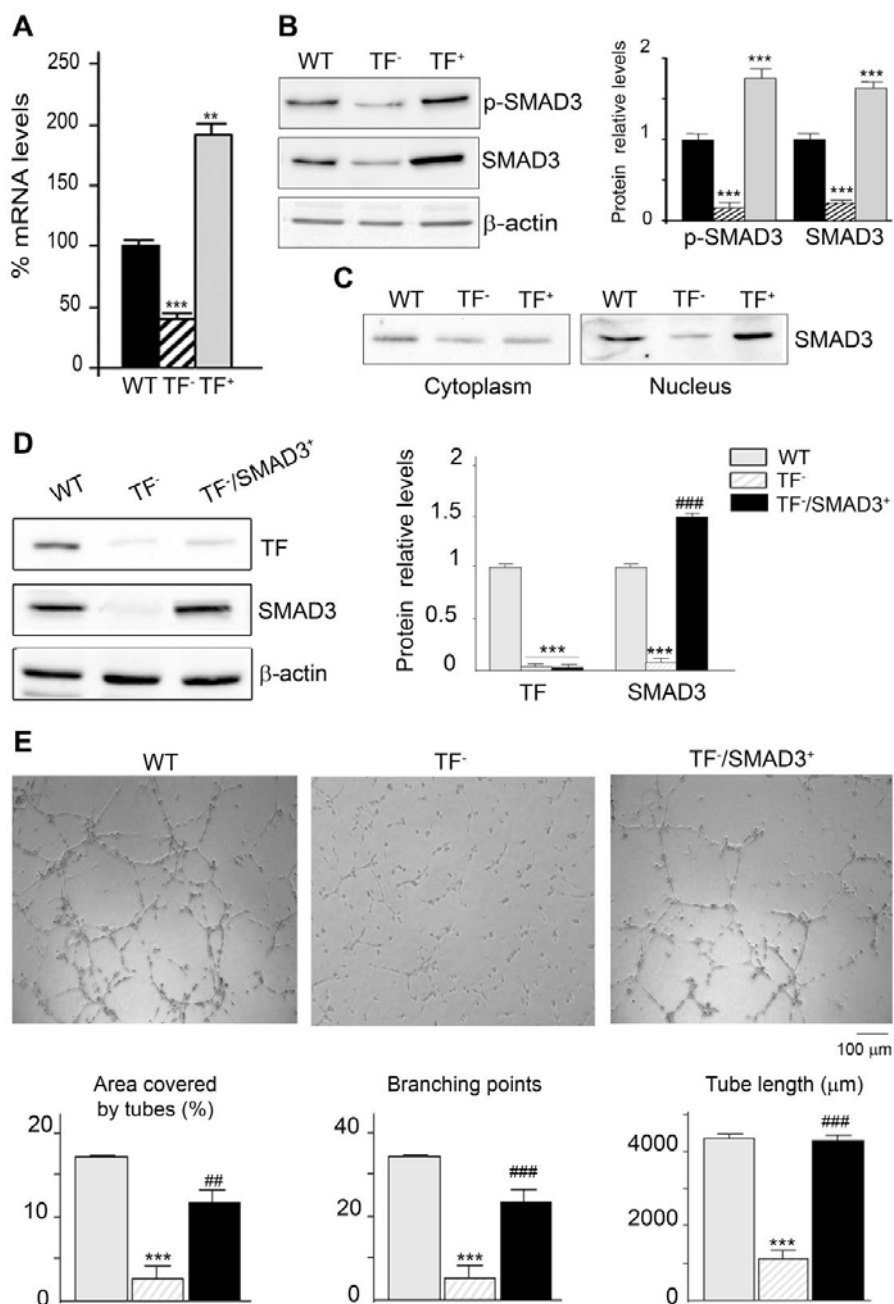


Figure 2

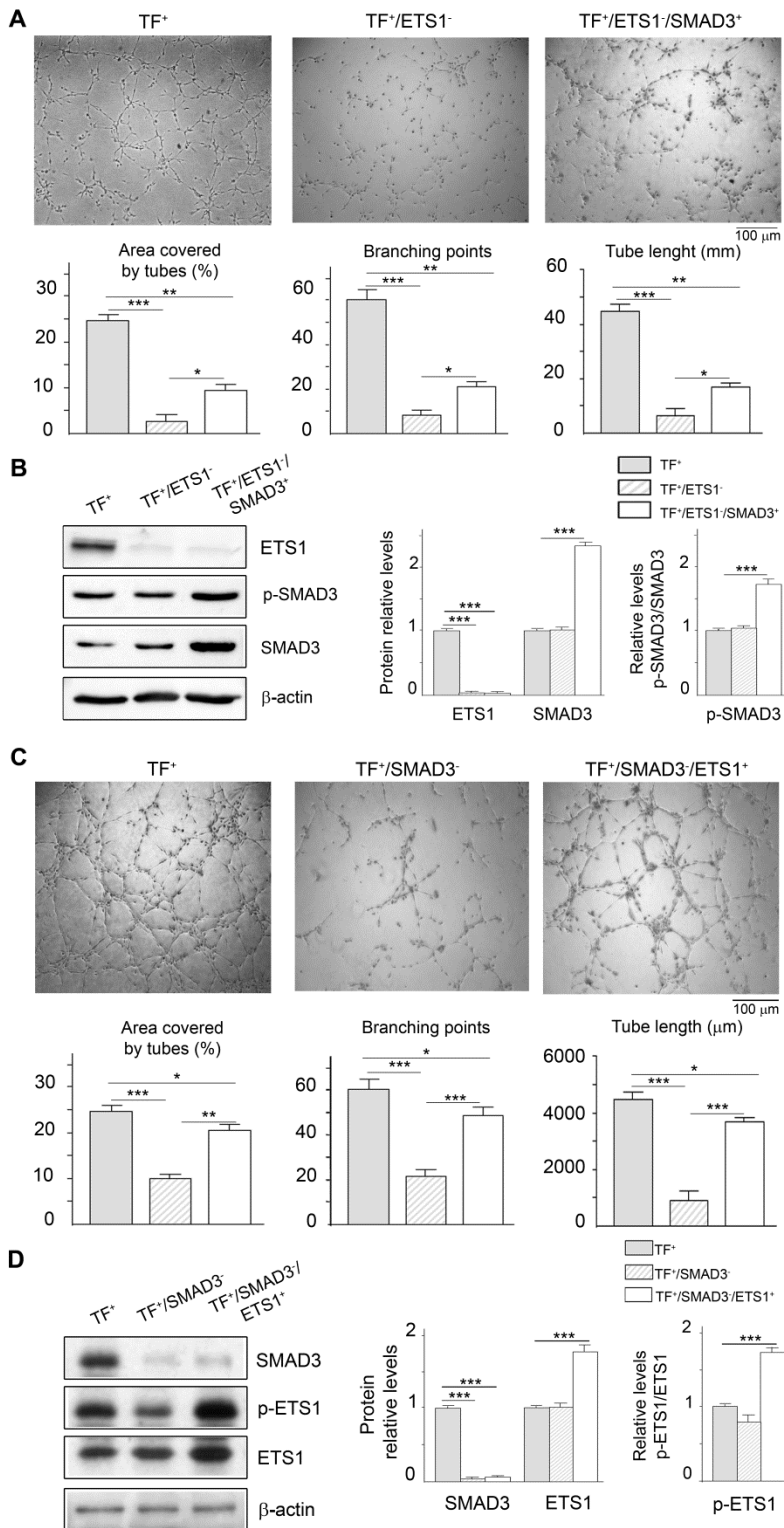


Figure 3

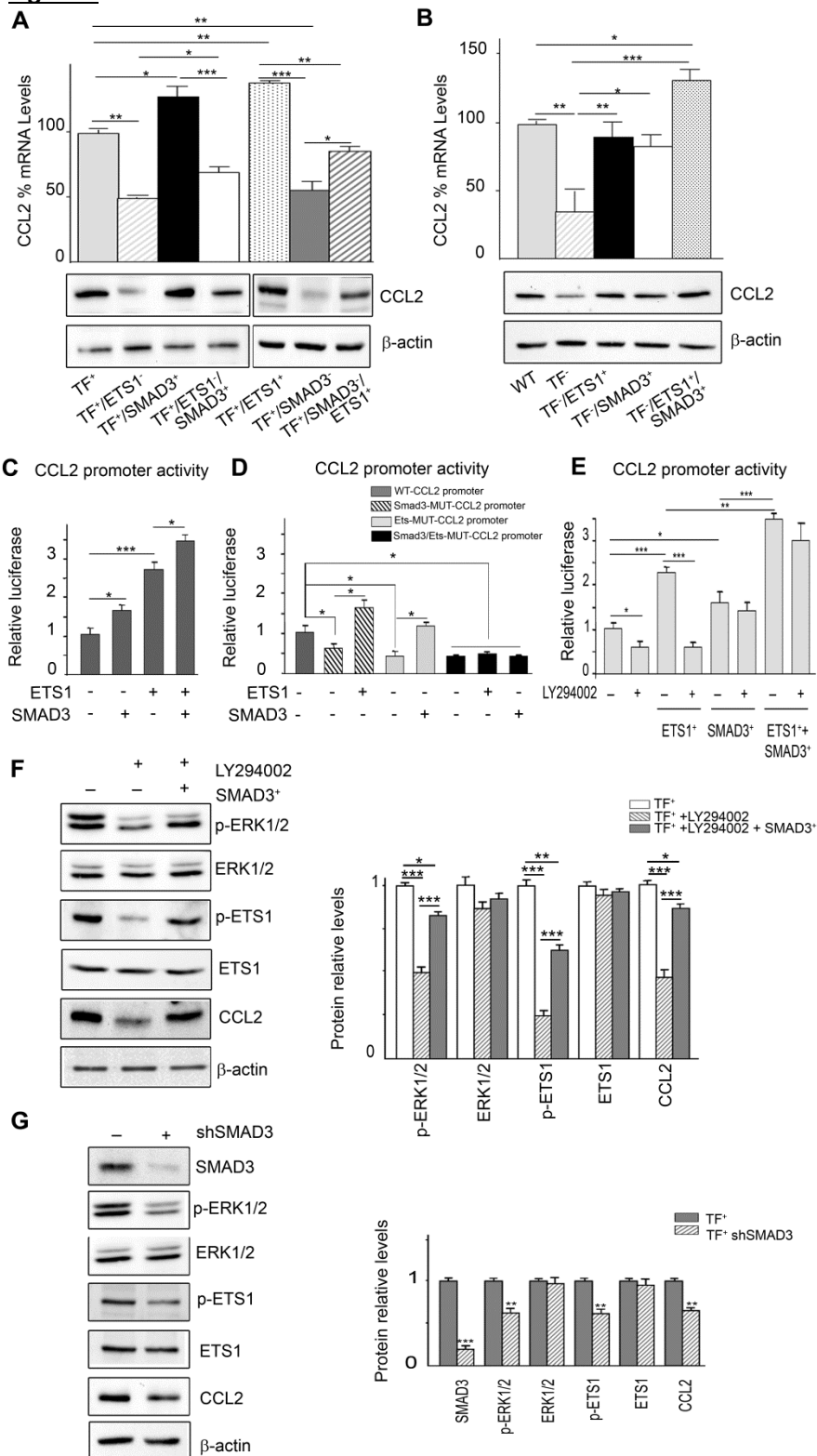


Figure 4

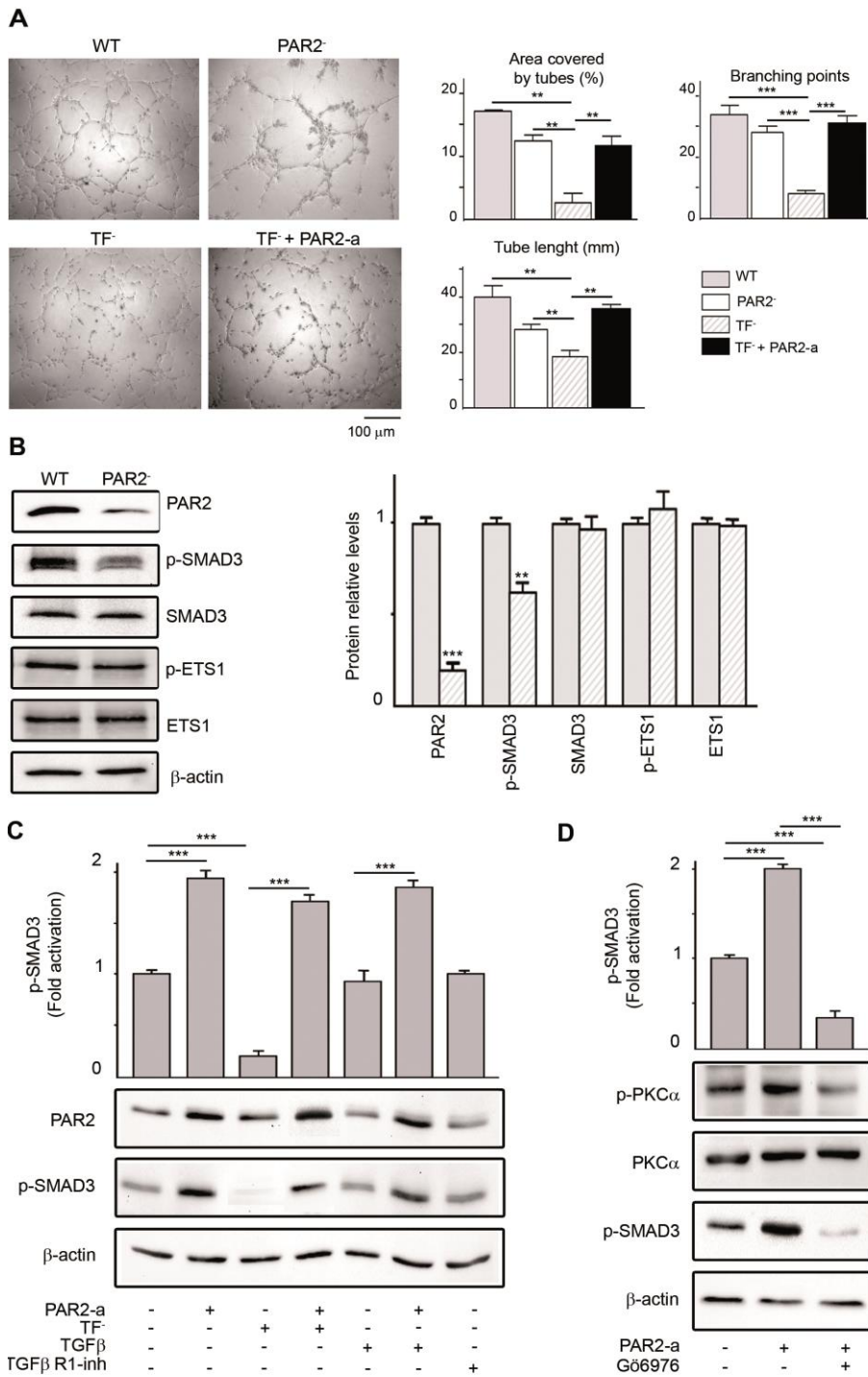


Figure 5

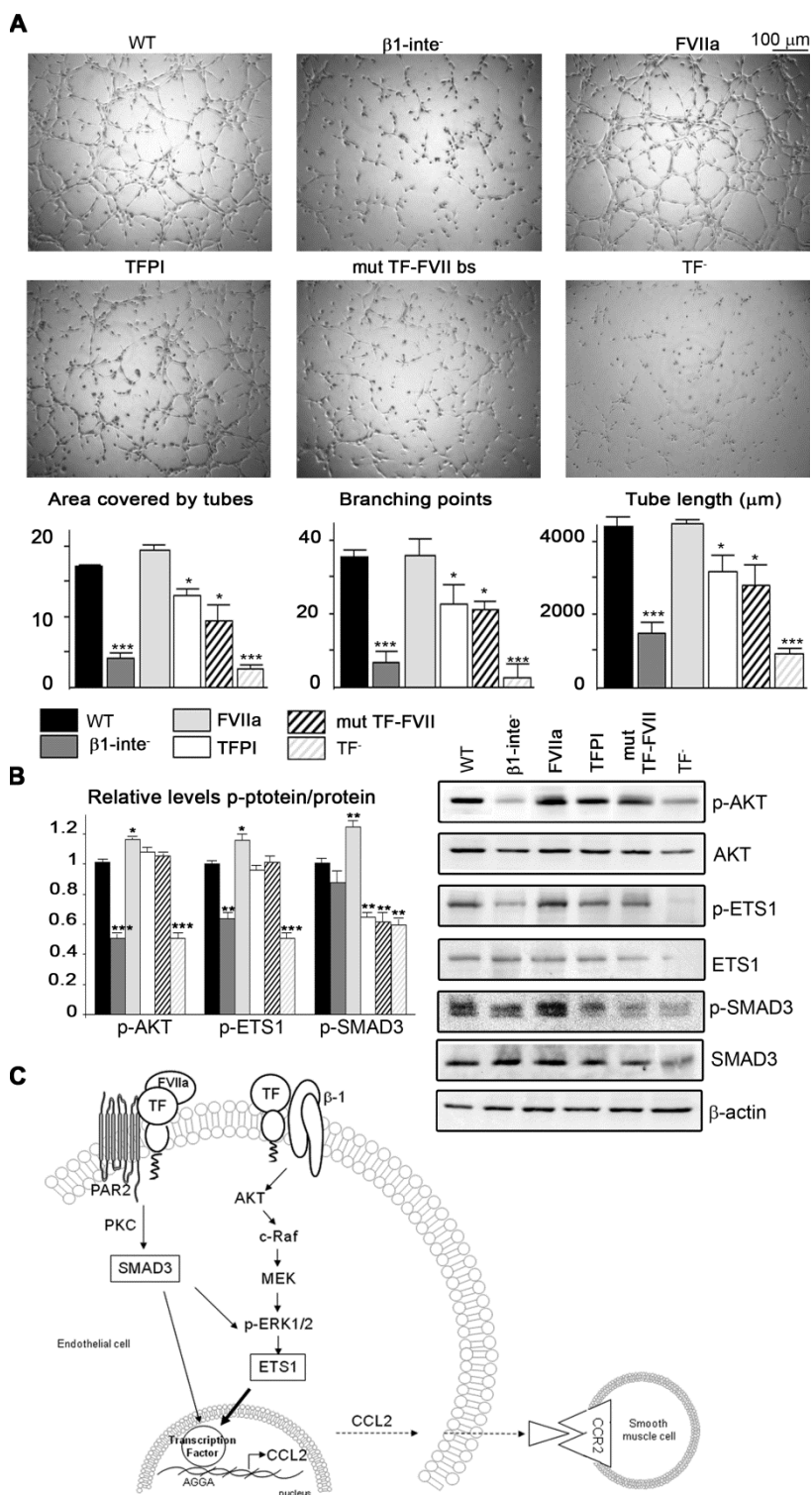


Figure 6

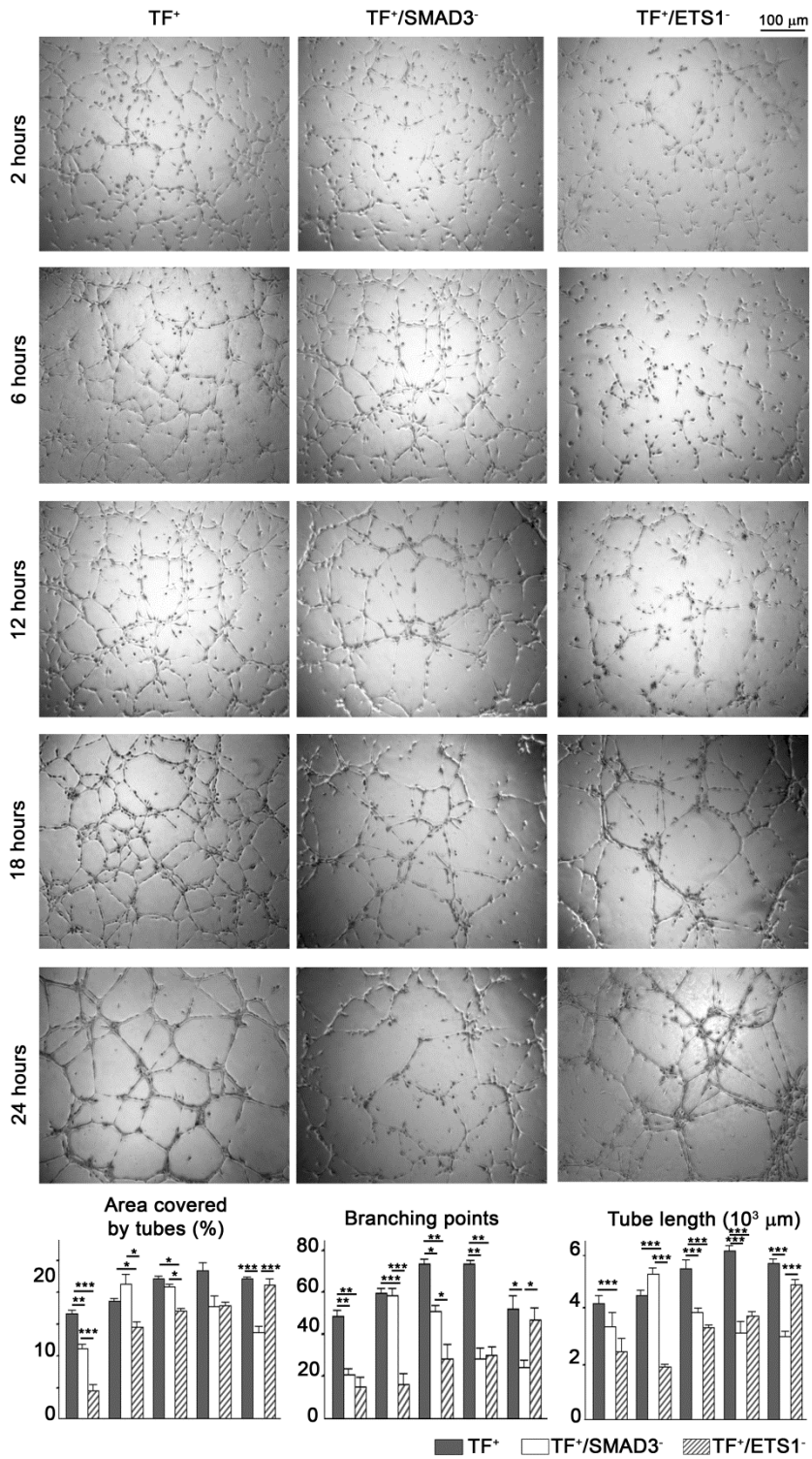


Figure 7

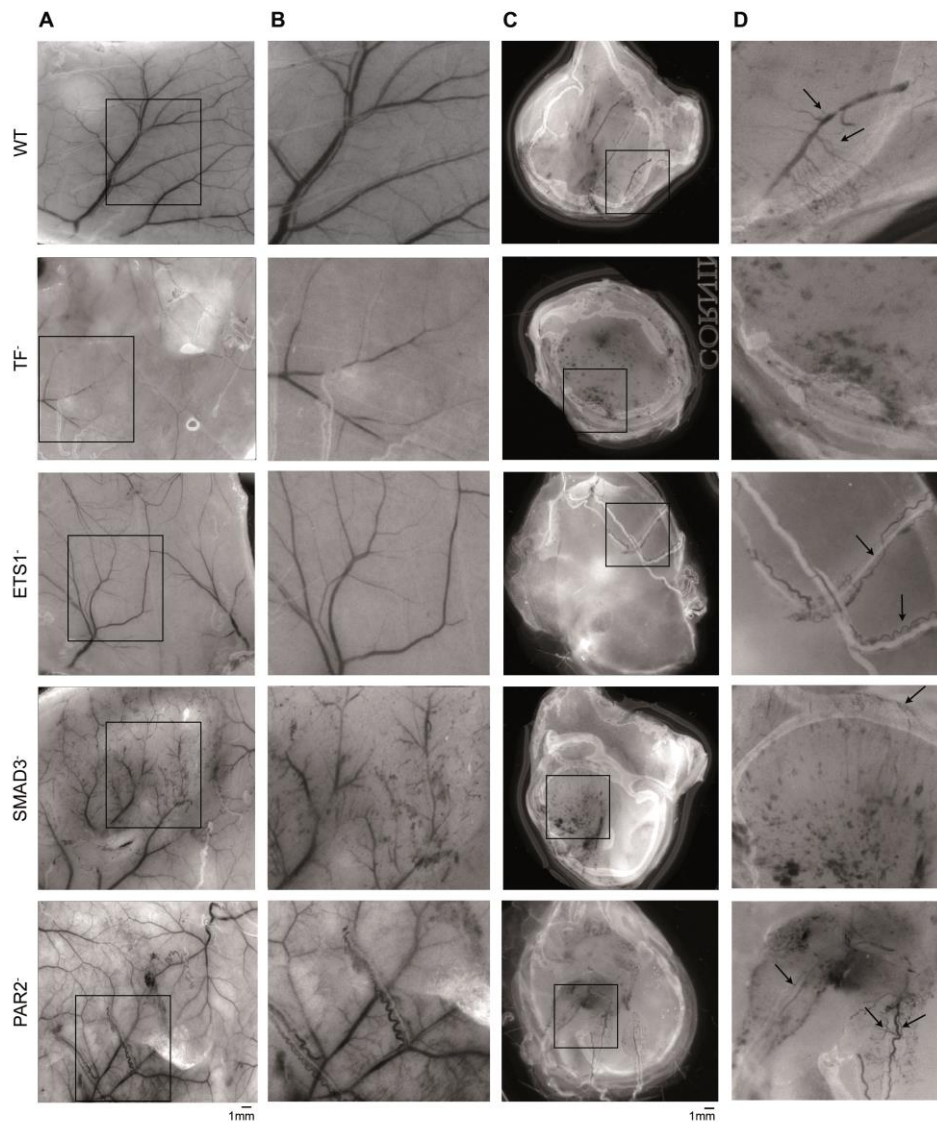
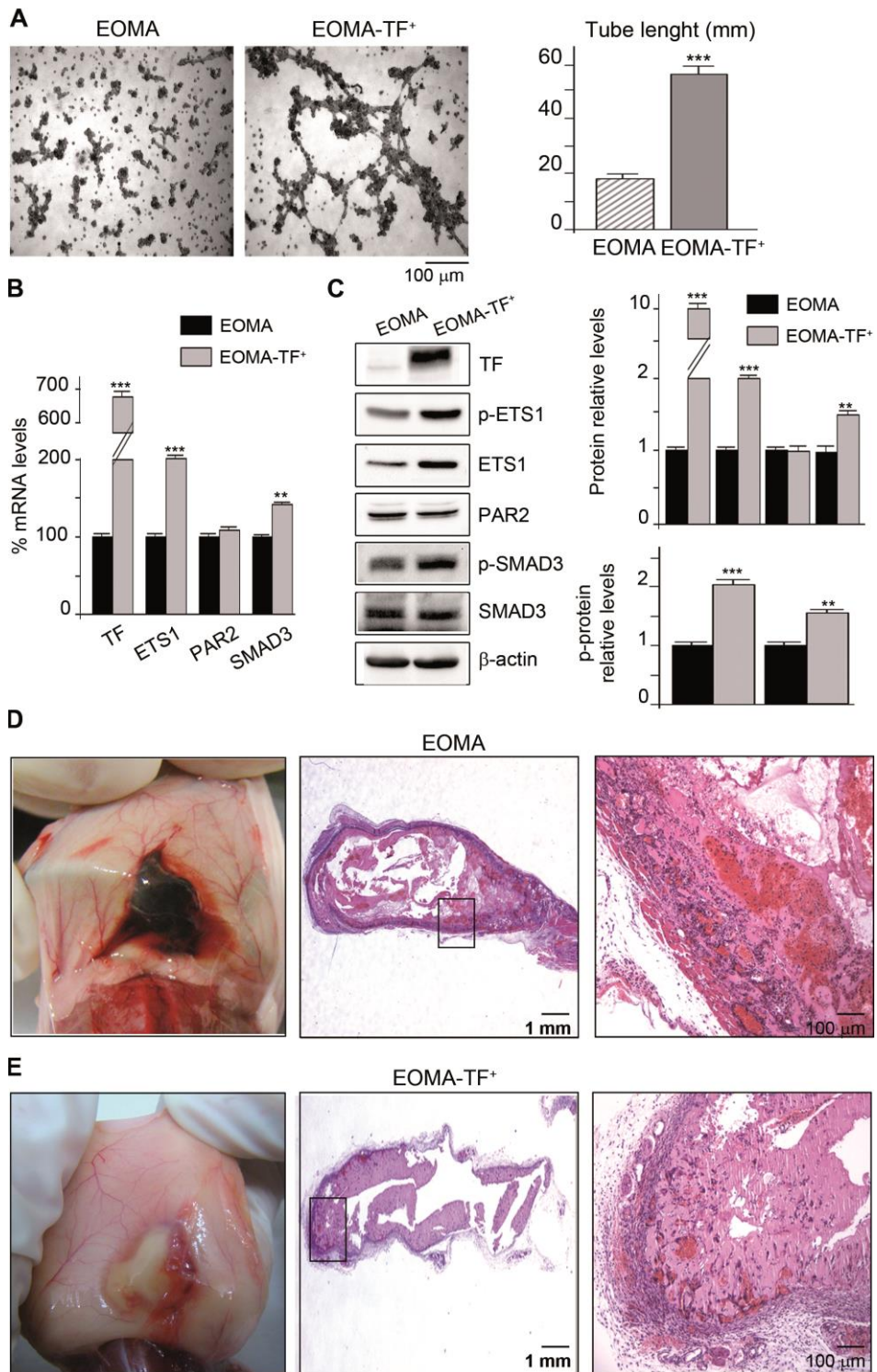


Figure 8



Supplementary material

PAR2/SMAD3 in microvascular endothelial cells is indispensable for vascular stability via tissue factor signaling

Gemma Arderiu, Sonia Espinosa, Esther Peña, Rosa Aledo, Lina Badimon
Cardiovascular Research Center (CSIC-ICCC); Hospital de Sant Pau (UAB) and
IIB-Sant Pau, Barcelona, Spain

DETAILED MATERIAL AND METHODS

Cell culture and animals

Human dermal microvascular endothelial cells (HDMEC) (PromoCell) and immortalized human microvascular endothelial cells (HMEC-1) (Ades et al., 1992) were used. HMEC-1 were a kind gift from the Centre of Disease Control (Atlanta, GA) and they were cultured in MCDB 131 media (Invitrogen) supplemented with 10% Fetal Bovine Serum (FBS), 2 mM glutamine (Invitrogen) and 50 mg/ml gentamicin (Invitrogen). Confluent monolayers cells were cultured to obtain a quiescent phenotype cells. To study angiogenic phenotype, three-dimensional (3D) cultures were prepared on three-dimensional basement membrane (3DBM) (BD Matrigel™) (BD Biosciences) as described, (Arderiu et al., 2007) cultures were maintained 4 and 24 hours. At these time points, RNA was isolated from the endothelial cells and used for characterizing angiogenesis-related gene expression. Primary cultures of human vascular smooth muscle cells (HVSMC) were prepared from human coronary arteries of explanted hearts from transplant operations at the Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, and maintained in M199 (Invitrogen) with 10% FBS. Cells were used between passages 3 and 6. The murine hemangioma cell line (EOMA), CRL-2586™, was obtained from the American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA). EOMA cells were maintained in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Invitrogen) with 10% FBS and 50mg/ml gentamicin.

We used nude male mice of 6-7 week old (R/SOPF BALB/C NU/NU CBy.Cg-Foxn1 nu/j, Charles River Laboratories, France). Animal care and experimental procedures were approved and followed by the Ethics Committee of Cardiovascular Research Center.

Silencing RNA

Delivery of siRNA into mECs was performed with a Nucleofector and its corresponding kits (Amaxa, Inc.). The transfection protocol was performed following the manufacturer's instructions (T16 program). The annealed pre-designed siRNAs against TF (s4932), ETS1 (s4849), PAR2 (s4926), and β 1-integrin (s7575) were purchased from Ambion (Applied Biosystems). Transfected cells were plated into matrigel and RNA and protein were isolated either after 4 or 24 hours culture. The annealed pre-designed TF siRNA silenced both full length (fl) and alternatively spliced (as) TF forms. Alternative splicing eliminates exon E5 and we used a TF siRNA with a sequence

5'ggacuuaauuuuauacacuu3', which is located in exon E4. We analyzed TF mRNA by PCR with a primer that amplifies exons E3 to E4 to validate that both flTF and asTF were silenced (Supplementary Figure S12). Moreover, we used specific primers that amplify flTF and asTF separately (Szotowski et al., 2005) to confirm TF silencing. In all experiments, a scrambled siRNA control (AM4635) was used to evidence unspecific changes in the gene expression profile or in the cell phenotype.

Lentiviral infection and transfection

The generation of lentiviruses expressing TF-GFP has previously been described in detail in Arderiu et al. (Arderiu et al., 2012a). A construction with an extracellular domain mutation, affecting the binding sites of Factor VII (Ruf et al., 1994) was prepared. Lys20, Asp58, Phe140 were mutated to Ala and cloned in pLVX-DsRed MonomerN1 (Clontech Laboratories Inc.) with cloning sites XhoI/ApaI. Lentiviral vectors were transfected into mECs as described in Arderiu et al. (Arderiu et al., 2012a). CS2 Flag-Smad3 and SMAD3 shRNA (Addgene) (Gao et al., 2009) and pCMV6-ETS1-GFP (Origen) (Arderiu et al., 2012b) were used for transient transfections. Transient transfections in endothelial cells were performed using an Effectene[®] transfection reagent (Qiagen) following procedures supplied by the manufacturer.

Release of cellular structures and RNA extraction from three dimensional cultures

Cells grown in matrigel were isolated from the 3DBM by washing with cold PBS without Ca²⁺ and Mg²⁺, containing 5 mM EDTA, and scraped into a centrifuge tube with a minimum volume of 30 ml cold PBS/EDTA. Cells were incubated on ice for 45 min, and centrifuged at 115 g for 2 min. The pellet was resuspended in an appropriate amount of lysis buffer for mRNA or protein isolation. Soluble and insoluble subcellular fractions were obtained as described (Arderiu et al., 2007).

PCR arrays and real time PCR

The Angiogenesis RT² Profiler[™] PCR array (Sabiosciences Corp.) was run with mRNA from 4 and 24 tube-like forming mECs. Genes of interest were re-validated by real time PCR. (Otero-Vinas et al., 2007) RNA from cell lysates extracted by RNeasy isolation kit (Qiagen) was reverse transcribed. mRNA levels were analyzed by real time PCR. Assays were used for: TF (Hs00175225m1) and (Mm00438853m1); SMAD3 (Hs00969210m1) and

(Mm01170760m1); ETS1 (Hs0048287m1) and (Mm01175819m1); CCL2 (Hs00234140m1); Integrin β 1 (Hs00559595m1); and PAR2 (Mm00433160m1) (Applied Biosystems® - lifetechnologies.com). Taqman real time PCR was performed as previously described (Arderiu et al., 2011) mRNA expression was quantified and normalized by GAPDH (4326317E) or Eukaryotic 18S (4319413E).

Immunoblotting analysis

Equal amounts of protein from ECs cultures for 4 hours in 3DBM were separated on a 10% SDS-PAGE gels and transferred to nitrocellulose membranes. After blocking for nonspecific binding, western-blotting was probed with: a polyclonal anti-TF antibody (1:1000) (American Diagnostica); monoclonal anti-ETS1 (1G11) antibody (1:500) (Abcam); polyclonal anti-phospho-Threonine-38 ETS1 antibody (1:1000) (Novus Biologicals); polyclonal anti-Akt antibody (1:1000), polyclonal anti-p44/42 MAPK (137F5) antibody (1:1000), polyclonal anti-phospho-SMAD3 antibody (1:1000) and polyclonal anti-SMAD3 antibody (1:1000) (Cell Signaling); and monoclonal anti-PAR2 antibody (1:1000) (Santa Cruz biotechnology); and monoclonal CCL2 antibody (1:1000) (R&D Systems); followed by goat anti-mouse-HRP at 1:2000 or donkey anti-rabbit-HRP at 1:5000. Excess of antibody was removed by extensive washing and blots were developed by ECL system (Amersham Biosciences). The membranes were then stripped and treated with polyclonal anti- β -actin antibody (1:1000) (Abcam Inc. Cambridge, MA), followed by donkey anti-rabbit-HRP at 1:5000 and detected by ECL system. Band densities were determined with the ChemiDoc™ XRS system (Bio-Rad) in chemiluminescence detection modus and Quantity-One software (Bio-Rad).

Network identification and canonical pathway analysis

The microarray results were analyzed using Ingenuity pathway analysis (IPA). Each gene identifier was mapped to its corresponding gene object in the Ingenuity pathways knowledge base (Ingenuity® Systems; www.ingenuity.com). Gene networks were then algorithmically generated based on their connectivity and assigned a score. The networks were analyzed to identify the biological functions and/or diseases that were most significant to the genes in that network. Canonical pathway analysis identified the pathways that were most significant to the input data set. The significance of the association between the data set and the canonical pathway was determined based on two parameters: (i) a ratio of the number of genes from

the data set that map to the pathway divided by the total number of genes that map to the canonical pathway and (ii) a *P*-value calculated using Fisher's exact test determining the probability that the association between the genes in the data set and the canonical pathway is due to chance alone.

Plasmid constructions

The -560 bp to +60 bp of wild-type CCL2 promoter, WT-CCL2 promoter (kindly provided by Nicholas J. (Choi and Nicholas, 2010)) was analyzed with TF Search and putative SMAD3 and ETS1 binding sites were localized at -253 and -154, respectively. The binding sites were mutated by the use of the kit Quick-Change II (Stratagene) according to the manufacturer's instructions by using the forward primers:

Smad3MUT-5'- acatctgtggtcagAA**tg**ggcttaatggcacc**cc**-3' and
 Ets1MUT- 5'- gcttcc**ctt**ctacttcGtCgaaatccacaggatgc3' (Arderiu et al., 2012b) and the corresponding reverse primers (capital letters show the mutated nucleotide). Single and double mutated constructs were generated and verified by DNA sequencing. The mutated sequences are shown below and the constructs in Figure 3D.

CCL2 promoter sequence from -560 to +60 bp. Mutated binding sites for SMAD3 and ETS located at -253 and -154, respectively, are underlined. 5' UTR sequences are in capital letters:

```

-560 aaaccctagaactcttagaattcagttcaatgtttacacaatcctacagttctgctagg
-501 cttctatgatgctactattctgcatttgaatgagcaaatggatttaatgcattgtcaggg
-441 agccggccaaagcttgagagctcctcctggctgggaggccccttggaatgtggcctgaa
-381 ggtaaagctggcagcgcctgacatgctttcatctagtttctcgtctcctcctttct
-321 gcagtttctgcttcagagaaagcagaatccttaaaaataaccctctagttcacatctgt
-261 ggtcaggtctgggcttaatggcaccatcctccccatttgctcatttggctcagcagtg
-201 aatggaaaaagtgtctcgtcctgacccctgcttcccttctactttctggaaaccac
-141 aggatgctgcatttctcagcagatttaacagcccacttatcactcatggaagatccctc
-81 ctctgcttgactccgcccctctccctctgcccgttcaataagaggcagagacagca
-21 gccagaggaaccgagaggctgAGACTAACCCAGAAACATCCAAT
TCTCAAACTGAAGCTCGCACTCTCGCCT
    
```

Promoter activity by luciferase gene reporter assays

mECs cells overexpressing TF-GFP were seeded in 12-well plates and transfected with the indicated constructs (Supplemental Material) and the internal control pRenilla-Null vector using the Effectene® transfections reagent (Qiagen) as previously described (Aoki et al., 2010). Luciferase activity was quantified 30 hours later using the Dual Luciferase Assay (Promega). Each experiment was performed in triplicate and the data represent the mean \pm SEM after normalization to Renilla Activity. A pcDNA.3 empty vector was used as control for co-transfections experiments with SMAD3 obtained from CS2 Flag-Smad3 and ETS1 obtained from pCMVETS-1-GFP.

Wound healing assay

Wound healing assays were performed with Ibidi's Culture-Inserts. Confluent monolayers of HVSMC were seeded on one side of the insert and mECs with different treatments on the other side. Cell migration into the wound surface was monitored by a Leica DMIRE2 microscope attached to a video SPOT Leica-DFC350FX camera. Wounds areas were analyzed from three independent experiments by using ImageJ and StatView software.

Transwell migration assay

HVSMC migration assays were done in modified Boyden chambers. Briefly, 6.5 nm transwell chambers with 8 μ m pores (Corning) were coated with 10 μ g/mL of type I collagen (Collagen Biomaterials) for 2 hours at 37^o C. Cells were serum starved for 16 hours and 5 x 10⁴ cells/well were plated to the upper chamber in 300 μ l of fibroblast basal medium (FBM) (Clonetics) containing 0.5% BSA. The lower chamber was filled with 500 μ l of conditioned media obtained from mECs with different treatments. After 4 hours at 37^o C, non-migratory cells in the upper chamber were removed with a cotton swab and cells that migrated to the bottom of the membrane were fixed and stained with Diff-Quick (VWR Scientific Products). Total number of migrated cells was determined by counting five fields in each well per experimental condition using a phase-contrast microscope (magnification, x20) as described in Carrio et al. (Carrio et al., 2005).

Angiogenesis assay *in vivo*

mECs (1×10^7) were suspended in 300 μ l of matrigel media and injected subcutaneously in nude mice. After injection, the matrigel rapidly formed a plug. All mice were euthanized at 7 days post-injection and the skin of the mouse was easily pulled back to expose the matrigel plug, which remained intact. Skin and collagen plugs were visualized with a Leica AF 6000LX Stereo Microscope with Digital camera DFC, 8 bits of resolution, Objective 1.0x0.03/1.0x0.09.

Tumor formation *in vivo*

A total of 2.5×10^6 of control or TF expressing EOMA cells were prepared in 300 μ l of matrigel media and injected subcutaneously in the dorsal midline region of nude mice ($n = 6$ mice/group). All mice were euthanized at 7 days post-injection and tumor tissue harvested for histological examination. Paraffin embedded specimens were cut into 5 μ m thick serial sections, placed on poly-L-lysine coated slides, deparaffinized, and stained with haematoxylin-eosin or processed for immunohistochemistry.

Statistical analysis

For comparisons between two groups, statistical analyses were performed using the two-sample independent-groups t test. Comparison of multiple mean values was made by one-way ANOVA, and statistical significance among multiple groups was determined by Tukey's post-hoc test (for pair-wise comparisons of means). All results are presented as mean \pm SEM from at least three independent experiments. $P < 0.05$ was considered statistically significant.

References

- Ades, E.W., Candal, F.J., Swerlick, R.A., et al. (1992). HMEC-1: establishment of an immortalized human microvascular endothelial cell line. *J Invest Dermatol* *99*, 683-690.
- Aoki, T., Kataoka, H., Nishimura, M., et al. (2010). Ets-1 promotes the progression of cerebral aneurysm by inducing the expression of MCP-1 in vascular smooth muscle cells. *Gene Ther* *17*, 1117-1123.
- Arderiu, G., Cuevas, I., Chen, A., et al. (2007). HoxA5 stabilizes adherens junctions via increased Akt1. *Cell Adh Migr* *1*, 185-195.
- Arderiu, G., Pena, E., Aledo, R., et al. (2012a). Tissue factor-Akt signaling triggers microvessel formation. *J Thromb Haemost* *10*, 1895-1905.
- Arderiu, G., Pena, E., Aledo, R., et al. (2012b). Ets-1 transcription is required in tissue factor driven microvessel formation and stabilization. *Angiogenesis* *15*, 657-669.
- Arderiu, G., Pena, E., Aledo, R., et al. (2011). Tissue factor regulates microvessel formation and stabilization by induction of chemokine (C-C motif) ligand 2 expression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* *31*, 2607-2615.
- Carrio, M., Arderiu, G., Myers, C., et al. (2005). Homeobox D10 induces phenotypic reversion of breast tumor cells in a three-dimensional culture model. *Cancer Res* *65*, 7177-7185.
- Choi, Y.B., and Nicholas, J. (2010). Induction of angiogenic chemokine CCL2 by human herpesvirus 8 chemokine receptor. *Virology* *397*, 369-378.
- Gao, S., Alarcon, C., Sapkota, G., et al. (2009). Ubiquitin ligase Nedd4L targets activated Smad2/3 to limit TGF-beta signaling. *Mol Cell* *36*, 457-468.
- Otero-Vinas, M., Llorente-Cortes, V., Pena, E., et al. (2007). Aggregated low density lipoproteins decrease metalloproteinase-9 expression and activity in human coronary smooth muscle cells. *Atherosclerosis* *194*, 326-333.
- Ruf, W., Schullek, J.R., Stone, M.J., et al. (1994). Mutational mapping of functional residues in tissue factor: identification of factor VII recognition determinants in both structural modules of the predicted cytokine receptor homology domain. *Biochemistry* *33*, 1565-1572.
- Szotowski, B., Goldin-Lang, P., Antoniuk, S., et al. (2005). Alterations in myocardial tissue factor expression and cellular localization in dilated cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* *45*, 1081-1089.

RESULTADOS

Supplementary Table S1. Genes coordinately regulated by TF in microvascular endothelial cells. Fold regulation values over controls of regulated genes in endothelial cells with different expression of TF cultured in 3DBM for 4 or 24 hours. Genes with >2-fold differences in mRNA expression are shown. Results are from three replicates for each group (green, down regulation; red, up regulation).

Gene Name	TF-silenced/control		TF overexpression/control	
	4h	24h	4h	24h
AKT1	-3.54	-5.62	7.93	10.87
ANGPT1	72.30	-2.13	580.04	
ANGPT2	2.76	2.25	11.31	
ANGPTL3			38.05	
ANGPTL4				-9.89
ANPEP				
BAI1	160.45	-2.13	3444.31	
CCL11	15.74	-2.13	146.02	
CCL2	-3.51	-4.01	2.45	4.67
CDH5	-2.34			2.20
COL18A1	-3.17			
COL4A3	2.24		42.81	
CXCL1			-3.14	
CXCL10	2.08	-2.16	26.54	
CXCL3		4.02	2.64	
CXCL5			6.41	2.09
CXCL6			11.47	2.65
CXCL9	5.80		296.11	
TYMP	-2.15		6.50	3.10
EDG1				
EFNA1	2.08			2.98
EFNA3	3.42		22.16	2.01
EFNB2				
EGF	59.55	-4.38	342.51	
ENG	-2.21			-2.37
EPHB4	-2.68			
EREG	15.96	-2.13	134.36	
FGF1	2.74		26.72	-3.47
FGF2				
FGFR3			3.97	2.56

Gene Name	TF-silenced/control		TF overexpression/control	
	4h	24h	4h	24h
FIGF	3.31		158.68	2.50
FLT1			10.85	
HAND2	9.75	3.11	326.29	-3.20
HGF	58.32		666.29	
HIF1A				
HPSE			3.07	3.10
ID1				-3.29
ID3			2.13	-2.23
IFNA1	103.68	2.36	675.59	
IFNB1	46.08		247.28	
IFNG	223.79	-2.13	2435.50	
IGF1	5.37	-3.01	79.34	
IL1B		-2.03	4.26	
IL6		3.05		-2.17
IL8		3.34		-4.37
ITGAV				
ITGB3			2.08	2.01
JAG1				
KDR			4.26	-5.96
LAMA5				
LECT1	80.78	-2.13	922.88	
LEP	43.90	-2.13	1770.57	
MDK				
MMP2				
MMP9	5.19		37.53	
NOTCH4	2.98		17.39	
NRP1			4.72	
NRP2			4.00	
PDGFA		2.51		
PECAM1	-2.50			42.05
PF4	72.81	-2.13	1408.55	
PGF	-3.85		7.73	-3.83
PLAU				
PLG	386.95	-2.13	1807.78	
PLXDC1	19.24		198.09	2.11
PROK2	70.33	-2.13	2435.50	
PTGS1	200.30		3061.45	
SERPINF1			38.32	23.01

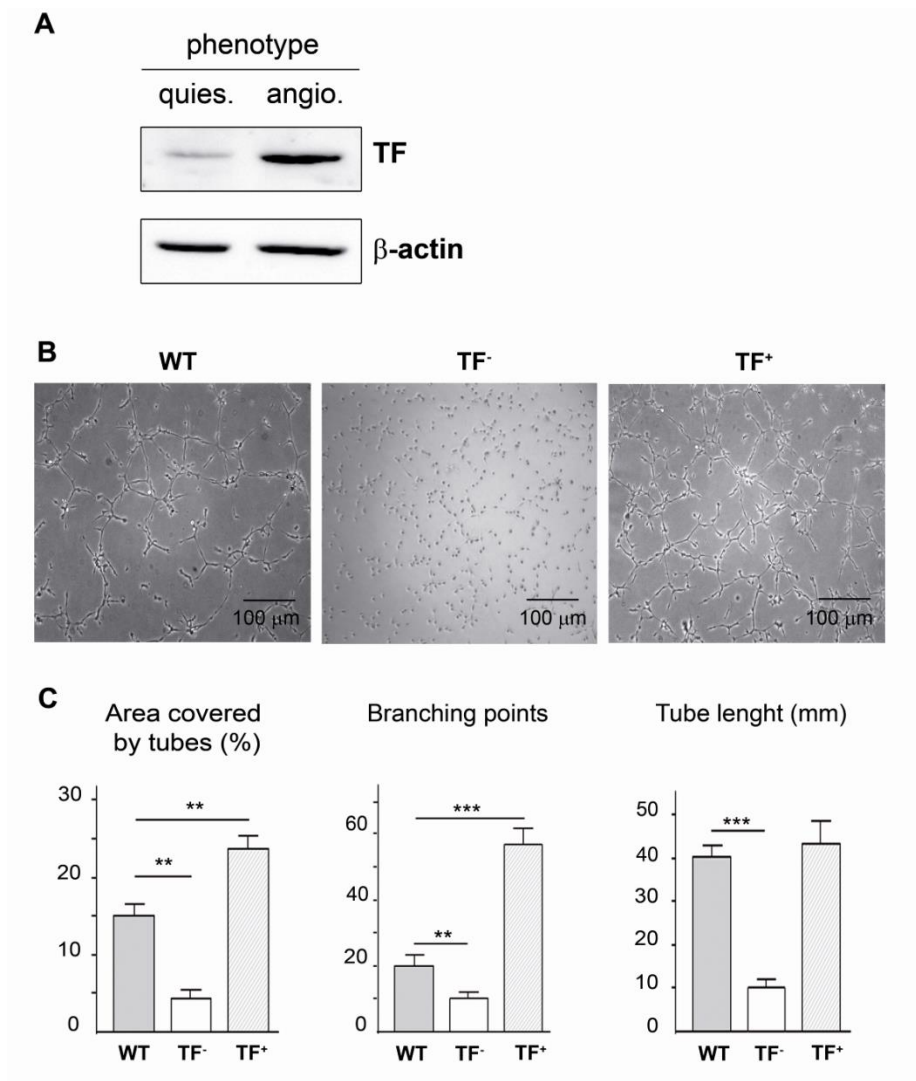
RESULTADOS

Gene Name	TF-silenced/control		TF overexpression/control	
	4h	24h	4h	24h
SPHK1	-2.86	2.99	2.19	
STAB1			7.21	-6.35
TEK				
TGFA			3.16	-586.51
TGFB1			-2.00	
TGFB2				
TGFBR1			7.67	2.59
THBS1				
THBS2			41.07	5.08
TIMP1				
TIMP2				
TIMP3	7.76	-2.13	4124.49	
TNF	9.75		59.30	
TNFAIP2	-3.82		-4.86	
VEGFA				
VEGFC		2.14		

Supplementary Table S2: IPA analysis on Molecular and Cellular Functions

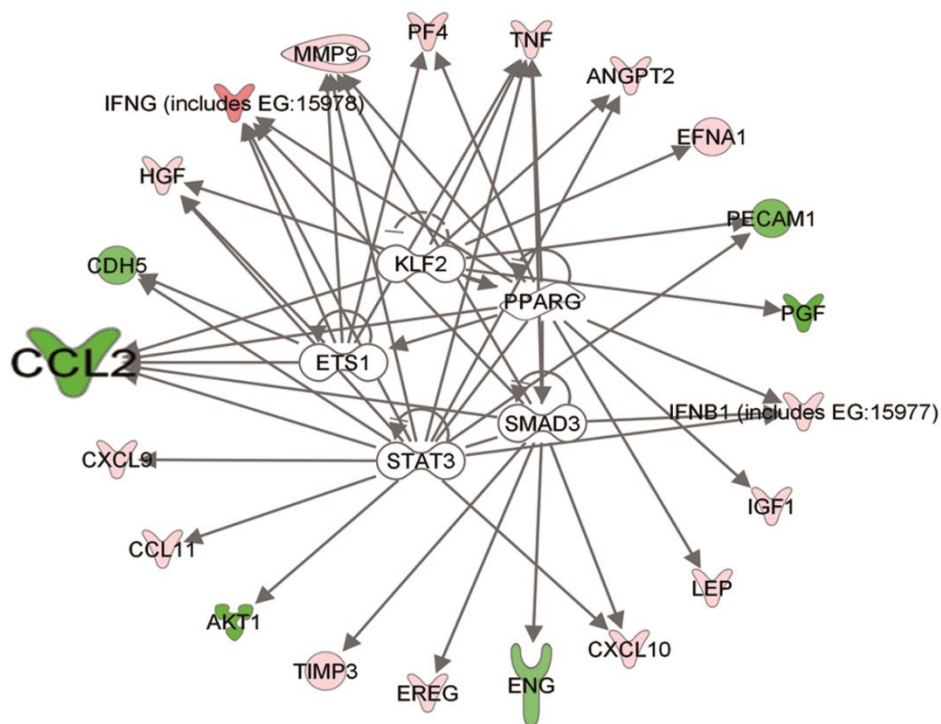
Name	TF silenced cells		TF overexpressing cells	
	p-value	# Molec.	p-value	# Molec.
Cellular Movement	$3,55 \times 10^{-73}$ - $1,35 \times 10^{-13}$	74	$2,36 \times 10^{-42}$ - $6,4 \times 10^{-10}$	55
Cellular Development	$1,66 \times 10^{-65}$ - $1,35 \times 10^{-13}$	70	$1,1 \times 10^{-40}$ - $6,4 \times 10^{-10}$	44
Cellular Growth and Proliferation	$1,96 \times 10^{-56}$ - $1,42 \times 10^{-13}$	69	$1,14 \times 10^{-36}$ - $6,4 \times 10^{-10}$	48
Cell-to-Cell Signaling and Interaction	$1,39 \times 10^{-41}$ - $1,35 \times 10^{-13}$	20	$2,32 \times 10^{-28}$ - 4×10^{-10}	45
Cell Death	$1,65 \times 10^{-38}$ - $1,23 \times 10^{-13}$	60	$1,31 \times 10^{-27}$ - 6×10^{-10}	32

Supplementary Figure S1



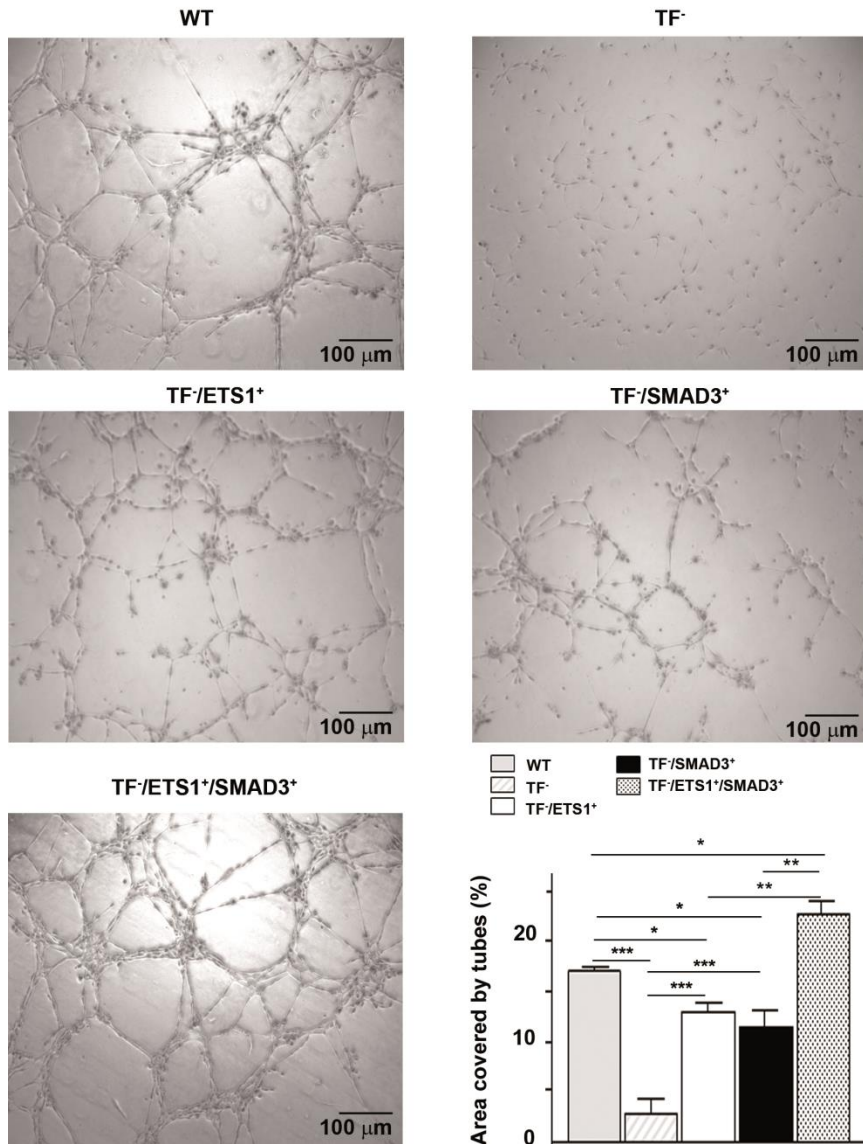
Changes in TF expression induce different tube-like formation of microvascular endothelial cells in matrigel. (A) Western blot analysis of TF expression in quiescent endothelial cells or angiogenic cells after 4 hours of culture. **(B)** Phase contrast micrographs show morphology of scrambled siRNA (WT), TF siRNA (TF⁻), and TF overexpression (TF⁺) cells cultured in matrigel for 4 hours. **(C)** Histograms show tube % area covered, branching points and tube length after 4 hours of culture in matrigel. Values represent means \pm SEM from four independent experiments (** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ versus WT).

Supplemental Figure S2



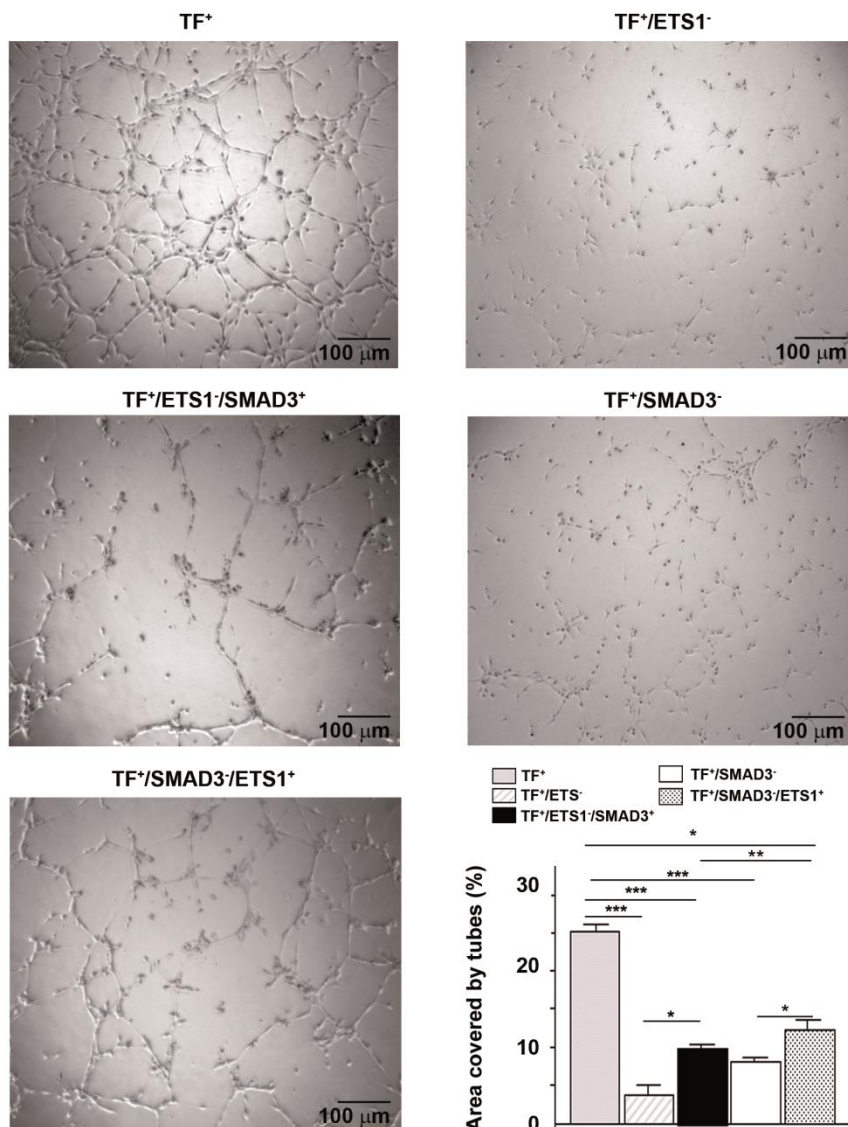
Network analysis in TF silenced ECs. Ingenuity Pathways analysis (IPA) was used to generate the most probable networks between transcription factors and regulated genes in TF silenced mECs cultured in matrigel for 4 hours. (Green downregulated; red upregulated; and pink partially affected).

Supplementary Figure S3



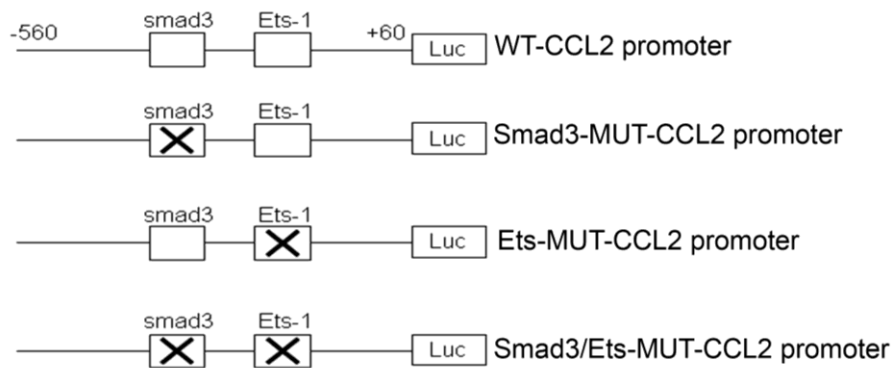
Phase contrast micrographs show morphology of transfected HMEC-1 cultured in matrigel for 4 hours: scrambled siRNA (WT); TF siRNA (TF⁻); TF siRNA and ETS1 overexpression (TF⁻/ETS1⁺); TF siRNA and SMAD3 overexpression (TF⁻/SMAD3⁺); and TF siRNA and ETS1 and SMAD3 overexpression (TF⁻/ETS1⁺/SMAD3⁺). Histograms show % area covered by tubes after 4 hours of culture in matrigel. Values represent means ± SEM from three independent experiments (*p<0.05, **p<0.01 and ***p<0.001).

Supplemental Figure S4



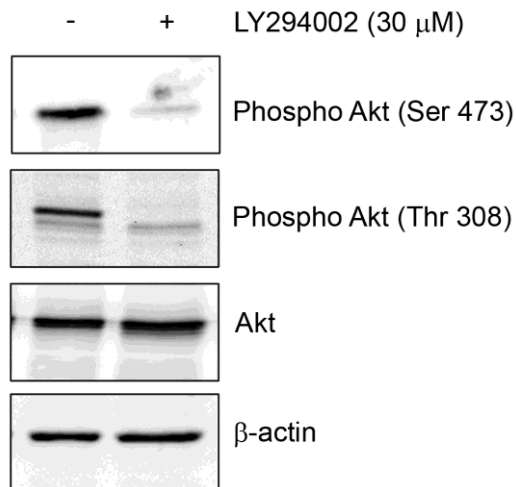
Phase contrast micrographs show morphology of TF overexpressing HMEC-1 cultured in matrigel for 4 hours: scrambled siRNA (TF⁺); ETS1 siRNA (ETS1⁻); ETS1 siRNA and SMAD3 overexpression (TF⁺/ETS1⁻/SMAD3⁺); SMAD3 siRNA (TF⁺/SMAD3⁻); and SMAD3 siRNA and ETS1 overexpression (TF⁺/SMAD3⁻/ETS1⁺). Histograms show % area covered by tubes after 4 hours of culture in matrigel. Values represent means ± SEM from three independent experiments (*p<0.05, **p<0.01 and ***p<0.001).

Supplementary Figure S5



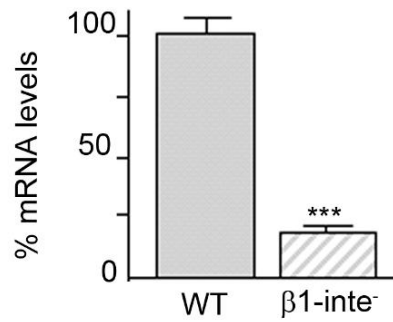
CCL2 promoter constructs used in transfection, wild type (WT) and single (Smad3-MUT, Ets-MUT) and double mutated constructs (Smad3/Ets-MUT) of CCL2 promoter.

Supplementary Figure S6



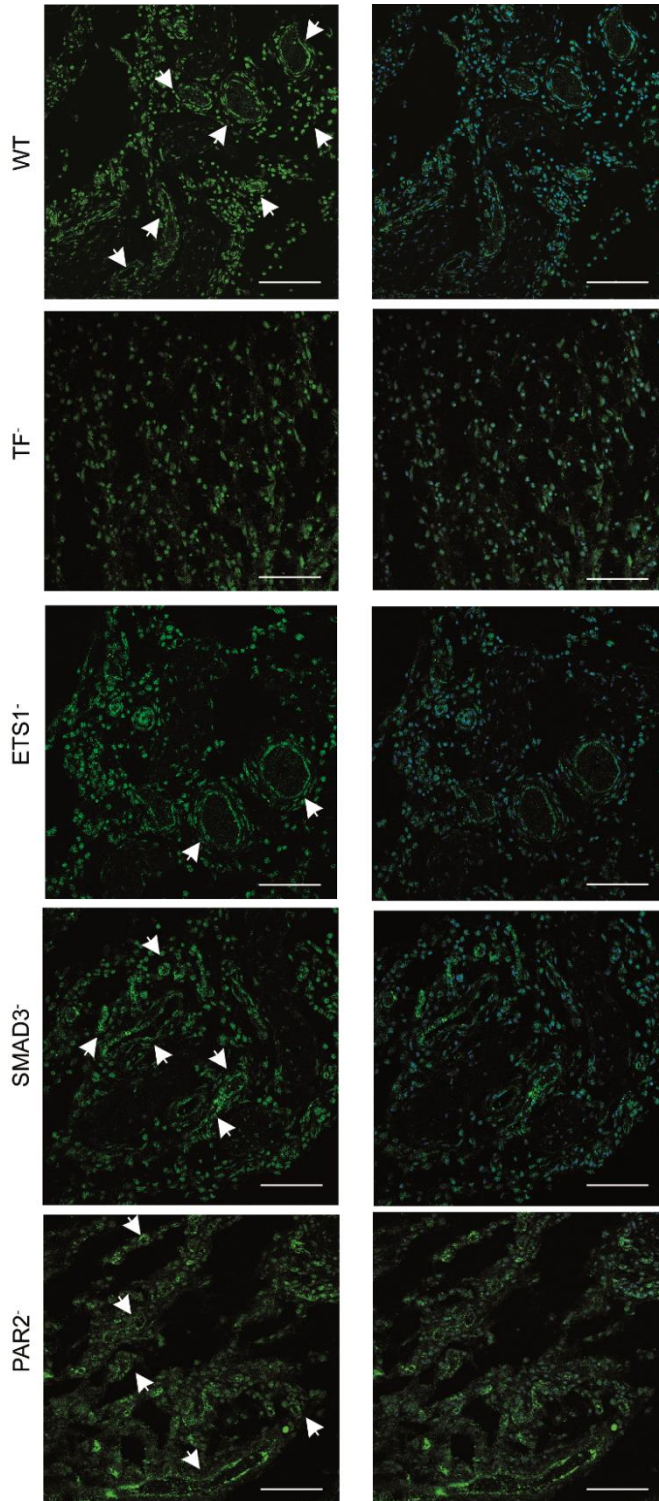
Western blot analysis of extracts from mECs show that LY294002 blocks phospho-Akt (Ser473) and phospho-Akt (Thr 308) (n = 3).

Supplementary Figure S7



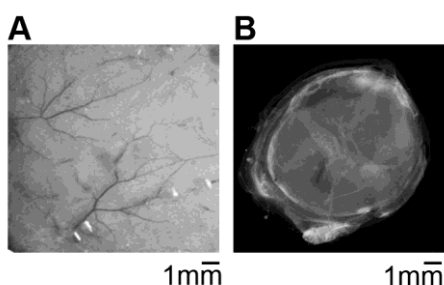
Real-time PCR analysis of $\beta 1$ -integrin in scrambled (WT) or $\beta 1$ -integrin siRNA ($\beta 1$ -inte⁻) mECs. Results are expressed as % mRNA expression \pm SD (***) $p < 0.001$ versus WT) (n = 3).

Supplementary Figure S8



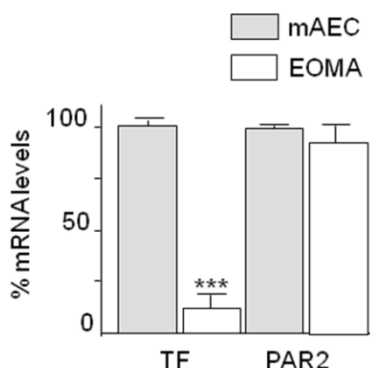
Functional blood vessels. Mature and stable blood vessels formed in skin surrounding plugs after 7 days of matrigel plugs injection. Matrigel plugs contained 1×10^7 of: scrambled siRNA HMEC-1 cells (WT); TF siRNA HMEC-1 cells (TF⁻); ETS1 siRNA HMEC-1 cells (ETS1⁻); SMAD3 siRNA HMEC-1 cells (SMAD3⁻); and PAR2 siRNA HMEC-1 cells (PAR2⁻). Images show immunofluorescence staining of frozen sections with antibodies against von Willebrand factor positive cells (green-left panels) and nucleus were stained with Hoechst 33342 (blue-right panels). White arrows indicate neovessel formation. Images are representative from 6 animals for each group. Scale bar 150 μ m.

Supplementary Figure S9



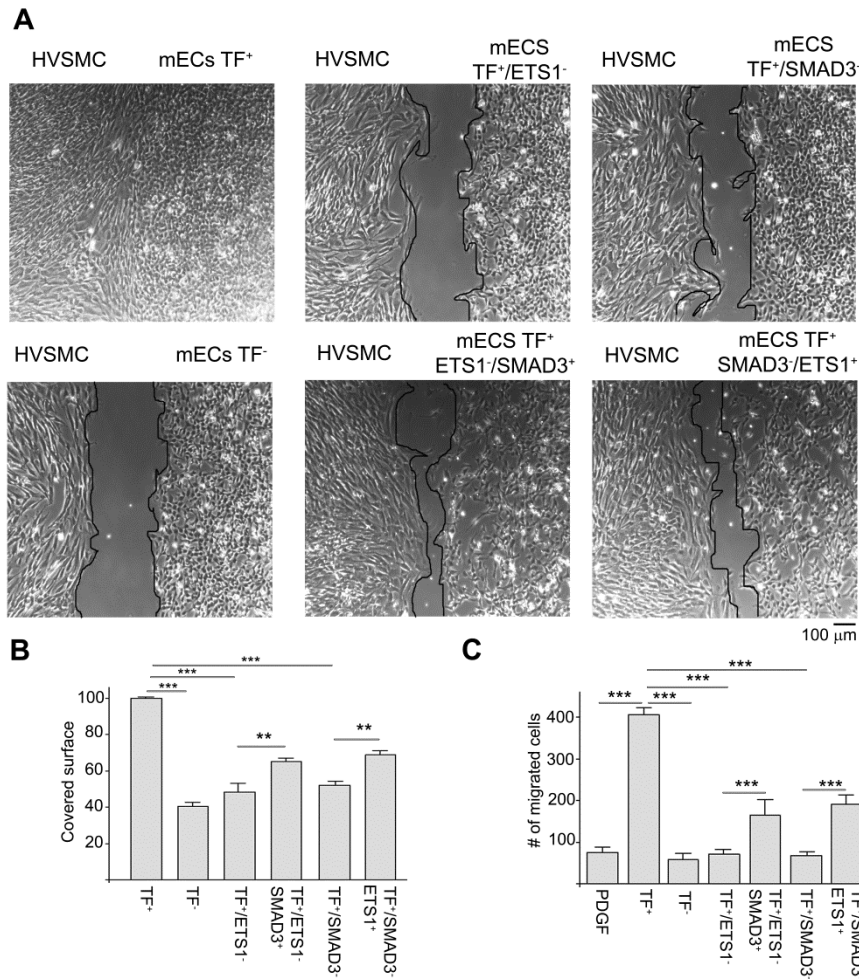
Endothelial microvessels formed in matrigel plugs *in vivo*. Macroscopic view of representative skin tissues **A** and matrigel plugs **C** after 7 days of control (PBS) matrigel plugs injection.

Supplementary Figure S10



Real-time PCR analysis of TF and PAR2 in mouse aortic endothelial cells (mAEC) or EOMA. Results are expressed as % mRNA expression \pm SD (***) $p < 0.001$ versus WT) (n = 3).

Supplementary Figure S11

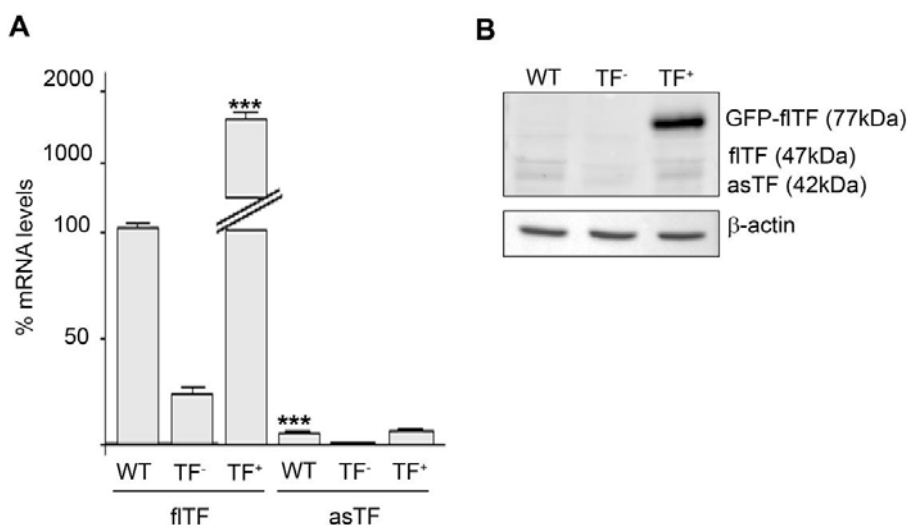


(A) Phase contrast micrograph shows the wound repair of cocultures of HVSMCs and mECs. In all six observations HVSMCs were seeded in the left well of insert culture chamber. In the right well we added different types of mECs: TF overexpressing mECs (TF⁺); TF silenced mECs (TF⁻); TF overexpressing mECs with ETS1 silencing (TF⁺/ETS1⁻); ETS1 silenced TF overexpressing mECs with SMAD3 transfection (TF⁺/ETS1⁻/SMAD3⁺); TF overexpressing mECs with SMAD3 silencing (TF⁺/SMAD3⁻); and SMAD3 silenced TF overexpressing mECs with ETS1 transfection (TF⁺/SMAD3⁻/ETS1⁺). Cell migration to the wound surface was monitored 12 hours. **(B)** Covered cell surface is represented in % of HVSMC/mECs TF⁺ at 12 hours. Values represent means ± SEM (p<0.01 and

RESULTADOS

$p < 0.001$) ($n = 3$). **(C)** HVSMCs chemotaxis induced by mECs was carried out with transwell chambers. To the lower wells of the chambers were added: a) growth medium containing 50 ng/ml of PDGF; supernatant obtained at 4 hours from b) TF overexpressing cells (TF⁺); c) TF silenced mECs (TF⁻); d) TF overexpressing mECs with ETS1 silencing (TF⁺/ETS1⁻); e) ETS1 silenced TF overexpressing mECs with SMAD3 transfection (TF⁺/ETS1⁻/SMAD3⁺); f) TF overexpressing mECs with SMAD3 silencing (TF⁺/SMAD3⁻); and g) SMAD3 silenced TF overexpressing mECs with ETS1 transfection (TF⁺/SMAD3⁻/ETS1⁺). 5×10^4 HVSMC were seeded into the upper wells and migrated cells were counted after 4 hours. Values represent means \pm SEM from 3 independent experiments. *** $p < 0.001$.

Supplementary Figure S12



(A) Real-time PCR analysis of full length TF (fITF) and alternative splicing TF (asTF) mRNA levels in scrambled (WT), TF siRNA (TF⁻) or TF overexpressing (TF⁺) mECs cultured in matrigel for 4 hours. Results are expressed as % mRNA expression \pm SEM (*** $p < 0.001$ versus WT) ($n = 3$). **(B)** Western blot for TF isoforms from mECs. Anti-human tissue factor antibodies directed against TF extracellular domain. Western blot showed, full-length TF (fITF), alternatively spliced TF (asTF) and overexpression of TF with a GFP fusion protein (GFP-TF) ($n = 3$).

ARTÍCULO III

“Monocyte-secreted Wnt5a interacts with FZD5 in microvascular endothelial cells and induces angiogenesis through tissue factor signaling”

Gemma Arderiu[‡], Sonia Espinosa[‡], Esther Peña, Rosa Aledo, Lina Badimon

Cardiovascular Research Center (CSIC-ICCC), Hospital de Sant Pau (UAB), IIB-Sant Pau. Barcelona, Spain.

[‡]Autores que han contribuido por igual en la realización de este estudio.

Estado: Artículo publicado en *Journal of Molecular Cell Biology* (2014); 6(5):380-93.

Factor de impacto (2013): **8,432**

RESUMEN

Wnt5a secretado por monocitos interacciona con FZD5 en células endoteliales microvasculares e induce angiogénesis a través de la señalización del factor tisular.

Durante el desarrollo de procesos patológicos, la angiogénesis está estrechamente ligada con la inflamación. Las células inflamatorias participan en los procesos angiogénicos por medio de secreciones moleculares que afectan a las funciones de las células endoteliales (CEs). Nuestro grupo ha demostrado previamente que la inducción de la expresión de factor tisular (FT) en células endoteliales microvasculares (CEm) es capaz de inducir angiogénesis mediante regulación autocrina. Sin embargo, las señales que inducen la expresión de FT en CEm todavía no se conocen.

En este estudio demostramos que los monocitos interaccionan con CEm e inducen la expresión de FT de forma paracrina. Hemos identificado que la proteína Wnt5a, secretada por monocitos, induce la expresión de FT y, en consecuencia, la reparación de heridas de cultivos en monocapa y la formación de tubos *in vitro* así como la formación de microcapilares en modelos *in vivo*.

La proteína Wnt5a secretada por monocitos activa la expresión del receptor FZD5 en CEm. Como consecuencia, se desencadena la vía de señalización no canónica de Wnt, que incluye el aumento de la liberación de Ca^{2+} intracelular y la activación del factor de transcripción NF- κ B, que a su vez, induce la expresión de FT.

En conclusión, mediante la secreción de Wnt5a, los monocitos activan una vía de señalización no canónica, desencadenada a partir de la interacción entre Wnt5a y FZD5 expresado en las CEm. La señalización de Wnt5a provoca la inducción del FT, que de forma autocrina, activa los procesos angiogénicos en las CEm.

Article

Monocyte-secreted Wnt5a interacts with FZD5 in microvascular endothelial cells and induces angiogenesis through tissue factor signaling

Gemma Arderiu[†], Sonia Espinosa[†], Esther Peña, Rosa Aledo, and Lina Badimon*

Cardiovascular Research Center (CSIC-ICCC), Institut d'Investigació Biomèdica Sant Pau (IIB-Sant Pau) and Universitat Autònoma de Barcelona (UAB), Barcelona 08025, Spain

[†] These authors contributed equally to this work.

* Correspondence to: Lina Badimon, E-mail: lbadimon@cscic-iccc.org

Angiogenesis during reactive and pathologic processes is characteristically associated with inflammation. Inflammatory cells participate in angiogenesis by secreting different molecules that affect endothelial cell functions. We had previously shown that induced tissue factor (TF) expression in activated microvascular endothelial cells (mEC) is able to induce angiogenesis via autocrine regulation. However, the signals that induce TF expression in mEC are not fully known. Here, we demonstrate that monocyte paracrine cross-talk with mECs triggers mEC-TF expression. We have identified that monocyte-secreted Wnt5a induces TF expression in mEC and functionally induces cell monolayer repair and angiotube formation *in vitro* as well as microvessel formation *in vivo*. Monocyte-secreted Wnt5a activates FZD5 in mECs, which signals to induce the release of intracellular Ca²⁺ and increase NFκB transcription activity and TF gene expression. In sum, Wnt5a secreted by monocytes signals through the noncanonical Wnt–FZD5 pathway in mECs to induce TF expression that induces angiogenesis by autocrine regulation.

Keywords: wnt5a, tissue factor, microvascular endothelial cells, monocytes, angiogenesis

Introduction

Angiogenesis is a complex process defined as the new blood vessel formation from pre-existing ones. Such biological processes occur in either physiological or pathological conditions (Folkman, 1995). The angiogenic process plays an essential role in embryo development, organogenesis, and tissue growth. In adults, this process is quite limited due to the fact that blood vessels remain quiescent; however, they can be activated after stimuli, such as hypoxia, wound healing, or diverse pathological situations as in tumorigenesis and atherosclerosis.

During angiogenesis, microvascular endothelial cells (mECs) are exposed to several pro- and anti-angiogenic factors that interact and eventually degrade the basal membrane, pervade bordering tissue, and expand themselves until forming tube-like structures. As a final step, pericytes and vascular smooth muscle cells are recruited to form mature new microvessels. Within the molecular mechanisms that control angiogenesis, we recently have reported that endogenous tissue factor (TF) expression in mECs regulates the formation and stabilization of microvessels (Arderiu et al., 2011).

TF is a 47 kDa transmembrane glycoprotein considered to be the essential initiator of blood coagulation. TF is a cofactor of FVIIa and an agonist of the protease-activated receptor 2 (PAR2). In addition to its roles in the coagulation cascade, TF seems to have a multifactorial role in atherogenesis inflammation, angiogenesis, and metastasis (Carmeliet et al., 1996). TF expression within the vasculature is strictly regulated and normally not observed under physiological conditions in endothelial cells (ECs) (Drake et al., 1989). In response to various pathological stimuli, TF expression and activity can be induced in ECs and most of these stimuli share similar signal transduction pathways to induce procoagulant activity. However, the signals that induce TF-mediated angiogenesis in mECs are poorly understood.

Angiogenesis is critically involved in the response of the organism to ischemic injury, and contributes to revascularization and organ preservation (Carmeliet, 2003). Infiltration of inflammatory cells in hypoxic areas is a hallmark to tissue ischemia (Silvestre et al., 2008). Monocytes have been shown to promote angiogenesis by releasing angiogenic growth factors, cytokines, and metalloproteinases (Czepluch et al., 2014; Jaipersad et al., 2014). Interaction between monocytes and ECs results in cross-modulation of several biological functions.

Received March 26, 2014. Revised June 12, 2014. Accepted July 3, 2014.
© The Author (2014). Published by Oxford University Press on behalf of *Journal of Molecular Cell Biology*, IBCB, SIBS, CAS. All rights reserved.

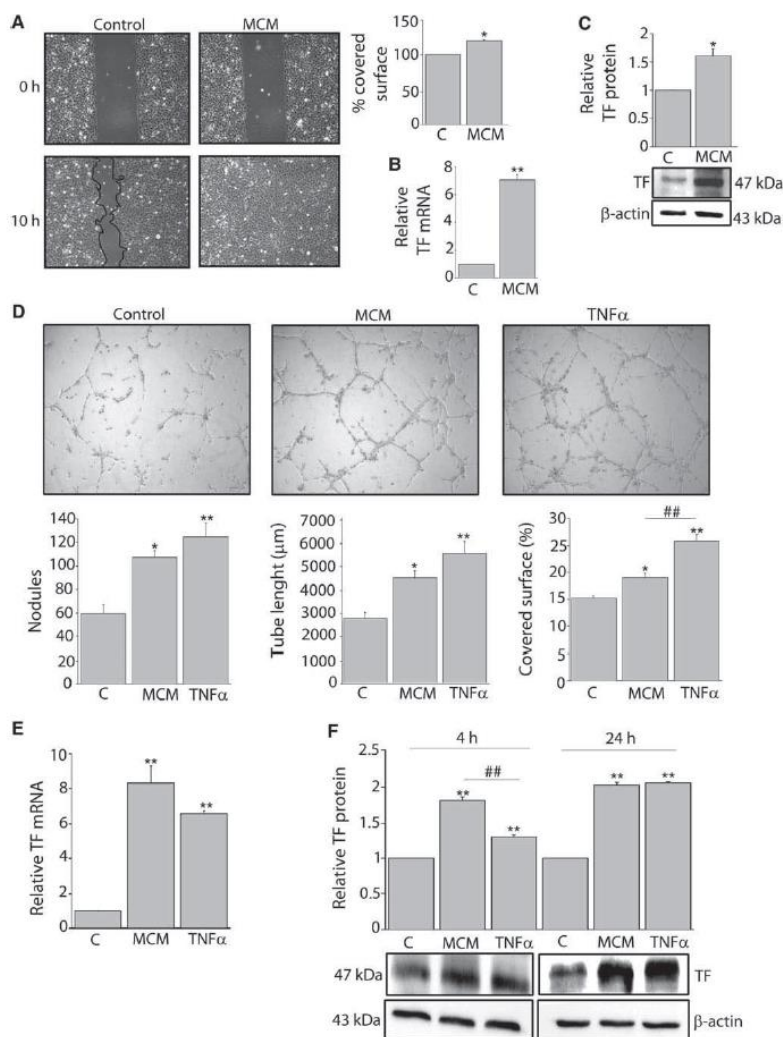


Figure 1 Secretome of monocytes induces TF expression and promotes tube-like formation in mECs. **(A)** Phase-contrast micrographs show the wound repair in HMEC-1 cultures with control (RPMI medium) or 24 h-long conditioning medium obtained from cultured monocytes (MCM). Migrated cell surface is represented in percent of control at 10 h. Values are expressed as mean \pm SE (* P < 0.05 vs. control media). **(B)** TF mRNA levels at 2 h were obtained by qRT-PCR. Results of relative mRNA expression from three different experiments are expressed as mean \pm SE (** P < 0.005 vs. control). **(C)** TF and β -actin protein levels in HMEC-1 cultured with MCM for 10 h were determined by immunoblotting. Blots are representatives from three independent experiments. Quantitative results of TF levels normalized to β -actin are expressed as mean \pm SE (* P < 0.05 vs. control). **(D)** Phase-contrast micrographs show tube-like structures of HMEC-1 cultured on 3DBM with MCM for 24 h. Completed medium supplemented with TNF α (100 ng/ml) was used as positive control. Tube-like structures were analyzed by measuring quantity of

Contact of monocytes with ECs accelerates endothelial dysfunction and increases TF-dependent procoagulant activity (PCA) (Napoleone et al., 1997). Whether inflammatory cells are also able to trigger other TF-dependent functions is not known.

Previously, we have reported the pro-angiogenic effects of TF intracrine signaling in mECs (Arderiu et al., 2011), but the inducers/triggers of mECs activation and TF-induced expression were not known. In this study, we hypothesized that released proteins from monocytes could be potential triggers of mEC activation and induce mEC-TF expression. Because angiogenesis involves migration and proliferation, we considered the possible involvement of the Wnt pathway that regulates fundamental aspects of tissue morphogenesis and vascular development (Logan and Nusse, 2004). Moreover, macrophages are known to regulate developmental and wound angiogenesis via noncanonical Wnt-Fr11 signaling (Stefater et al., 2011, 2013). Wnts constitute a large family of cysteine-rich secreted ligands, which trigger cellular responses through various pathways, referred to as canonical or noncanonical, using the Frizzled family of receptors (Slusarski et al., 1997; Logan and Nusse, 2004; Blumenthal et al., 2006).

Here, we show for the first time that mEC are induced to trigger intracrine TF signaling and angiogenesis by interacting with monocytes via Wnt5a-FZD5.

Results

The secretome of monocytes induces endothelial cell migration and upregulates TF gene expression

The secretome of isolated serum-free cultured human monocytes was isolated and added to wounded mEC monolayers to test migration and repair. Monocyte purity was detected by flow cytometry. Ten hours after wounding, mECs incubated with the secretome of monocytes (MCM) had mostly repaired the wound-exposed surface (Figure 1A). Moreover, TF gene expression was upregulated in mECs treated with MCM (2 h) (Figure 1B) and TF protein expression at 10 h (time point of wound closure) was also upregulated (Figure 1C). In addition, human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) responded similarly to MCM (Supplementary Figure S1). In order to show that the increased migration was TF dependent, wound healing assay was performed in confluent TF-silenced mECs. Results show that TF-silenced cells were not able to migrate; however, when TF-silenced cells were cultured in MCM, which restored TF mRNA and protein expression, cells migrated at the same level of scrambled siRNA cells cultured in control media (Supplementary Figure S2A, C and D). It is clear that 14 h after wound healing, TF-silenced cells did not migrate but the presence of MCM-induced wound closure (Supplementary Figure S2B). All together, these results show that TF expression induced by monocyte released is sufficient to promote migration.

The secretome of monocytes induces endothelial angiotube formation and TF gene expression

mECs were cultured in matrigel with and without MCM, and tube-like formation was evaluated by measuring nodules, tube length, and covered area at 24 h. Tumor necrosis factor α (TNF α) (100 ng/ml), a cytokine known to induce TF (Kirchhofer et al., 1994), was used as a positive control. Results showed a significant induction of angiogenesis by MCM and TNF α (Figure 1D). In addition, a highly significant induction of TF gene expression (at 2 h) and TF protein expression (at 4 h sustained until 24 h) was observed (Figure 1E and F). Interestingly, the effects of MCM were similar in HUVECs (Supplementary Figure S1). Because TNF α has been described to induce TF expression in endothelial cells, we discriminated whether the effects observed in TF expression were due to TNF α secreted by monocytes, by adding anti-TNF α antibody to MCM (Supplementary Figure S3). The presence of the anti-TNF α blocking antibody neither modified TF expression nor blocked tube formation. These results indicate that a soluble mediator(s) released by monocytes in their secretome, other than TNF α , induce(s) endothelial TF expression, cell migration, and angiotube formation.

Monocyte-derived Wnt5a upregulates endothelial TF expression

Because exogenous Wnt5a added to endothelial cell cultures had been shown to enhance endothelial cell survival and proliferation (Masckauchan et al., 2006), and Wnt5a could be induced by microbial induction in human mononuclear cells (Blumenthal et al., 2006), we tested whether Wnt5a could be secreted by monocytes and stimulate mECs-TF expression. Figure 2A shows that monocytes contain and release Wnt5a. In addition, Wnt5a protein levels were increased in mECs cultured for 4 h with MCM (Figure 2B and C). However, Wnt5a mRNA levels were not modified in mECs, indicating that mECs recruit Wnt5a from MCM. To investigate whether Wnt5a secreted by monocytes regulates microvascular tube formation, mECs were cultured in matrigel with MCM from scrambled or Wnt5a-silenced monocytes. Reductions of 70% \pm 5% for mRNA and 50% \pm 6% for protein levels of Wnt5a were evidenced in monocytes transfected with Wnt5a siRNA (Supplementary Figure S4). Tube-like formation was evaluated by measuring nodules, tube length, and covered area at 24 h. Figure 3A shows a significant decrease in nodules, tube length, and covered surface when mECs were cultured for 24 h in the presence of MCM obtained from Wnt5a-silenced monocytes. A reduction in capillary tube-like formation was accompanied by a reduction in TF mRNA and protein expression (Figure 3B).

In addition, to confirm that Wnt5a was directly involved in upregulating TF expression and in angiotube formation, recombinant human Wnt5a (R&D Systems) was added to mEC in three-dimensional basement membrane (3DBM) cultures. Angiogenesis

nodules, tube length, and % of covered surface of tubes. Results from three independent experiments are expressed as mean \pm SE (* P < 0.05, ** P < 0.005 vs. control, *** P < 0.005 vs. TNF α). (E) TF mRNA expression at 2 h on 3DBM was measured by qRT-PCR. Results of relative mRNA level are expressed as mean \pm SE (** P < 0.005 vs. control). (F) Protein levels of TF and β -actin at 4 and 24 h on 3DBM were determined by immunoblotting. Blots are representatives from three independent experiments. Quantitative results of relative TF levels normalized to β -actin are expressed as mean \pm SE (** P < 0.005 vs. control, *** P < 0.005 vs. TNF α).

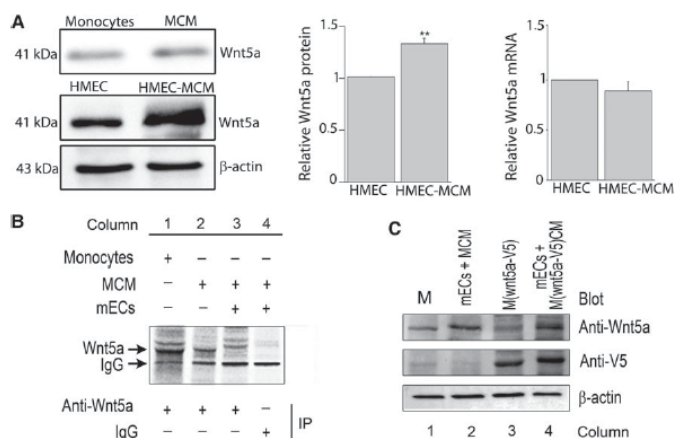


Figure 2 Monocyte-secreted Wnt5a is recruited by mECs. (A) HMEC-1 cells were cultured with or without monocyte-derived conditioned medium (MCM). Wnt5a mRNA levels at 2 h were measured by RT-PCR and showed no significant difference. Wnt5a protein levels at 24 h, as well as Wnt5a protein expression in monocytes and their supernatants, were determined by immunoblotting. Western blots shown are representatives from three independent experiments. Densitometry analysis was performed for relative Wnt5a protein levels normalized to β-actin. Data are expressed as mean ± SE (***P* < 0.005). (B) Pulse labeling and immunoprecipitation analysis for Wnt5a. Human monocytes were pulse-labeled with 0.65 mCi of ³⁵S-methionine/cysteine hydrolysate *Escherichia coli* for 16 h, then the MCM was collected and added to HMEC-1 for 4 h. Cells (monocytes, mECs) were lysed with RIPA buffer and immunoprecipitated with anti-Wnt5a antibody. IP samples were run in SDS-PAGE and detected by Phosphorimager. Column 1 shows Wnt5a in monocytes; Column 2 shows Wnt5a in MCM; Column 3 shows Wnt5a recruited by mECs; Column 4 shows IgG control. (C) Samples from monocytes (M), HMEC-1 cultured with MCM (mECs + MCM), Wnt5a-V5 overexpressing monocytes (M (Wnt5a-V5)), and HMEC-1 cultured with Wnt5a-V5 overexpressing monocytes conditioned media (mECs + M (Wnt5a-V5) CM) were subjected to immunoblotting with anti-Wnt5a antibody, anti-V5 antibody, and anti-β-actin antibody.

was tested by measuring nodules, tube length, and % of covered surface. Figure 4A shows a significant increase in nodules, tube length, and covered surface when mECs were cultured for 24 h in the presence of Wnt5a protein, showing dose-response effect. Interestingly, TF mRNA and TF protein levels (measured at 2 and 24 h, respectively) were also upregulated by Wnt5a in the same manner (Figure 4B and C).

To directly analyze the role of Wnt5a in the increased TF expression in mECs, TF-promoter transfected mECs were treated with Wnt5a protein during 24 h at different doses (0, 75, and 200 ng/ml final concentration). A significant enhanced activity of the TF promoter activity was observed at 75 and 200 ng/ml of Wnt5a (Figure 4D).

To further understand the role of Wnt5a on TF expression during angiogenesis, we examined whether in TF-silenced cells addition of exogenous Wnt5a protein would restore angiogenesis formation. Specific TF silencing in mECs cells significantly reduced tube formation, TF mRNA and TF protein expression levels, as previously seen (Arderiu et al., 2011). Addition of Wnt5a protein reversed the inhibitory effect of TF silencing (Figure 4A), and restored TF mRNA and TF protein expression (Figure 4E and F).

These results together indicate that monocytes release Wnt5a and activate mECs to produce TF and that Wnt5a is upstream of

TF and regulates its expression and function in angiogenesis.

Wnt5a signaling in endothelial cell promotes TF expression

Wnt5a induces signal transduction in target cells by binding to their receptors, the Frizzled family, a cysteine-rich seven transmembrane receptor family. We studied whether Wnt5a secreted by monocytes binds to FZD5 in mECs and induces signaling and TF expression. Figure 5 shows that MCM from monocytes increased FZD5-mRNA and FZD5-protein levels in mECs. When Wnt5a was silenced in monocytes and consequently it was not present in MCM, FZD5 was not significantly modified (Figure 5A and B). In order to show that monocyte-secreted Wnt5a signals through FZD5 and induces TF expression in mECs, FZD5 was silenced. Results showed that MCM was not able to induce TF expression in FZD5-silenced mECs (Supplementary Figure S5A). Same results were obtained when Wnt5a was added to the culture of FZD5-silenced mECs. Results indicated that FZD5 is required to induce Wnt5a response in mECs.

These results indicated that Wnt5a signals through FZD5, a non-canonical pathway, in mECs. Noncanonical Wnt pathway activation can involve the release of Ca²⁺ from intracellular stores and we observed that Wnt5a addition to mECs increased intracellular Ca²⁺ (Figure 5C). Furthermore, increases in Ca²⁺ may activate

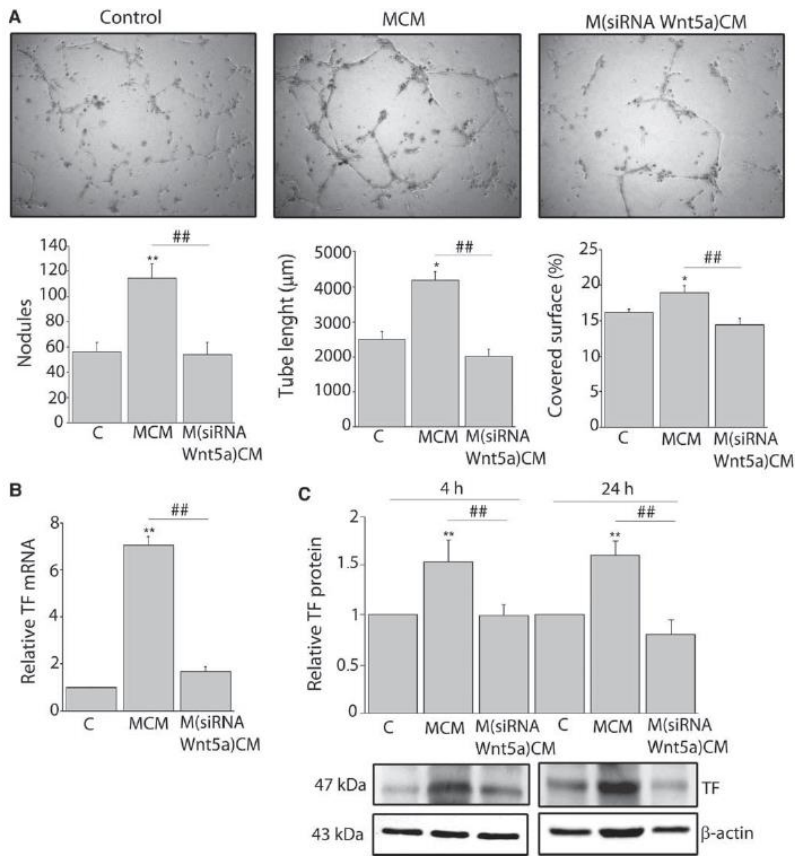


Figure 3 Effects of monocyte-secreted Wnt5a on TF expression during angiogenesis. (A) HMEC-1 cells were cultured in MCM on a 3DBM system for 24 h. Phase-contrast micrographs show tube-like structures of HMEC-1 cultured in fresh complete monocyte medium (C, control) or conditioned medium from wild-type monocytes (MCM) or siRNA Wnt5a monocytes (M(siRNA Wnt5a)CM). Tube-like structures were analyzed by measuring quantity of nodules, tube length, and % of covered surface of tubes. Values from three independent experiments are expressed as mean \pm SE (* P < 0.05, ** P < 0.005 vs. control, ## P < 0.005 vs. MCM). (B) TF mRNA levels at 2 h were measured by qRT-PCR. Results of relative mRNA level from three independent experiments are expressed as mean \pm SE (** P < 0.005 vs. control, ## P < 0.005 vs. MCM). (C) TF and β -actin protein levels at 4 and 24 h were measured by immunoblotting. Blots are representatives from three independent experiments. Values of relative TF protein levels normalized to β -actin are expressed as mean \pm SE (** P < 0.005 vs. control, ## P < 0.005 vs. MCM).

transcription factors as the nuclear factor-kappa B (NF κ B) (Mill and George, 2012), which has a recognition site on the TF promoter (Mackman et al., 1991). Our results show that NF κ B is increased in mECs when culture with MCM and is not modified when cultured with MCM from Wnt5a-silenced monocytes (Figure 5A and B). To confirm that Wnt5a induces TF expression in mECs through the non-canonical pathway, Wnt5a recombinant protein was added to mECs

cultured in 3DBM. The addition of Wnt5a protein increased FZD5 and NF κ B mRNA and protein expression (Figure 5D and E). Moreover, Wnt5a not only induced NF κ B expression, but also induced NF κ B activation. We observed increased phospho-NF κ B p65 and movement from the cytoplasm to the nucleus fraction, demonstrating an activation of NF κ B (Supplementary Figure S6A and B). In addition, in mECs cultured with MCM from Wnt5a-silenced monocytes, total

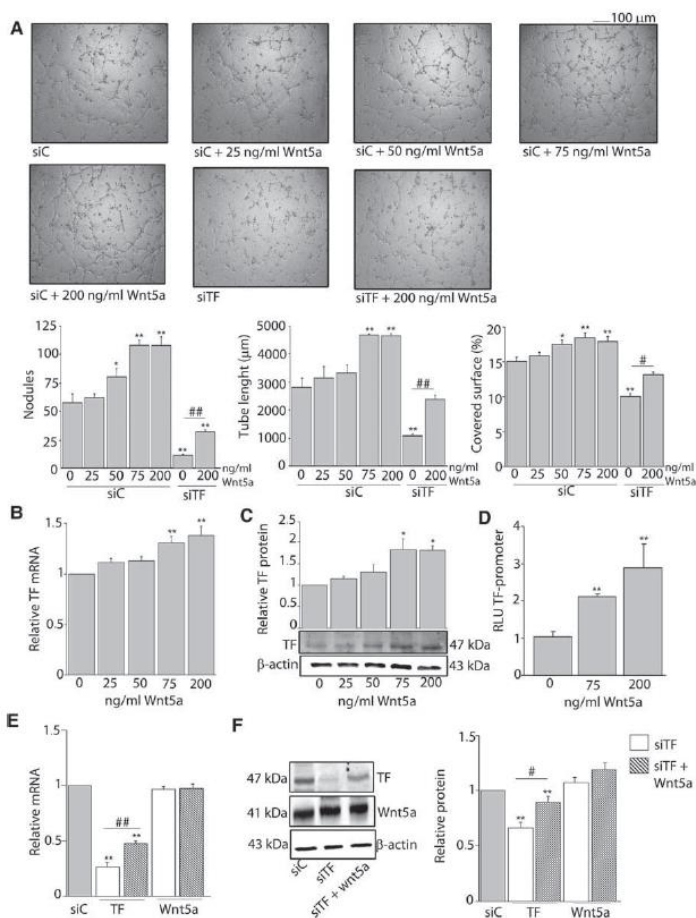


Figure 4 Effect of recombinant Wnt5a on TF expression during angiogenesis. Recombinant human Wnt5a protein was added to scrambled siRNA HMEC-1 (siC) cultures at different concentrations (25, 50, 75, and 200 ng/ml) or into TF-silenced HMEC-1 (siTF) cultures at 200 ng/ml. Cells were seeded and cultured on a 3DBM system. (A) Phase-contrast micrographs show tube-like formation at 24 h. Tube-like structures were analyzed by measuring quantity of nodules, tube length, and % of covered surface of tubes. Data from three independent experiments are expressed as mean ± SE (**P* < 0.05, ***P* < 0.005 vs. siC with 0 ng/ml Wnt5a and #*P* < 0.05, ##*P* < 0.005 vs. the correspondent siRNA). (B) TF mRNA levels at 2 h were determined by qRT-PCR. Results of relative mRNA expression are expressed as mean ± SE (***P* < 0.005 vs. 0 ng/ml Wnt5a). (C) TF and β-actin protein levels were measured by immunoblotting. Blots are representatives from three independent experiments. Results of relative TF protein expression normalized to β-actin are expressed as mean ± SE (**P* < 0.05 vs. 0 ng/ml Wnt5a). (D) TF promoter activity in HMEC-1 cultured with 0, 75, or 200 ng/ml Wnt5a for 24 h. RLU data from three independent experiments are expressed as mean ± SD (**P* < 0.005 vs. 0 ng/ml Wnt5a). TF-silenced HMEC-1 (siTF) cells were cultured in the presence or absence of human recombinant Wnt5a. TF and Wnt5a mRNA levels at 2 h (E) and protein levels of TF, Wnt5a, and β-actin at 24 h (F) were measured. Results of relative mRNA or protein level are expressed as mean ± SE (***P* < 0.005 vs. siC and #*P* < 0.05, ##*P* < 0.005 vs. the correspondent siRNA).

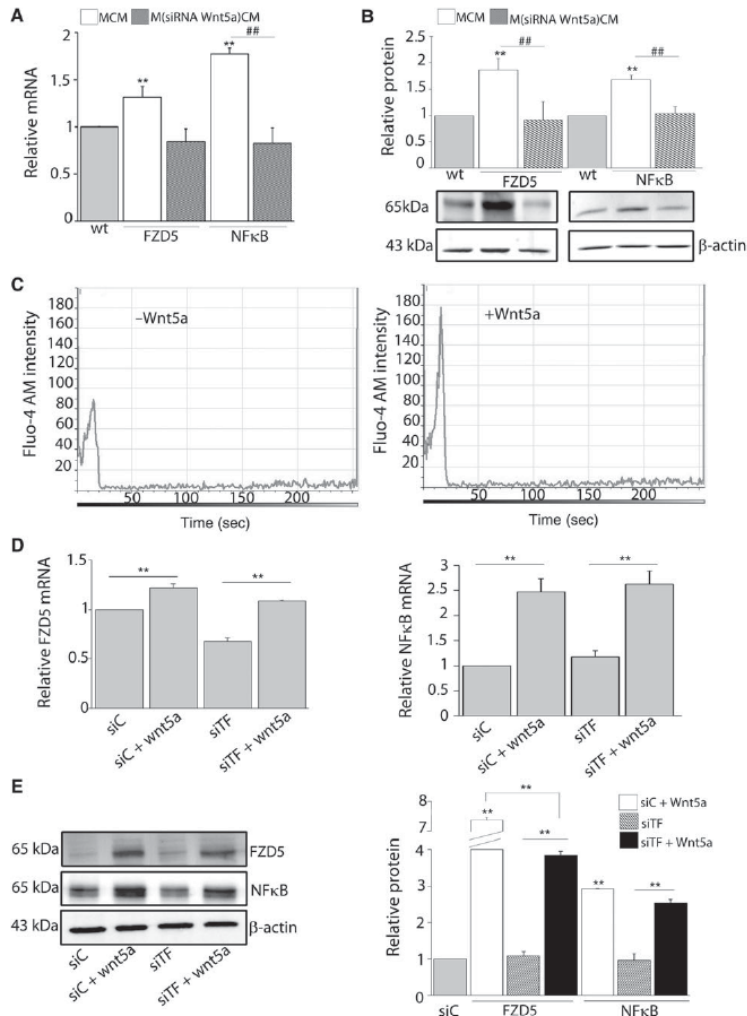


Figure 5 Wnt5a regulates TF expression through noncanonical pathway. HMEC-1 were cultured in control medium (wt) or conditioned medium obtained from scrambled siRNA monocytes (MCM) or Wnt5a-silenced monocytes (M(sirRNA Wnt5a)CM). Relative mRNA (A) and protein (B) levels of FZD5 and NFκB were determined by qRT-PCR at 2 h and by immunoblotting at 24 h, respectively. Results are expressed as mean ± SE (**P < 0.005 vs. wt, ##P < 0.005 vs. correspondent). (C) Calcium oscillations recorded in ECs loaded with fluo-4 AM with or without treatment of recombinant Wnt5a. Scrambled siRNA HMEC-1 (siC) or TF-silenced HMEC-1 cells were cultured with or without 200 ng/ml of human recombinant Wnt5a. Relative mRNA (D) and protein (E) levels of FZD5 and NFκB were determined by qRT-PCR at 2 h and by immunoblotting at 24 h, respectively. Results are expressed as mean ± SE (**P < 0.005 vs. correspondent).

expression of NFκB p65 was reduced as well as its localization in the nucleus fraction (Supplementary Figure S6C and D). In addition, to demonstrate the direct relation between Wnt5a–NFκB and TF, NFκB p65 was silenced in mECs. Supplementary Figure S3F shows that inhibition of NFκB decreased TF expression and it was not rescued by addition of Wnt5a protein.

To further test the pathway, we silenced TF in mECs and added Wnt5a to the cultures. Levels of FZD5 and NFκB mRNA and protein were unaffected by TF silencing but were increased when recombinant Wnt5a was added (Figure 5D and E).

Wnt5a has also been reported to activate the canonical pathway (Mikels and Nusse, 2006). To exclude that Wnt5a secreted by monocytes was not signaling by the canonical pathway in mECs, TF expression was analyzed in LRP5-silenced mECs cultured in MCM. Inhibition of LRP5 did not modify TF expression (Supplementary Figure S5B).

All together, these results indicated that Wnt5a secreted by monocytes interacts with its receptor FZD5 in mECs and through the noncanonical Wnt pathway release intracellular calcium that induces NFκB translocation to the nucleus and TF gene transcription. TF expression in mEC is then able to signal (via autocrine regulation) (Arderiu et al., 2012a) and to start the migration program to form neovessels (Supplementary Figure S7).

Wnt5a-TF induces microvessel formation in vivo

To evidence that the Wnt5a-TF axis induces microvessel formation *in vivo*, we performed two different experimental approaches. First, we subcutaneously inoculated nude mice with (i) PBS as control; (ii) mECs and scrambled siRNA monocytes (total number of cell 1×10^7 cells; ratio 1:1); (iii) mECs and Wnt5a siRNA monocytes (1×10^7 cells; ratio 1:1); and (iv) mECs and Wnt5a siRNA monocytes (1×10^7 cells; ratio 1:1) plus recombinant Wnt5a in matrigel plugs. The cells implanted in matrigel plugs retained their viability and silencing was sustained over the course of the entire experiment (data not shown). Angiogenesis was evaluated after 7 days. Plugs that contained only PBS (control) did not induce angiogenesis as indicated by the absence of the capillaries in the skin around the plug (Figure 6A, upper image) or inside the plug (Figure 6A, lower image). However, skin surrounding the implanted matrigel plug (with mECs and scrambled siRNA monocytes) showed well-developed zones of neovascularization (Figure 6B, upper image), and we found abundant blood-filled channels containing red blood cell in the plug (Figure 6B, lower image and F). In contrast, neovascularization was significantly suppressed in plugs implanted with mECs plus Wnt5a-silenced monocytes, as few branches were developed around the main vessel, and these microvessels were not stable showing leaking zones (Figure 6C). When Wnt5a recombinant protein was added in the plug, active angiogenesis with thick main vessels and many secondary branches were observed (Figure 6D). These microvessels were functional as demonstrated by the presence of red cells within the vessel (Figure 6F). The hemoglobin content normalized to the weight of the analyzed fragment of matrigel was significantly lower in matrigel plugs, containing mECs plus Wnt5a siRNA monocytes. Microvessel formation and hemoglobin contents were rescued by addition of Wnt5a recombinant protein.

In the second approach, we demonstrated the direct effect of Wnt5a in mECs. Nude mice were subcutaneously inoculated with (i) PBS; (ii) 5×10^6 scrambled siRNA mECs; (iii) TF siRNA cells; (iv) TF siRNA cells plus recombinant Wnt5a; (v) Wnt5a siRNA cells and (vi) Wnt5a siRNA cells plus recombinant TF in matrigel plugs. Angiogenesis was evaluated as described above. As before, plugs that contained only PBS (control) did not induce angiogenesis. Figure 7B shows that skin surrounding matrigel plug with scrambled cells (WT) contained sprouting endothelial microvessels and showed frequent branching and abundant blood-filled channels containing red blood cells. However, when TF was silenced few single small un-branched vessels were observed and we did not find any stable structure inside the plug (Figure 7C). Recombinant Wnt5a added to TF-silenced endothelial cells was able to recover microvessel formation, and a thick mesh of microvessels surrounded by branching structure of microvessels was formed and all of them contained red blood cells (Figure 7D). Moreover, when we inoculated Wnt5a-silenced mECs, short vessels without branching were found (Supplementary Figure S8), and addition of TF recombinant protein rescued vessel with long structure formation. Furthermore, our results show that monocytes increased angiogenesis and this effect was mediated by Wnt5a (Supplementary Figure S9). All these results indicate that Wnt5a through TF signaling induces microvessel formation.

Angiogenesis in atherosclerotic lesions of human coronary arteries

Microvessels surrounded by macrophages were searched in human coronary atherosclerotic plaques. Previously we demonstrated that advanced human atherosclerotic coronary arteries have an extended network of microvessels (Arderiu et al., 2011). Supplementary Figure S10A shows a human coronary artery atherosclerotic plaque with significant neovascularization (red for vWF staining) in the medial and intimal layers with infiltration of monocyte-macrophages (green) around microvessels. Moreover, as we previously showed, we find by double immunolocalization studies that TF expression is found in microvessels within atherosclerotic lesions colocalizing with microvascular endothelial cells but not in the luminal endothelial cells (Supplementary Figure S10C). In addition, we found zones with monocyte-macrophages (green) and high levels of Wnt5a (red) (Supplementary Figure S10D). Zones with high TF expression (red) are also positive for Wnt5a (green) (Supplementary Figure S10E). Together these findings show a common tissue localization that is coincident with the concept proposed in this work of monocytes driving mECs activation through Wnt5a release, Wnt5a binding to mECs, and inducing TF expression that by intracrine regulation will induce microvessel formation. In addition, Supplementary Figure S11 shows immunostaining on explanted matrigel plugs. Localization of mECs (positive vWF, red) and monocytes (green) can be seen in neovessels, as well as localization of mECs (vWF/red) and TF (green). Finally, localization of TF (green) and FZD5 (red) was also observed.

Discussion

Intracellular TF upregulation in mECs induces microvessel formation and its stabilization by attracting pericytes (Arderiu et al.,

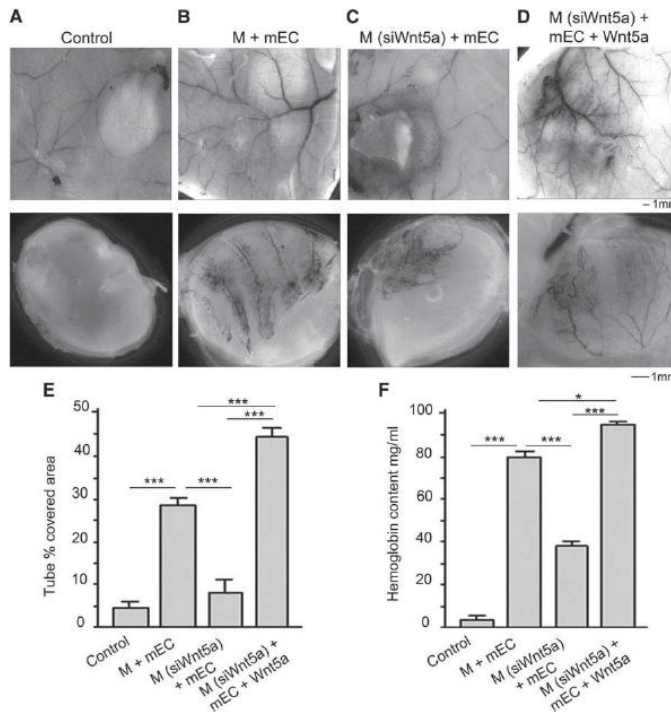


Figure 6 Wnt5a secreted by monocytes induces microvessel formation in matrigel plugs *in vivo*. Macroscopic views of skin tissues (upper) and matrigel plugs (lower) after 7 days matrigel plug injection. (A) Control, matrigel plugs with PBS; (B) co-culture of scrambled siRNA monocytes (M) and HMEC-1 (mEC); (C) co-culture of Wnt5a siRNA monocytes and mECs; and (D) co-culture of Wnt5a siRNA monocytes and mECs with 200 ng/ml of recombinant Wnt5a. Images are representatives from four animals for each group; original magnification, 10×. (E) Quantification of tube % covered area in the skin surrounding matrigel plugs. Values from four animals per group are expressed as mean ± SE. (F) Hemoglobin content in matrigel implants measured by cyanhemoglobin method on Day 7. Data are presented as mean ± SE from four plugs per group. **P* < 0.05 and ****P* < 0.001.

2011). However, which kind of stimulus induces TF expression in mECs and promotes angiogenesis remains unknown. Monocyte-mEC interactions play a key role in the innate inflammatory response, thrombosis, and development of atherosclerotic lesions (Ross, 1993). Adhesion of monocytes seems to upregulate TF-dependent procoagulant activity in ECs (Napoleone et al., 1997; Sakamoto et al., 2005). In this study, we demonstrate that monocytes secrete Wnt5a that binds to FZD5 in mECs and activates the Wnt5a noncanonical pathway inducing TF expression. TF by intracrine signaling triggers microvessel formation (Supplementary Figure S7).

Monocytes have been directly implicated in the angiogenic process to improve tissue perfusion (being protective) or localizing inside atheroma plaque (being detrimental) (Ribatti et al., 2008).

Monocytes participate in the angiogenic process by secreting pro- and anti-inflammatory cytokines, which could control mEC proliferation, their survival and apoptosis, as well as their migration and activation. Monocytes are a heterogeneous cell population, and it has recently been demonstrated that monocyte subsets partially differ in their contribution to angiogenesis (Czepluch et al., 2014). However, the mechanism of induction of angiogenesis of the distinct human monocyte subsets is largely unknown so far. Using a standardized mEC migration wound repair assay, we identified that the secretome of cultured CD14⁺ monocytes induced monolayer wound repair, and our results also indicated that secreted molecules from siRNA scrambled monocytes were able to induce TF expression in mECs and consequently endothelial angiotube formation. Pro-inflammatory cytokines released by

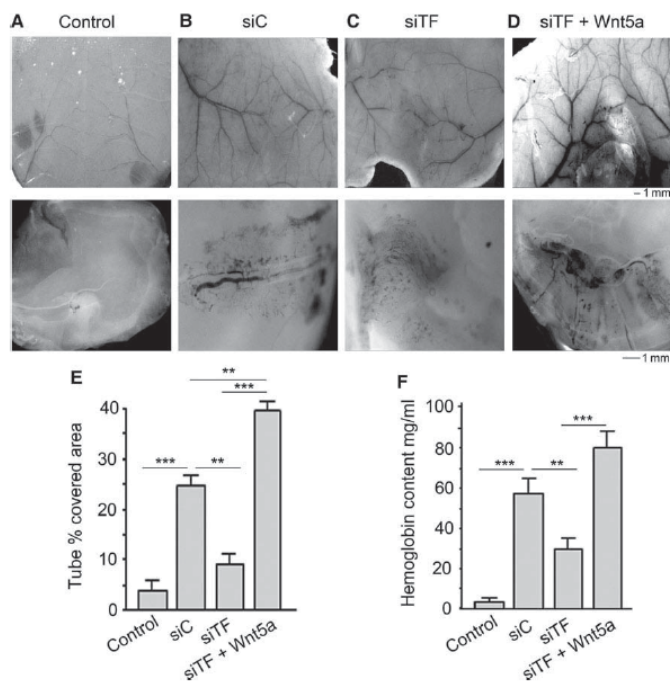


Figure 7 Endothelial microvessels formed in matrigel plugs *in vivo*. Images show macroscopic views of skin tissues (upper) and matrigel plugs (lower) after 7 days of matrigel plug injection. (A) control; (B) scrambled siRNA endothelial cells (siC); (C) TF siRNA endothelial cells (siTF); (D) TF siRNA endothelial cells plus recombinant Wnt5a. Images are representatives from four animals for each group; original magnification, 10 \times . (E) Quantification of tube % covered area in the skin surrounding matrigel plugs. Values from four animals per group are expressed as mean \pm SE. (F) Hemoglobin content in Matrigel implants measured by cyanhemoglobin method on Day 7. Data are presented as mean \pm SE from four plugs per group. ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$.

monocytes have been extensively studied in this context. TNF α secreted by monocytes was demonstrated to induce angiogenesis (Leibovich et al., 1987) as well as TF protein expression and TF pro-coagulant activity in endothelial cells (Bevilacqua et al., 1986; Kirchofer et al., 1994; Napoleone et al., 1997). However, blocking TNF α by a functional antibody in MCM did not affect angiotube formation; therefore, the signaling effects measured in this study were not TNF α -dependent. Here, we have identified Wnt5a as the protein secreted by monocytes that regulate TF in mECs. Further studies will be required to analyze the role of monocyte subsets in the pathway here identified.

In macrophages, one of the mechanisms that may regulate wound angiogenesis involves a noncanonical Wnt pathway by FIt1 signaling (Stefater et al., 2013). Wnts are lipid-modified secreted glycoproteins that regulate diverse biological processes. Wnts trigger intracellular responses through various signaling pathways, referred to as canonical or noncanonical, using the

Frizzled family receptors (Logan and Nusse, 2004) or in complex with co-receptors as Ror2. Wnt5a, which triggers the noncanonical Wnt pathway, induces cell proliferation and survival in primary endothelial cells (Masckauchan et al., 2006). Noncanonical Wnt pathway activation involves Ca²⁺ release, elevated levels of cytosolic Ca²⁺, and activation of the transcription NF κ B that regulate a multitude of cellular functions including cytoskeletal organization, cell polarity, and cell motility (Mill and George, 2012). The Ca²⁺ pathway activated by Wnts promotes the formation of capillary-like networks of endothelial cells *in vitro* as well as endothelial cell proliferation and survival, suggesting a pro-angiogenic role *in vivo* (Cheng et al., 2008). Moreover, it has been described that NF κ B in the nucleus can bind the target sites in the TF gene promoter to regulate the induction of TF gene transcription (Parry and Mackman, 1995; Holschermann et al., 2001). Thus, we have found that monocytes secrete Wnt5a, which binds FZD5 and through non-canonical Wnt pathway signaling promotes TF expression. FZD5

was shown to be essential for yolk and placental angiogenesis (Ishikawa et al., 2001) and TF deficiency in mice causes abnormalities of vascular pericytes, resulting in defective yolk sac vessel development and subsequent embryo wasting during embryogenesis (Carmeliet et al., 1996). Here, we show that FZD5 and TF are related by the noncanonical Wnt signaling cascade in adult cells with clear functions.

Interaction of Wnt5a with FZD5 involved Ca^{2+} release and finally NF κ B activation that promoted TF gene upregulation. It has been shown that persistent NF κ B-mediated signal transduction is closely linked to plaque progression, destabilization, and rupture (Brand et al., 1996). Moreover, NF κ B has also been related with upregulation of genes responsible for cell proliferation and cancer (Grivnenkov and Karin, 2010). Here we show how in mECs, NF κ B activation induces TF expression and microvessel formation.

Plaque rupture is the principal cause of luminal thrombosis in acute coronary syndromes (Davies and Thomas, 1984). In atherosclerotic plaque formation, the initial phase of intimal thickening is angiogenesis independent; however, when plaque enlarges it is believed that the ensuing hypoxia, inflammatory cell infiltration and high levels of internalized low-density lipoproteins (LDL), promote plaque neovascularization (Jain et al., 2007). Plaque neovascularization may promote plaque rupture events by direct and indirect mechanisms. Intermittent hemorrhage from newly formed plaque capillaries traps blood cells and other pro-atherogenic molecules, which abruptly induce inflammation and trigger a period of plaque instability (Kolodgie et al., 2003; Virmani et al., 2005). Vulnerable plaques are also characterized by increased levels of TF, mainly from infiltrated macrophages (Moons et al., 2002). Although, there is a paucity of this type of samples, the information that we retrieve from them is very important and unique. However, immunohistochemistry in human coronary plaques is difficult because samples have to be processed without delay to probe the epitopes searched and this process is not easy with human material. Autopsy material was of no value and we looked for heart transplant samples. Nonetheless, as a proof of principle of our results we investigated human coronary plaques. In these coronary atherosclerotic plaques we have been able to localize monocytes, Wnt5a, and microvascular endothelial cells positive for TF forming neovessels in the same niche (Supplementary Figure S10).

In sum, our results indicate that monocytes have an important role in promoting angiogenic processes by secreting Wnt5a and activating the noncanonical pathway in mECs. Wnt5a secreted by monocytes interacts with FZD5 as Wnt5a receptor, releases intracellular Ca^{2+} , and finally induces NF κ B activation and TF gene upregulation in mECs (Figure 6). TF expression in endothelial cells is then able to signal and trigger neovessel formation by intracrine regulation.

Material and methods

Cell culture

Immortalized human microvascular endothelial cell line (HMEC-1) (Ades et al., 1992), from the Center of Disease Control (Atlanta, GA, USA) was used. HMEC-1 were maintained in MDCB131 (Invitrogen)

supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 2 mM glutamine (Invitrogen) and 50 mg/ml gentamicin (Invitrogen). Key experiments were repeated using primary human umbilical vein endothelial cell (HUVEC), obtained from Advancell. HUVECs were cultured in MEM199 (Invitrogen) supplemented with 20 mM HEPES, pH 7.4 (Invitrogen), 20% FBS, 30 μ g/ml of endothelial cell growth supplement (ECGS, Sigma-Aldrich) 1 mM pyruvate (Invitrogen), 2 mM glutamine (Invitrogen), 100 μ g/ml heparin (Sigma) and antibiotics (100 U/ml penicillin and 0.1 mg/ml streptomycin; Invitrogen). HUVECs were used between passages 3 and 6.

Isolation of human peripheral blood monocytes

Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated from human buffy coats of healthy donors by gradient centrifugation over Ficol-Paque Plus (GE Healthcare). PBMC were subsequently collected and washed in PBS four times. Cell number and viability were determined using a Beckman-Coulter. PBMC were seeded in surface-modified polystyrene dishes for enhanced cell attachment (BD Falcon) and were cultured in RPMI 1640 (Gibco) supplemented with 10% of human serum A/B. After 4–6 h, cultures were washed in PBS four times, removing non-attached cells, and fresh medium was added. Total attached monocytes were cultured for additional 18 h; then, the medium was collected. CD14 expression was detected by flow cytometry as a monocytes purity marker. Cells were removed from plates using PBS containing 0.53 mM EDTA and incubated with CD14-PerCP monoclonal antibody (Immunostep, dilution 1:10). For each sample, at least 10000 events were acquired on a Coulter Epics XL Flow Cytometer equipped with a 488-nm argon laser (Beckman Coulter). Samples incubated with the same final concentration of isotype-matched antibody were used as a negative control. The data were analyzed with the Expo32 program (Beckman Coulter).

Wound repair assay

ECs were seeded on sterile culture dishes and grown on monolayer until confluence. The monolayer was scratched to form a double-sided scrape wound as previously described (Pena et al., 2012). Wound repairs were assessed either with freshly monocytes medium or with supernatant of monocytes. Images were acquired at time 0, 2, 4, 6, 8, and 10 h under 10 \times objective. They were digitalized and processed with a Leica DMIRE2 microscope attached to a video SPOT Leica-DFC350FX camera. Wounds areas were analyzed by using ImageJ and StatView software.

Tube formation in vitro assay

Tube formation assay was performed as described (Arderiu et al., 2007). Three-dimensional cultures were prepared by seeding ECs on basement membrane (3DBM) (BD MatrigelTM, BD Biosciences) coated plates. Cells were incubated for 24 h in the medium collected from monocyte culture supernatants, as we previously described. ECs grown in monocytes medium were used as negative control and ECs cultured in medium supplemented with 100 ng/ml of TNF α were used as positive control. In some experiments we added anti-TNF α blocking antibody in MCM (Abcam #ab6671). Experiments were performed in the presence of IgG control

(Millipore, #12–370). Images were acquired at time 0, 4, and 24 h, digitalized and processed with Leica DMIRE2 microscope and SPOT Leica-DFC350FX camera. Tube length and surface covered with tubes were analyzed by using ImageJ. Nodules were also counted. Values were expressed as quantity of nodules, tube length, and the percentage of covered surface with tubes versus control samples.

Silencing RNA

Three-dimensional cultures were prepared as we previously described. The insertion of small interfering RNAs (siRNAs) into mECs and monocytes was done with a Nucleofector device and its corresponding kits (Amaxa, Inc.). Transfection protocols were performed following the manufacturer's instructions using the T16 or X01 programs. The siRNAs against TF (s4932), Wnt5a (s14873), FZD5 (s15416), and LRP5 (s8293) were purchased from Applied Biosystems and NfκB p65 (s6534) from Cell Signaling. In all experiments, a scrambled siRNA (Silencer Negative control siRNA from Applied Biosystems #AM4638) was used as control to evidence any unspecific changes to the gene expression profile or in cell phenotype that may result from the use of siRNA.

RNA and protein extraction from 3DBM cultures

Cells grown in matrigel were isolated and washed with cold PBS without Ca²⁺ and Mg²⁺, containing 5 mM EDTA, as described in Arderiu et al. (2007). Cells were then scraped into a centrifuge tube with 15 ml cold PBS/EDTA and incubated for 45 min on ice. Once matrigel was disassociated, the tubes were centrifuged and the pellet was resuspended in the appropriate volume of lysis buffer for RNA or protein isolation. Soluble and insoluble subcellular fractions were obtained as described (Arderiu et al., 2007).

Real-time PCR

Total RNA from cultures was isolated by RNeasy isolation kit (Qiagen) according to the manufacturer's recommendations and reverse transcribed with High Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems) with random primers. Assays-on-Demand™ (Applied Biosystems) of TaqMan™ fluorescent real-time PCR primer were used for TF (Hs00175225_m1), Wnt5a (Hs00180103_m1), FZD5 (Hs00258278_s1), NfκB (Hs00765730_m1), and GADPH (4326317E) (Applied Biosystems), which was used as endogenous control.

Protein extraction from monolayer cultures and western blot analysis

Protein was extracted from total cell lysates by using RIPA buffer (50 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 0.5% sodium Deoxycholate, 0.1% SDS). Protein concentrations were measured with 2-D Quant Kit (GE Healthcare). Twenty-five micrograms of protein samples were separated by 10% SDS-PAGE gels. Then, they were transferred onto nitrocellulose membranes. After blocking for non-specific binding with 5% Albumin Bovine Fraction V (MP Biomedical), membranes were incubated with primary antibodies, including polyclonal anti-TF antibody (American Diagnostica, #4501, dilution 1:1000); monoclonal anti-Wnt5a

antibody [3D10] (Abcam, #ab86720, dilution 1:500); polyclonal anti-Frizzled 5 antibody (Abcam, #ab75234, dilution 1:1000); monoclonal anti-β-Catenin antibody (BD Biosciences, #610154, dilution 1:1000); monoclonal anti-phospho-NfκB p65 (Ser536), anti-NfκB p65 antibody [D14E12], and anti-NFAT [D43B1] (Cell Signaling, #3036, #8242, and 35861, respectively, dilution 1:1000); and anti-LRP5 (Abcam, #51910, dilution 1:500), followed by rabbit anti-mouse-HRP (1:10000), rabbit anti-goat-HRP (1:10000), or goat anti-rabbit-HRP (1:10000), according to convenience. Then, the membranes were stripped and blocked again with the same procedure, treated with a monoclonal or polyclonal anti-β-actin antibody (Abcam, #ab8226 or #ab8227, 0.2 μg/ml), followed by rabbit anti-mouse-HRP (1:10000) or goat anti-rabbit-HRP (1:10000), depending on the requirements. Membranes were washed to remove excess of antibodies and blots were developed by ECL systems (Amersham Biosciences). Band densities were analyzed with the ChemiDoc XRS™ system (Bio Rad) in chemiluminescence detection modus and with Quantity-One software (Bio Rad).

Pulse labeling and immunoprecipitation assays

20 × 10⁶ PBMC were seeded in 100 mm-dishes with RPMI 1640 medium, 10% human serum A/B, 2 mM L-glutamine, 100 U/ml of penicillin G and 100 μg/ml of streptomycin, and 1% HEPES. After 24 h culturing at 37°C, 5% CO₂, non-adherent cells were removed by several washes in Ca²⁺ and Mg²⁺-free PBS, and adherent cells were incubated with 5 ml of Methionine-free RPMI medium supplemented with 10% dialyzed human serum A/B for 30 min before labeling with 0.65 mCi of S³⁵ Methionine/Cysteine from *E. coli* hydrolysate (NEG 772, Perkin Elmer). After 16 h labeling, supernatants were collected, centrifuged 5 min at 100 g to eliminate cell debris, and added to HMEC-1 cultures for 4 h. Cells (monocytes and HMEC-1) were lysed with RIPA buffer (20 mM Tris at pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1% Triton X-100, 2.5 mM sodium pyrophosphate, 1 mM Na₃VO₄ with complete protease inhibitors (Roche) and the resulting extracts were spun at 14000 × g for 10 min at 4°C. Samples were incubated with mouse anti-Wnt5a antibody (Abcam, #ab8720) at dilution 1:200 overnight. Afterwards, 20 μl of Protein G-Sepharose was added and incubated at 4°C for 3 h and then washed with RIPA buffer for five times. IP samples were resuspended with 20 μl 3× SDS sample buffer with β-mercaptoethanol and load on SDS-PAGE gel. Labeled monocyte supernatants were also loaded in gels after being concentrated by using Amicon Ultra-4 centrifugal filter 3K device (Millipore). Gels were fixed with 10% acetic acid and 20% methanol, vacuum-dried at 50°C for 2 h and visualized by Typhoon FLA9500 Phosphorimager (GE Healthcare Life Sciences).

Wnt5a transient transfection

PBMC were isolated as previously described. The insertion of plasmids into monocytes was done with a Nucleofector device and its kit V (Amaxa, Inc.). Transfection protocols were performed following the manufacturer's instructions using the X01 program. Either 0.4 μg of DNA from empty vector (pcDNA3.2) or active Wnt5a-V5 (from Adggene) was transfected to 1 × 10⁷ cells. Then, monocytes were seeded as usual in order to obtain their conditioned medium.

Promoter construct and activity by luciferase gene reporter assay

The TF promoter sequence from -40 to +91 bp (considering the nucleotide +1 the start of transcription) was cloned into luciferase reporter vector pGL3 (Promega) by using the following primers: forward-GGTACCACCGCAGGGCAAGTGAC and reverse-CTCGAGGGGAGCTCGCAGTCTTGG (*KpnI* and *XhoI* restriction sites are underlined). To confirm the functional activity of this minimal promoter TF sequence, as it was already described by Krikun et al. (1998), co-transfection experiments with the cDNAs of Egr1 and Sp1 transcription factors in pcDNA.3 were performed (see Supplementary Method). To measure the transcriptional activity of the promoter, the construction was transiently transfected in HMEC-1 cells. On Day 0, HMEC-1 cells were seeded (120000 cells/well) in 12 well plates with MCDB131 10% FBS and gentamicin. Transfection was performed with Lipofectamine Reagent (Invitrogen). On Day 1, HMEC-1 cells were transfected with 0.5 µg/well of the TF promoter construction and 50 ng/well of pRL-null Renilla (Promega) and 2 µl of lipofectamine. The DNA/liposome complexes were added to the cells for 3 h. After 24 h, Wnt5a protein was added at different final concentrations (0, 75, and 200 ng/ml) for 24 h. Luciferase activity was measured using the Dual Luciferase assay kit (Promega) and a luminometer (Orion I, Berthold detection systems) according to the manufacturer's instructions. Results were normalized to Renilla activity and were expressed as mean ± SD of three independent experiments performed in triplicate. A *P*-value < 0.05 was considered statistically significant.

Intracellular calcium transients

Spontaneous calcium transients were measured in adherent cells loaded for 15 min at 37°C with either Fluo-4 AM with or without treatment of Wnt5a recombinant protein (5 µM; Molecular Probes, Invitrogen). For the analysis of agonist-induced intracellular Ca²⁺ transients, cells were stimulated with 200 ng/ml of Wnt5a. Changes in Fluo-5 fluorescence intensity emitted at one excitation wavelength (485 nm) were measured with a confocal microscope (Leica TCS SP2-AOBS) by PL APO 20 × /0.7 Multi-immersion CS objective. Measurements were obtained from regions of interest in the cells.

Angiogenesis assay in vivo

All animal experiments were performed under approved protocols of the institutional animal use and care committee. 1 × 10⁷ mECs or co-culture of monocytes and mECs (at ratio 1:1) were prepared in 300 µl of matrigel media and injected subcutaneously in nude mice. After injection, the matrigel rapidly formed a plug. All mice were euthanized at 7 days post-injection and the skin of the mouse was easily pulled back to expose the matrigel plug, which remained intact. Skin and plugs were visualized by Leica AF 6000LX Stereo Microscope with Digital camera DFC, 8 bits of resolution, Objective 1.0 × 0.03/1.0 × 0.09.

Hemoglobin assessment

Plug-hemoglobin content was analyzed using the cyanhemoglobin method (Drabkin's method) modified by us for tissues (Arderiu et al., 2012b).

Immunohistochemistry of coronary arteries

Human coronary arteries were obtained from hearts removed during transplant operations performed at the Hospital de la Santa Creu i Sant Pau (Barcelona, Spain). The specimens were immersed in fixative solution (4% paraformaldehyde) and after embedded in O.C.T. The reviewer institutional Committee on Human of the Hospital de la Santa Creu i Sant Pau approved the research protocol for this study. Paraffin-embedded specimens were cut into 5 mm thick serial sections, placed on poly-L-lysine coated slides, deparaffinized, and stained with hematoxylin–eosin or processed for immunohistochemistry. Samples were immunostained with primary antibodies; rabbit anti-human Von Willebrand factor (1:50) (Dako, #A0082) (to identify endothelial cells), monoclonal anti-TF antibody (1:50) (American Diagnostica, #4509), polyclonal anti-Wnt5a antibody (1:50) (Abcam, #ab72583), and monoclonal macrophage antibody [MAC387] (1:50) (Abcam, #ab4908). Appropriated secondary antibodies were added for 1 h and stained cells were washed and covered with Prolong Gold antifade reagent (Molecular Probes). Images of immunostained sections were recorded on a Leica inverted fluorescence confocal microscope (Leica TCS SP2-AOBS, Germany).

Statistical analysis

Results were expressed as mean ± standard error (SE) and the number of experiments is shown in every case in the figure legends. Values were tested for statistical differences by the parametric one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey HSD *post hoc* test. *P* < 0.05 was considered statistically significant.

Supplementary material

Supplementary Material is available at *Journal of Molecular Cell Biology* online.

Acknowledgements

We thank Olaya Garcia (Cardiovascular Research Center (CSIC-ICCC); IIB-Sant Pau and UAB) for her excellent technical assistance.

Funding

This work was supported in part by grants from Ministry of Science and Education of Spain (SAF2013-42962-R to L.B.) and Instituto de Salud Carlos III (RIC-RD12/0042/0027 and TERCEL RD12/0019/0026 to L.B. and CPII13/00012, PI12/02332 to G.A.). We thank the Fundación de Investigación Cardiovascular and the Fundación Jesus Serra for their support.

Conflict of interest: none declared.

References

- Ades, E.W., Candal, F.J., Swerlick, R.A., et al. (1992). HMEC-1: establishment of an immortalized human microvascular endothelial cell line. *J. Invest. Dermatol.* 99, 683–690.
- Arderiu, G., Cuevas, I., Chen, A.M., et al. (2007). HoxA5 stabilizes adherens junctions via increased Akt1. *Cell Adh. Migr.* 1, 185–195.
- Arderiu, G., Pena, E., Aledo, R., et al. (2011). Tissue factor regulates microvessel formation and stabilization by induction of chemokine (C-C motif) ligand 2 expression. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 31, 2607–2615.
- Arderiu, G., Pena, E., Aledo, R., et al. (2012a). Tissue factor-Akt signaling triggers microvessel formation. *J. Thromb. Haemost.* 10, 1895–1905.

- Arderiu, G., Pena, E., Aledo, R., et al. (2012b). Ets-1 transcription is required in tissue factor driven microvessel formation and stabilization. *Angiogenesis* 15, 657–669.
- Bevilacqua, M.P., Pober, J.S., Majeau, G.R., et al. (1986). Recombinant tumor necrosis factor induces procoagulant activity in cultured human vascular endothelium: characterization and comparison with the actions of interleukin 1. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 83, 4533–4537.
- Blumenthal, A., Ehlers, S., Lauber, J., et al. (2006). The Wingless homolog WNT5A and its receptor Frizzled-5 regulate inflammatory responses of human mononuclear cells induced by microbial stimulation. *Blood* 108, 965–973.
- Brand, K., Page, S., Rogler, G., et al. (1996). Activated transcription factor nuclear factor-kappa B is present in the atherosclerotic lesion. *J. Clin. Invest.* 97, 1715–1722.
- Carmeliet, P. (2003). Angiogenesis in health and disease. *Nat. Med.* 9, 653–660.
- Carmeliet, P., Mackman, N., Moons, L., et al. (1996). Role of tissue factor in embryonic blood vessel development. *Nature* 383, 73–75.
- Cheng, C.W., Yeh, J.C., Fan, T.P., et al. (2008). Wnt5a-mediated non-canonical Wnt signalling regulates human endothelial cell proliferation and migration. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 365, 285–290.
- Czepluch, F.S., Bernhardt, M., Kuschie, H., et al. (2014). In vitro and in vivo effects of human monocytes and their subsets on new vessel formation. *Microcirculation* 21, 148–158.
- Davies, M.J., and Thomas, A. (1984). Thrombosis and acute coronary-artery lesions in sudden cardiac ischemic death. *N. Engl. J. Med.* 310, 1137–1140.
- Drake, T.A., Morrissey, J.H., and Edgington, T.S. (1989). Selective cellular expression of tissue factor in human tissues. Implications for disorders of hemostasis and thrombosis. *Am. J. Pathol.* 134, 1087–1097.
- Folkman, J. (1995). Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat. Med.* 1, 27–31.
- Grivennikov, S.I., and Karin, M. (2010). Dangerous liaisons: STAT3 and NF-kappaB collaboration and crosstalk in cancer. *Cytokine Growth Factor Rev.* 21, 11–19.
- Holschermann, H., Rascher, C., Oelschläger, C., et al. (2001). Opposite regulation of tissue factor expression by calcineurin in monocytes and endothelial cells. *J. Immunol.* 166, 7112–7120.
- Ishikawa, T., Tamai, Y., Zom, A.M., et al. (2001). Mouse Wnt receptor gene Fzd5 is essential for yolk sac and placental angiogenesis. *Development* 128, 25–33.
- Jain, R.K., Finn, A.V., Kolodgie, F.D., et al. (2007). Antiangiogenic therapy for normalization of atherosclerotic plaque vasculature: a potential strategy for plaque stabilization. *Nat. Clin. Pract. Cardiovasc. Med.* 4, 491–502.
- Jaipersad, A.S., Lip, G.Y., Silverman, S., et al. (2014). The role of monocytes in angiogenesis and atherosclerosis. *J. Am. Coll. Cardiol.* 63, 1–11.
- Kirchhofer, D., Tschopp, T.B., Hadvary, P., et al. (1994). Endothelial cells stimulated with tumor necrosis factor-alpha express varying amounts of tissue factor resulting in inhomogenous fibrin deposition in a native blood flow system. Effects of thrombin inhibitors. *J. Clin. Invest.* 93, 2073–2083.
- Kolodgie, F.D., Gold, H.K., Burke, A.P., et al. (2003). Intraplaque hemorrhage and progression of coronary atheroma. *N. Engl. J. Med.* 349, 2316–2325.
- Krikun, G., Schatz, F., Mackman, N., et al. (1998). Transcriptional regulation of the tissue factor gene by progestins in human endometrial stromal cells. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 83, 926–930.
- Leibovich, S.J., Polverini, P.J., Shepard, H.M., et al. (1987). Macrophage-induced angiogenesis is mediated by tumor necrosis factor-alpha. *Nature* 329, 630–632.
- Logan, C.Y., and Nusse, R. (2004). The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 20, 781–810.
- Mackman, N., Brand, K., and Edgington, T.S. (1991). Lipopolysaccharide-mediated transcriptional activation of the human tissue factor gene in THP-1 monocytic cells requires both activator protein 1 and nuclear factor kappa B binding sites. *J. Exp. Med.* 174, 1517–1526.
- Masckauchan, T.N., Agalliu, D., Vorontchikhina, M., et al. (2006). Wnt5a signaling induces proliferation and survival of endothelial cells in vitro and expression of MMP-1 and Tie-2. *Mol. Biol. Cell* 17, 5163–5172.
- Mikels, A.J., and Nusse, R. (2006). Purified Wnt5a protein activates or inhibits beta-catenin-TCF signaling depending on receptor context. *PLoS Biol.* 4, e115.
- Mill, C., and George, S.J. (2012). Wnt signalling in smooth muscle cells and its role in cardiovascular disorders. *Cardiovasc. Res.* 95, 233–240.
- Moons, A.H., Levi, M., and Peters, R.J. (2002). Tissue factor and coronary artery disease. *Cardiovasc. Res.* 53, 313–325.
- Napoleone, E., Di Santo, A., and Lorenzet, R. (1997). Monocytes upregulate endothelial cell expression of tissue factor: a role for cell-cell contact and cross-talk. *Blood* 89, 541–549.
- Parry, G.C., and Mackman, N. (1995). Transcriptional regulation of tissue factor expression in human endothelial cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 15, 612–621.
- Pena, E., Arderiu, G., and Badimon, L. (2012). Subcellular localization of tissue factor and human coronary artery smooth muscle cell migration. *J. Thromb. Haemost.* 10, 2373–2382.
- Ribati, D., Levi-Schaffer, F., and Kovanen, P.T. (2008). Inflammatory angiogenesis in atherogenesis—a double-edged sword. *Ann. Med.* 40, 606–621.
- Ross, R. (1993). The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* 362, 801–809.
- Sakamoto, T., Ishibashi, T., Sakamoto, N., et al. (2005). Endogenous NO blockade enhances tissue factor expression via increased Ca²⁺ influx through MCP-1 in endothelial cells by monocyte adhesion. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 25, 2005–2011.
- Silvestre, J.S., Mallat, Z., Tedgui, A., et al. (2008). Post-ischaemic neovascularization and inflammation. *Cardiovasc. Res.* 78, 242–249.
- Slusarski, D.C., Corces, V.G., and Moon, R.T. (1997). Interaction of Wnt and a Frizzled homologue triggers G-protein-linked phosphatidylinositol signalling. *Nature* 390, 410–413.
- Stefater, J.A., III, Lewkowich, I., Rao, S., et al. (2011). Regulation of angiogenesis by a non-canonical Wnt-Fit1 pathway in myeloid cells. *Nature* 474, 511–515.
- Stefater, J.A., III, Rao, S., Bezold, K., et al. (2013). Macrophage Wnt-Calcineurin-Fit1 signaling regulates mouse wound angiogenesis and repair. *Blood* 121, 2574–2578.
- Virmani, R., Kolodgie, F.D., Burke, A.P., et al. (2005). Atherosclerotic plaque progression and vulnerability to rupture: angiogenesis as a source of intraplaque hemorrhage. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 25, 2054–2061.

Supplementary Material

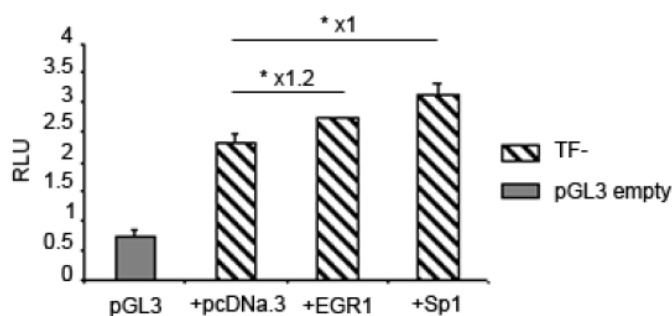
Monocyte-secreted Wnt5a interacts by FZD5 in microvascular endothelial cells and induce angiogenesis through Tissue Factor signaling

Gemma Arderiu*, Sonia Espinosa*, Esther Peña, Rosa Aledo, Lina Badimon

* Contributed equally to this work.

Supplementary Method

To analyze the effect of Sp1 and Egr1 transcription factors over this TF promoter region, as it was previously described (Krikun et al., 1998), cotransfection with 100 ng/well of these cDNAs and 500 ng of TF promoter construction were performed by using Lipofectamine (Invitrogen) as specified in the manuscript. Cells transfected with empty plasmid pcDNA.3 for each construction was used as control of transfection. The Sp1 cDNA was constructed in pcDNA.3 (kindly provided by Dr. Amit Das). Human cDNA from Egr1 was obtained from mRNA of HeLa cells by using the primer 3'UTR- CCCTTTAGCAAATTTCAATTGT in a specific first strand RT-PCR and secondly by using the primers for- AAGCTTATGGCCGCGCCAAGGCCGA, rev-CTCGAGTTAGCAAATTTCAATTGTCCT and cloned in HindIII/XhoI restriction sites (underlined) in pcDNA.3. Results were normalized to Renilla activity and were expressed as mean \pm SE of three independent experiments performed in triplicate. A P-value <0.05 was considered statistically significant. There was an increase of TF promoter activity by overexpression of Sp1 and Egr1 transcription factors as it was previously described in this minimal TF promoter sequence (Krikun et al., 1998). The coexpression of EGR1 and Sp1 plasmids significantly increases the promoter activity by 1.2 and 1.3 fold, respectively.

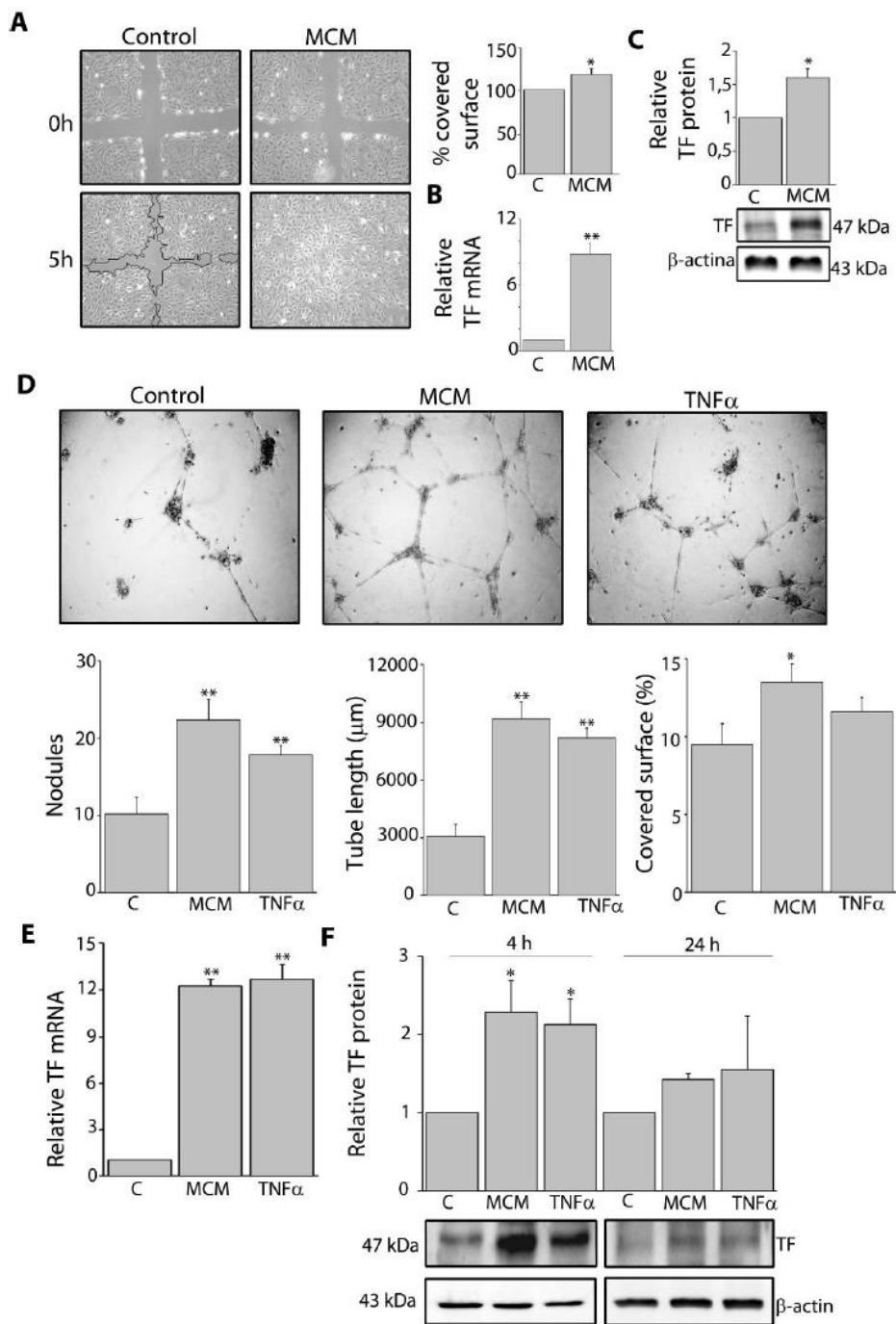


Effects of the overexpression of Sp1 and Egr1 on TF promoter activity in HMEC-1 cells. Relative luciferase units (RLU) of TF-promoter activity normalized by Renilla. Data from three independent experiments by duplicate are represented as mean \pm SEM (*p<0.05).

References

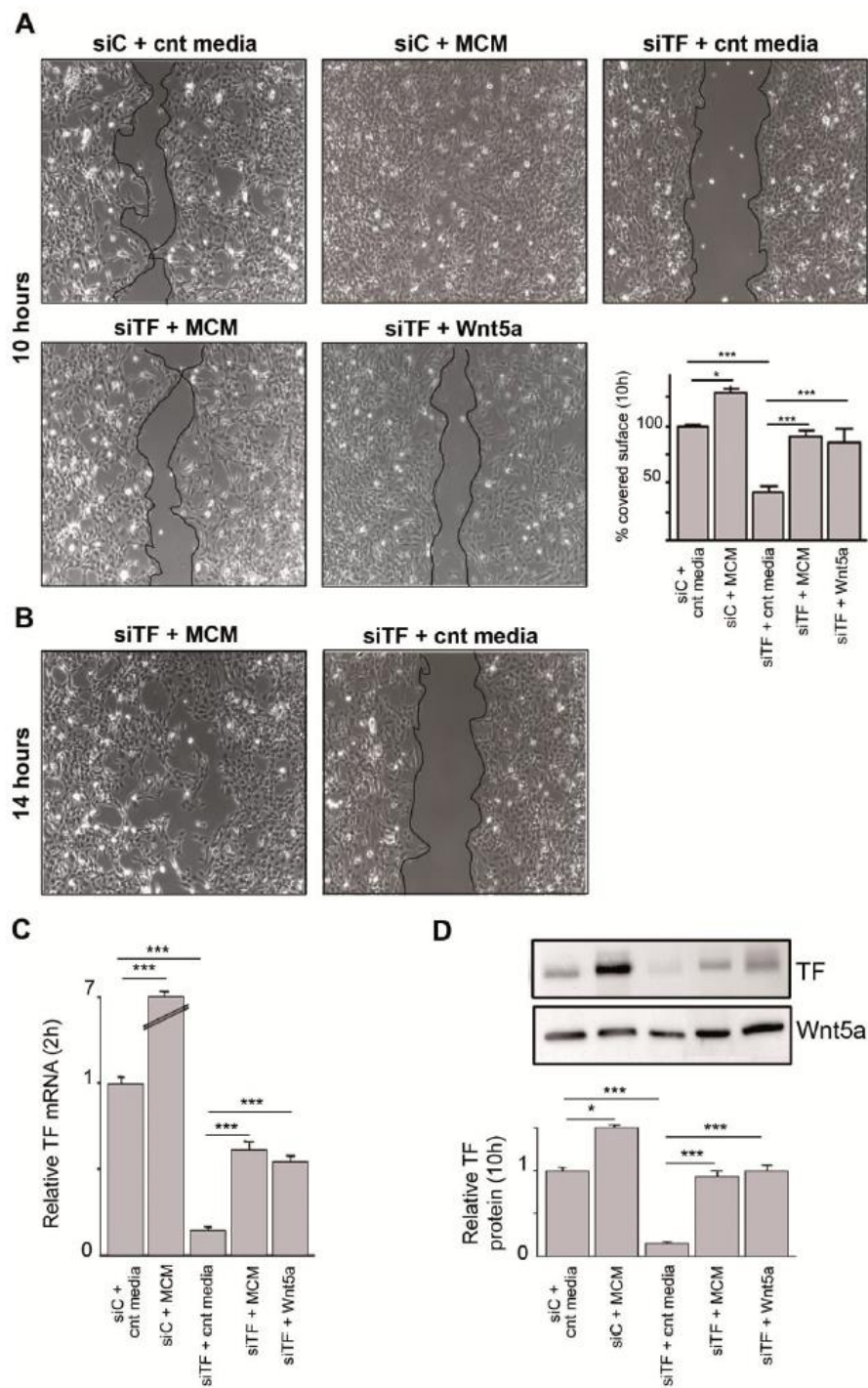
Krikun, G., F. Schatz, N. Mackman, S. Guller, and C.J. Lockwood. 1998. Transcriptional regulation of the tissue factor gene by progestins in human endometrial stromal cells. *J Clin Endocrinol Metab.* 83:926-30.

Supplementary Figure S1



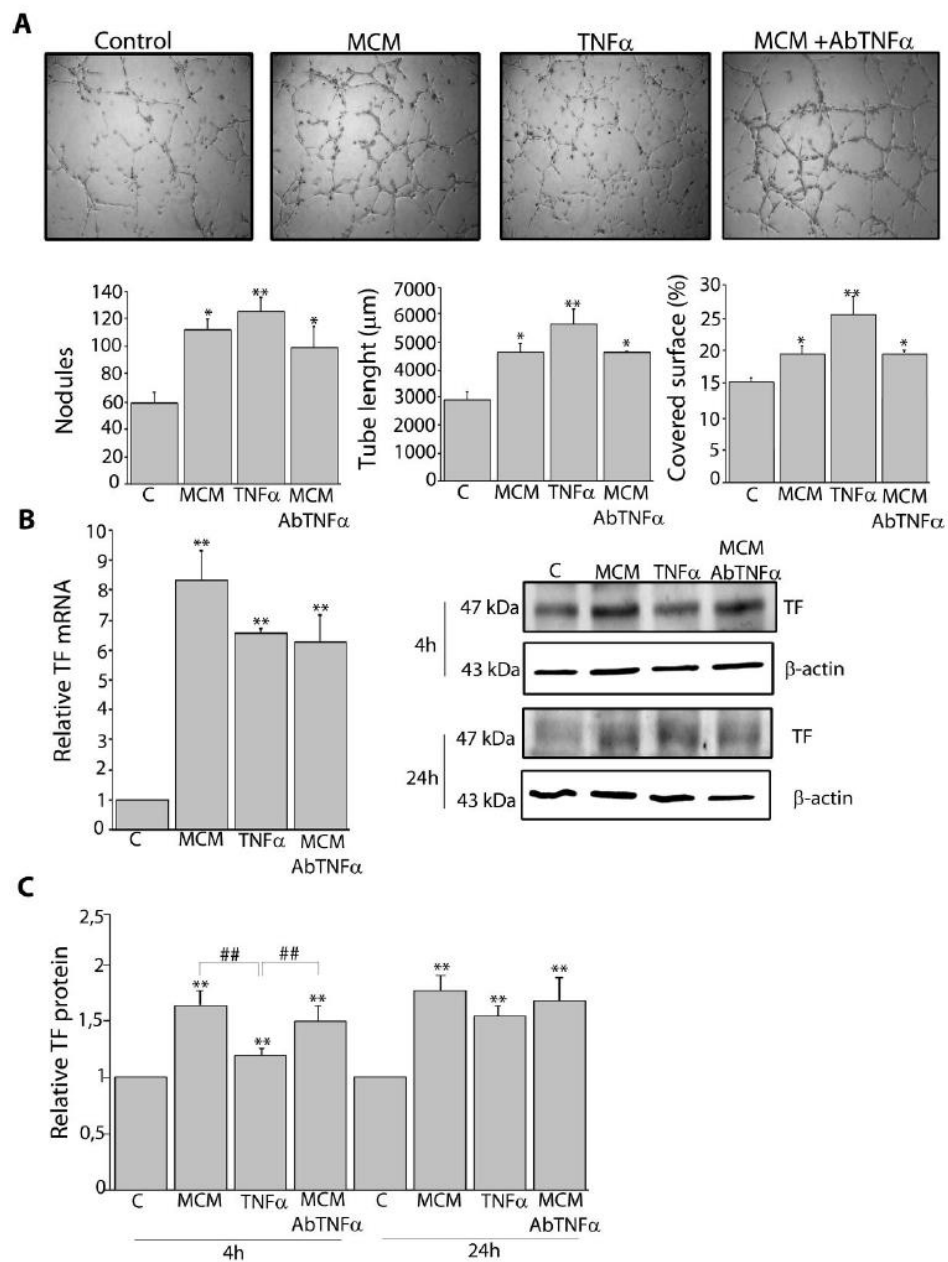
Supplementary Figure S1 Monocytes supernatants triggered TF expression and promote tube-like formation in HUVEC. (A) HUVEC monolayers were scraped-injured and monocyte conditioning medium (MCM) (24 hours culture) was added. Repaired surface represents cell coverage of the wounded area at 5 hours; results are expressed as % of covered surface of wound \pm SE (* p <0.05) (N=3). (B) TF mRNA levels in HUVEC (2 hours) results are expressed as relative mRNA expression \pm SE (** p <0.005) (N=3). (C) TF and β -actin protein expression; results are expressed as the average levels of TF normalized by β -actin in three experiments \pm SE (* p <0.05) (N=3). (D) Panels show tube-like structures of HUVEC cultured on 3DBM in presence of MCM; completed medium supplemented with TNF α (100 ng/ml) was used as positive control; results are expressed as the average of quantity of nodules, tube length and covered surface \pm SE (* p <0.05, ** p <0.005) (N=3). (E) TF mRNA expression (qRT-PCR); results are expressed as mRNA relative level \pm SE (** p <0.005) at 2 hours (N=3). C. Protein levels of TF normalized by β -actin \pm SE (* p <0.05) at 4 and 24 hours (N=3).

Supplementary Figure S2



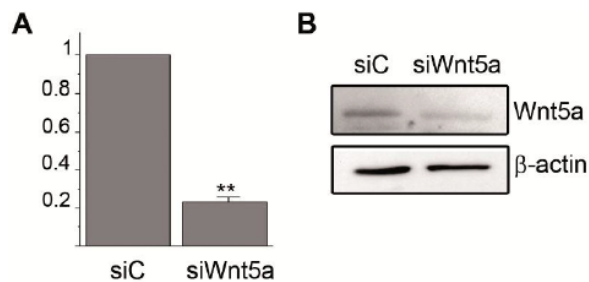
Supplementary Figure S2 Monocyte-induced TF expression promotes microvascular endothelial cell migration. (A) Scrambled siRNA HMEC-1 (siC) or TF siRNA HMEC-1 (siTF) monolayers were scraped-injured and monocyte conditioning medium (MCM) (24 hours culture) or recombinant human Wnt5a protein were added. Repaired surface represents cell coverage of the wounded area at 10 hours; results are expressed as % of covered surface of wound \pm SE (* p <0.05 and *** p <0.001) (N=3). (B) TF siRNA HMEC-1 (siTF) monolayers in presence of control or monocyte conditioning medium (MCM) fourteen hours after wounding. (C) TF mRNA levels in HMEC-1 (2 hours) results are expressed as relative mRNA expression \pm SE (*** p <0.001) (N=3). (D) TF and β -actin protein expression (10 hours); results are expressed as the average levels of TF normalized by β -actin in three experiments \pm SE (*** p <0.001) (N=3).

Supplementary Figure S3



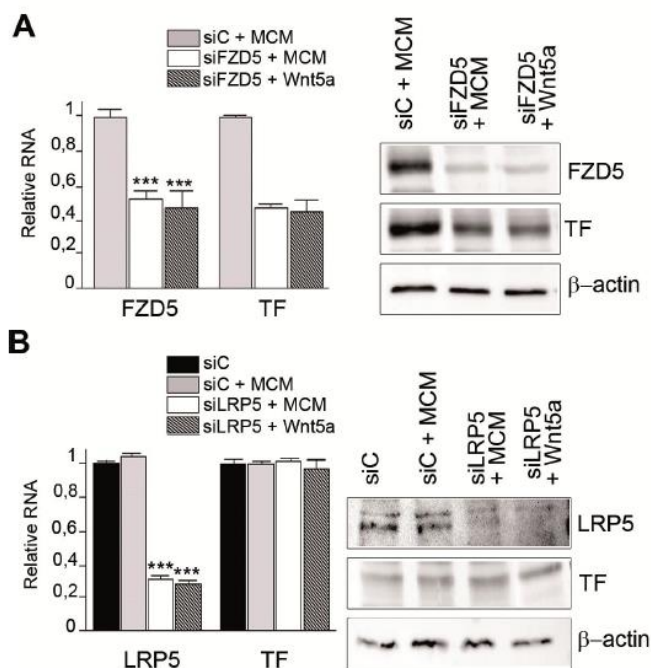
Supplementary Figure S3 TNF α secreted by monocytes not induce endothelial tube formation and TF expression. (A) Panels show tube-like structures of HMEC-1 cultured with **RPMI medium (control)** or MCM in a 3DBM system for 24 hours. **MCM contained non-immune IgG (MCM)** or anti-TNF α antibody (Abcam, dilution 1:200) was used to neutralize TNF α in MCM (**MCM+AbTNF α**). Completed medium supplemented with TNF α at 100 ng/ml was used as positive control (**TNF α**). (B) TF mRNA expression was measured by qRT-PCR at 2 hours. Results are expressed as mRNA relative level \pm SE (**p<0.005 versus control). (C) Protein levels of TF and β -actin were expressed as relative protein levels \pm SE (**p<0.005 versus control and ## p<0.005) at 4 and 24 hours. All the experiments were performed three times in duplicates.

Supplementary Figure S4



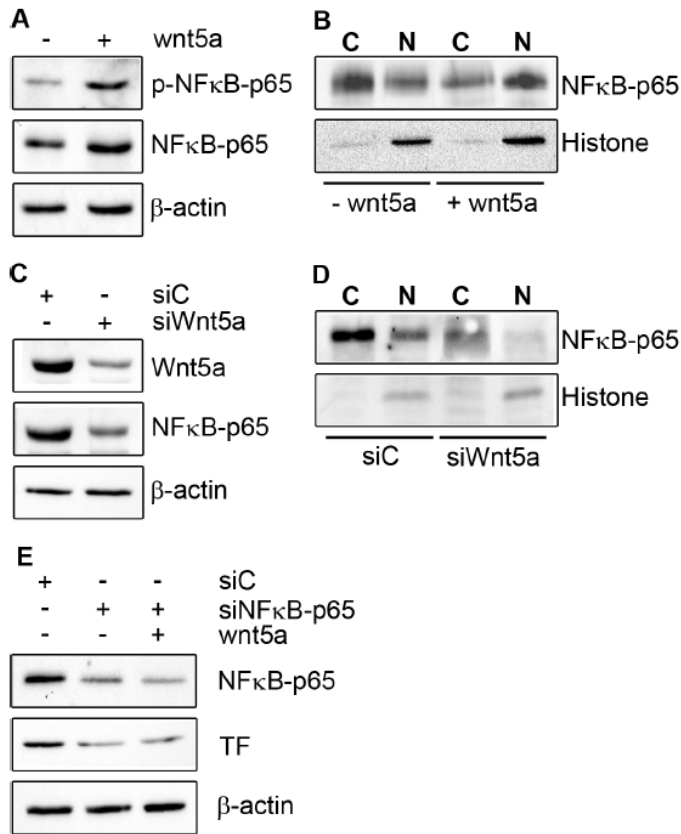
Supplementary Figure S4 Wnt5a silenced monocytes. (A) Real time polymerase chain reaction analysis of Wnt5a mRNA levels in scrambled siRNA monocytes (siC) or wnt5a siRNA monocytes (siWnt5a). Results are expressed as mRNA relative level \pm SE (**p<0.005). (B) Western blot show Wnt5a expression in scrambled siRNA monocytes (siC) or Wnt5a siRNA monocytes (siWnt5a).

Supplementary Figure S5



Supplementary Figure S5 Wnt5a induces TF expression by FZD5 (noncanonical pathway), but not by LRP5 (canonical pathway). (A) Relative levels of FZD5 and TF mRNA were determined by qRT-PCR in scrambled (siC) or FZD5 silenced (siFZD5) HMEC-1 cultured in MCM or with Wnt5a recombinant protein at 2 hours of assay. Results are expressed as relative mRNA levels \pm SE (***) $p < 0.001$ versus siC). Western blot show FZD5 and TF protein levels in cultures explained before at 24 hours of assay. (B) Relative levels of LRP5 and TF mRNA were determined by qRT-PCR in scrambled (siC) or LRP5 silenced (siLRP5) HMEC-1 cultured in control media or MCM with or without Wnt5a recombinant protein at 2 hours of assay. Results are expressed as relative mRNA levels \pm SE (***) $p < 0.001$ versus siC). Western blot show LRP5 and TF protein levels in cultures explained before at 24 hours of assay.

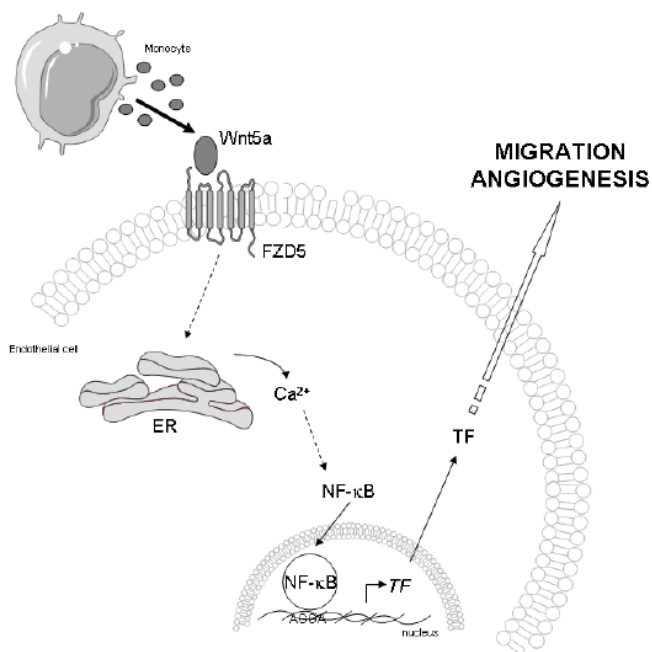
Supplementary Figure S6



Supplementary Figure S6 Wnt5a in mECs induces NFκB p65 activity and TF expression.

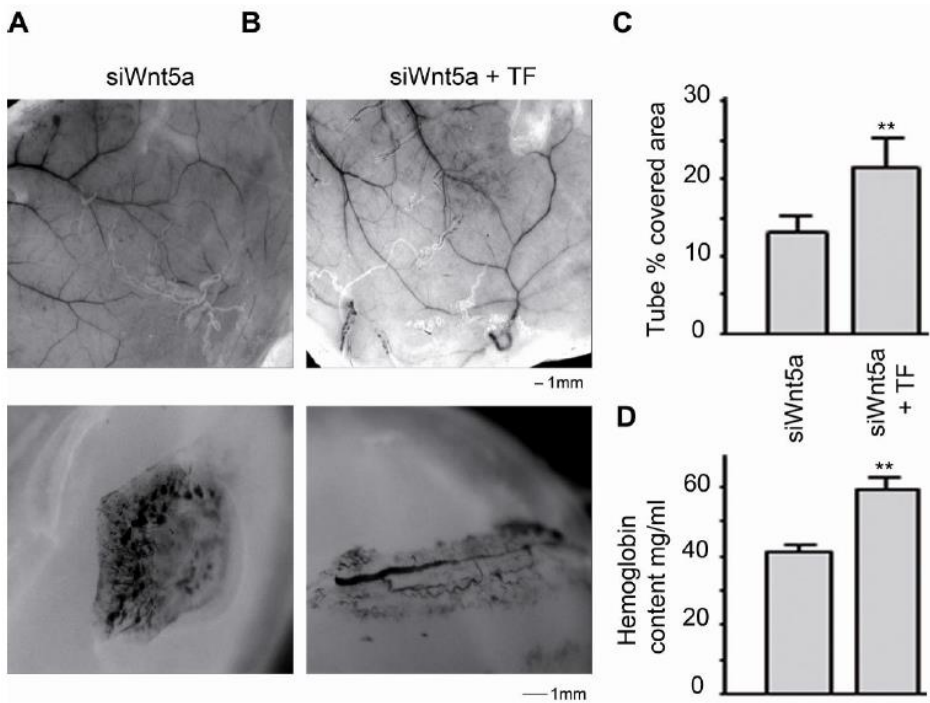
(A) Western blot show phospho and NFκB p65 protein levels in mECs in presence or absence of 200 ng/ml recombinant Wnt5a protein. (B) Western Blot of NFκB p65 in Triton 100 soluble (Cytoplasm) and insoluble (Nucleus) fractions in mECs in presence or absence of Wnt5a. (C) Wnt5a and NFκB p65 protein levels in scrambled or Wnt5a siRNA mECs. (D) NFκB p65 in Triton 100 soluble (Cytoplasm) and insoluble (Nucleus) fractions in scrambled or Wnt5a siRNA mECs. (E) NFκB p65 and TF expression protein in scrambled or NFκB p65 siRNA mECs in presence or absence of recombinant Wnt5a protein.

Supplementary Figure S7



Supplementary Figure S7 Diagram showing the induction of angiogenesis in mECs by monocyte-secreted Wnt5a and TF signaling.. Monocytes secrete Wnt5a that interact with Frizzled receptors that lead to Ca²⁺ release. Ca²⁺ is released from the endoplasmic reticulum and activates NFκB that translocates to the nucleus where it transcribes downstream regulated genes as TF. TF then signals to induce angiogenesis.

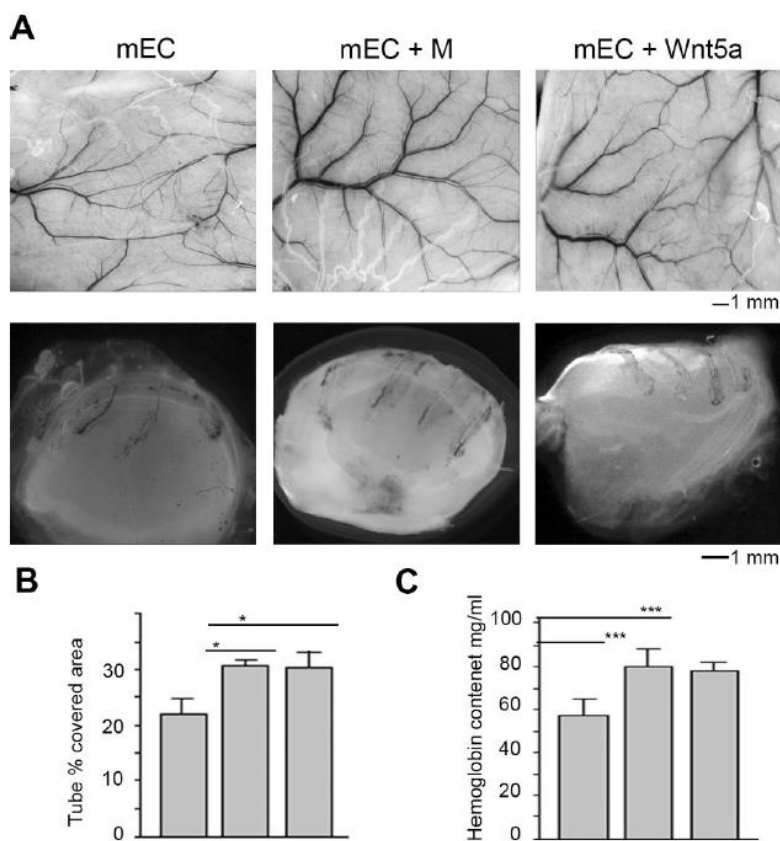
Supplementary Figure S8



Supplementary Figure S8 Endothelial microvessels formed in matrigel plugs *in vivo*.

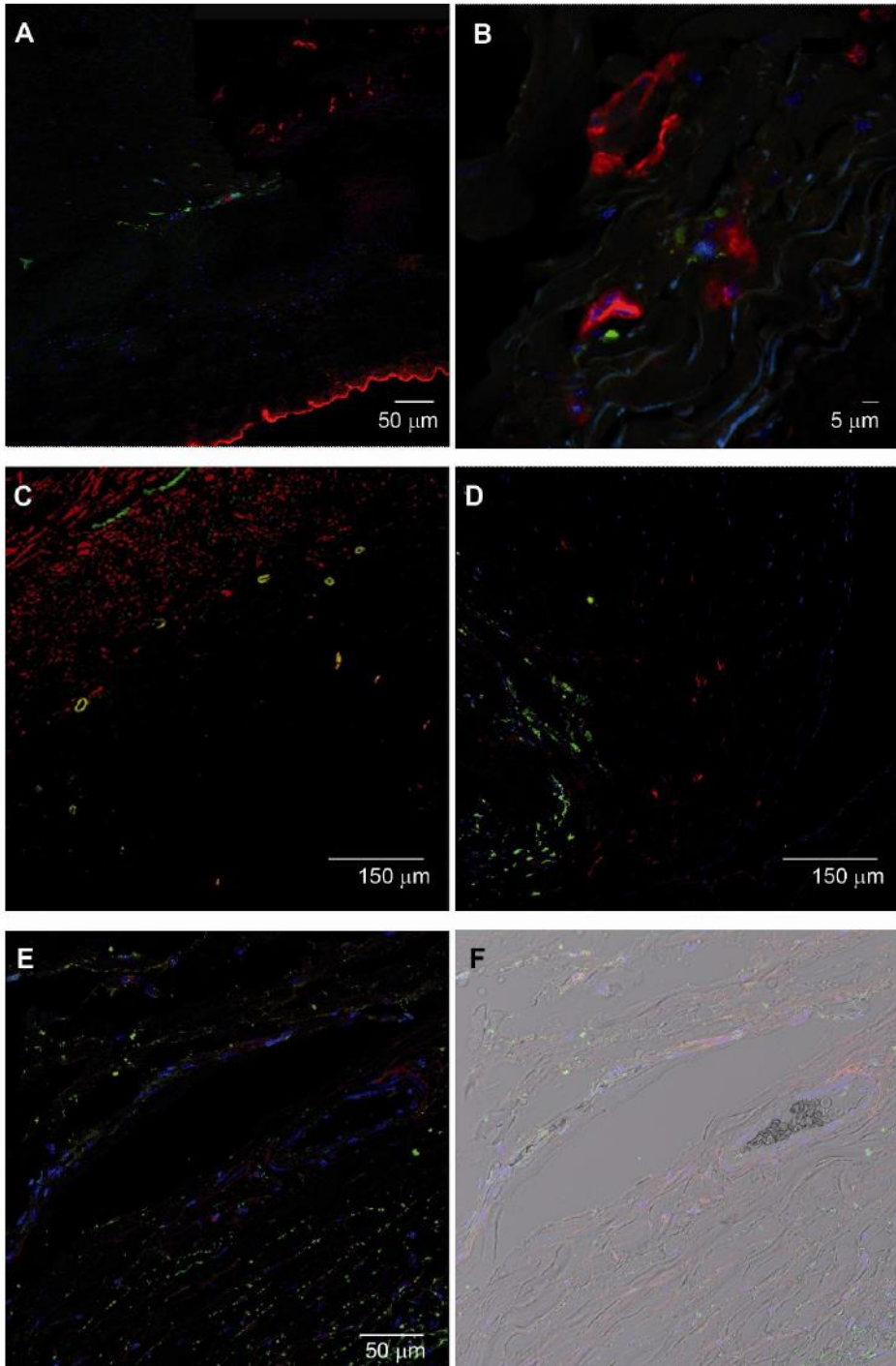
Upper images show a macroscopic view of representative skin tissue 7 days after injection of matrigel plugs, and low panels show macroscopic view of representative matrigel plugs with: (A) Wnt5a silenced mECs; and (B) Wnt5a silenced mECs plus (50nM) TF recombinant protein. Images are representative from 4 animals for each group; original magnification, 10X. (C) Quantification of tube % covered area in skin surrounding the matrigel plugs. Values represent \pm SEM from 4 animals each group. (** $p < 0.01$). (D) Hemoglobin content in Matrigel implants measured by cyanhemoglobin method at 7 days. Data presented as mean \pm SEM from 4 plugs each group. ** $p < 0.01$.

Supplementary Figure S9



Supplementary Figure S9 Role of Monocytes and Wnt5a in endothelial microvessels formed in matrigel plugs *in vivo*. (A) Upper images show a macroscopic view of representative skin tissue 7 days after injection of matrigel plugs, and low panels show macroscopic view of representative matrigel plugs with: mECs, mECs plus monocytes, and mECs plus Wnt5a recombinant protein (200ng/ml). Images are representative from 3 animals for each group; original magnification, 10X. (B) Quantification of tube % covered area in skin surrounding the matrigel plugs. Values represent \pm SEM from 3 animals each group, (** $p < 0.01$). (C) Hemoglobin content in Matrigel implants measured by cyanhemoglobin method at 7 days. Data presented as mean \pm SEM from 3 plugs each group. ** $p < 0.01$.

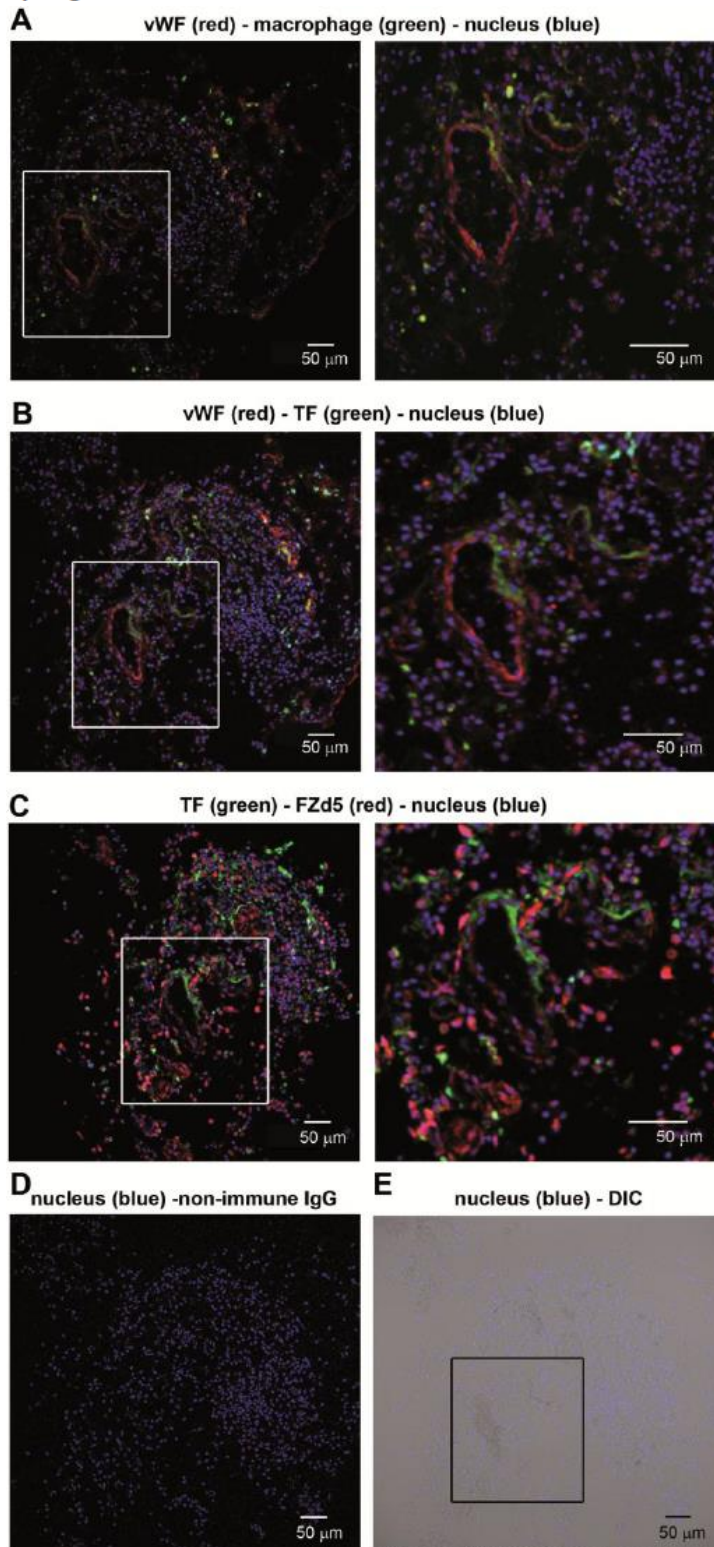
Supplementary Figure S10



RESULTADOS

Supplementary Figure S10 Angiogenesis in atherosclerotic plaques. (A) Human coronary artery atherosclerotic plaque with significant neovascularization and monocytes in the medial and intimal layers. (B) Magnification of neovessel found in A; immunofluorescence staining with antibody against endothelial cells marker (VWF) (red), monocyte-macrophage (green) and Hoechst 33342 dye-labeled nuclei (blue). (C) Magnification of neovessel formation with double immunofluorescence with antibodies against endothelial cells marker (VWF) (red) and TF (green) (colocalization of vWF and TF appears in yellow). (D) Monocytes (green) and Wnt5a (red). (E) TF in endothelial cells (red) and Wnt5a (green). (F) Differential Interface Contrast (DIC) image to show red blood cells into the microvessels (N=3).

Supplementary Figure S11



RESULTADOS

Supplementary Figure S11 Stable blood vessels formed in matrigel plugs in vivo with mECs and monocytes. Left panels show a double immunofluorescence staining of frozen sections with antibodies against: (A) endothelial cells marker (von Willebrand factor) (red), monocyte-macrophage (green) and nucleus were stained with Hoechst 33342 (blue); (B) endothelial cells marker (von Willebrand factor) (red), TF (green) and nucleus (blue); (C) TF (green), FZD5 (red) and nucleus (blue) Right panels show a magnification of the area marked by square in the left panel. (D) Negative control, primary antibody has been substituted with a non-immune IgG, nucleus were stained with Hoechst 33342 (blue). (E) Differential interface contrast (DIC) image, square area shows microvessels full of erythrocytes. Images are representative from 3 animals.

ARTÍCULO IV

“Alternative spliced tissue factor from endothelial cells mediates CD14⁺CD16⁺ monocytes transdifferentiation into endothelial-like cells”

Sonia Espinosa, Gemma Arderiu, Lina Badimon

Cardiovascular Research Center (CSIC-ICCC); Hospital de Sant Pau (UAB) and IIB-Sant Pau, Barcelona, Spain

Estado: Artículo en preparación

RESUMEN

El factor tisular de *splicing* alternativo secretado por células endoteliales media la transdiferenciación de monocitos CD14⁺CD16⁺ a células con fenotipo endotelial.

La principal complicación clínica de la aterosclerosis es la ruptura de la placa. Las causas que llevan a que una placa estable se convierta en vulnerable no se conocen con profundidad, sin embargo, los resultados observados apuntan a que las hemorragias internas que tienen lugar en la placa aterosclerótica podrían ser una causa crucial.

La angiogénesis es el proceso a través del cual se crean nuevos vasos sanguíneos a partir de vasos preexistentes. Durante los procesos angiogénicos, las células endoteliales (CEs) son expuestas a varios factores pro- y anti-angiogénicos.

Cada vez existe una evidencia más clara de que el inicio de la neovascularización está estrechamente relacionado con el reclutamiento y la activación de monocitos y de macrófagos. Nuestro grupo ha demostrado recientemente que los monocitos interactúan con las células endoteliales microvasculares (CEm) a través de Wnt5a secretado por monocitos y su receptor FZD5 expresado en la superficie de las CEm. Esta interacción induce la expresión de factor tisular (FT) y promueve la angiogénesis.

Estudios previos han descrito la existencia de diferentes subpoblaciones de monocitos que ejercen un papel característico en los procesos inflamatorios. En este sentido, todavía no se conoce cuál es la función de los monocitos CD14⁺CD16⁻ y los monocitos CD14⁺CD16⁺ en el contexto de angiogénesis endotelial inducida por el FT.

El objetivo de este estudio fue investigar si el FT, tanto en su forma completa (fITF) como en su forma de *splicing* alternativo (asTF), puede estimular la polarización de las poblaciones de monocitos e inducir la formación de neovasos en CEs.

Los resultados obtenidos indican que la población de monocitos CD14⁺CD16⁺ induce la expresión de FT en sus formas de fITF y asTF, y la liberación de micropartículas positivas de FT (FT⁺-MPs) en CEs. También inducen la expresión de ETS1, de CCL2 y la formación de tubos en estas células, de forma más intensa que la población CD14⁺CD16⁻. Además, los sobrenadantes de cultivos de CEs que sobreexpresan fITF o asTF, produjeron una conversión de los monocitos CD14⁺CD16⁻ a CD14⁺CD16⁺ en 24 horas y una transdiferenciación de los monocitos a células con fenotipo endotelial (*endothelial-like cells, ELCs*) en 10 días, detectado por la expresión de VE-Cadherina, vWF y eNOS, marcadores típicamente endoteliales, y por la formación de estructuras tubulares. Cabe destacar que el tratamiento con asTF tuvo un efecto significativamente mayor en todo el proceso.

En resumen, el asTF secretado por las CEs, comparado con el fITF, induce un incremento mayor de la subpoblación monocitaria CD14⁺CD16⁺ y su transdiferenciación a células con fenotipo endotelial, favoreciendo la formación de tubos. Estos resultados apuntan a que existe una retroalimentación positiva mediada por asTF entre las CEs y los monocitos para estimular la angiogénesis.

**Alternative spliced tissue factor from endothelial cells
mediate CD14⁺CD16⁺ monocytes transdifferentiation into
endothelial-like cells**

Sonia Espinosa, Gemma Arderiu, Lina Badimon
Cardiovascular Research Center (CSIC-ICCC); Hospital de Sant Pau (UAB) and
IIB-Sant Pau, Barcelona, Spain

ABSTRACT

Background: Angiogenesis is a mechanism intimately linked to atherosclerotic plaque instability. Monocytes contribute to plaque neovascularization through interactions with endothelial cells (ECs) and the induction of tissue factor (TF) expression. The role of monocytes subsets in angiogenesis requires further investigations. Monocytes transdifferentiate into endothelial-like cells (ELCs) under angiogenic stimulation. Whether ECs stimulate monocytes-transdifferentiation through TF expression (full length tissue factor (fITF) or alternative spliced tissue factor (asTF)) is still unknown. **Aim:** We studied whether endothelial TF influences monocytes subsets polarization and induces angiogenesis. **Methods:** Tube formation signaling was investigated in microvascular ECs (mECs) co-cultured with isolated CD16⁻ or CD16⁺ monocyte populations by PCR and immunoblotting. Monocytes polarization into ELCs was analyzed by FACS, immunofluorescence and angiogenesis assays. **Results:** Compared to CD16⁻, CD16⁺ monocytes induced higher levels of fITF and asTF expression, and TF-positive microparticles (TF⁺-MPs) release in mECs. This monocyte population was expanded under endothelial fITF or asTF stimulation, becoming ELCs, as indicated by the expression of VE-Cadherin, vWF and eNOS markers and by the capability to form tube-like structures. Interestingly, asTF-enriched medium provoked a significantly higher effect, compared to fITF medium. **Conclusion:** CD16⁺ monocytes induce TF expression in ECs, promoting angiogenesis. fITF and, especially asTF, contribute to CD16⁺ expansion and monocytes differentiation into ELCs, generating a positive feedback crosstalk between ECs and monocytes that may promote neovascularization.

INTRODUCTION

Clinical complications of atherosclerosis are mainly caused by plaque rupture. The reasons that drive a stable atherosclerotic plaque to become vulnerable are still unknown, although intermittent hemorrhages could be one of the leading causes [1].

Angiogenesis is a critical process involved in the response of the organism to ischemic injury, and contribute to tissue revascularization and organ preservation [2]. There is increasing evidence that the initiation of neovascularization in the setting of tissue ischemia is related to the recruitment and activation of monocytes/macrophages within the ischemic tissues [3]. Recruited monocytes may stimulate endothelial cells (ECs) proliferation, differentiation, migration and organization in tubular network in a tightly regulated angiogenic environment [4].

Tissue factor (TF) is the essential initiator of extrinsic blood coagulation. TF plays a multifactorial role in biological processes such as atherogenesis, thrombosis, inflammation and metastasis [5]. TF expression within the vasculature is strictly regulated and normally absent under physiological conditions in ECs [6]. However, TF expression is induced in response to various stimuli, such as inflammation [7]. Recently, we have demonstrated that monocytes induce TF expression in microvascular ECs (mECs) by releasing Wnt5a that activates the Wnt non-canonical pathway in mECs [8].

TF resides mainly on cell surface as full length TF (flTF). Nevertheless, it has been described as a soluble alternatively spliced isoform (asTF) [9] and in microparticles (TF⁺-MPs), constituting the blood-borne TF [10]. asTF upregulates the ECs expression of the adhesion molecules ICAM-1, VCAM-1 and E-selectin, promoting monocytes adhesion and migration into the endothelial layer [11]. Interestingly, van den Berg and colleagues [12] reported that asTF is the most potent TF isoform at triggering angiogenesis, through integrin ligation.

Monocytes are a heterogeneous cell population that differs in size, granularity, nuclear morphology and phenotype. Human monocytes are divided in three subsets, defined mainly by their expression of CD14 (lipopolysaccharide (LPS)

receptor contributor) and CD16 (FcγRIII receptor): “classical” CD14⁺⁺CD16⁻, “intermediate” CD14⁺⁺CD16⁺ and “nonclassical” CD14⁺CD16⁺⁺ [13]. The classical subset (CD16⁻) constitute around 85% of total monocytes and are involved in the phagocytosis of low-density lipoproteins (LDL), and the generation of high quantities of reactive oxygen species (ROS). On the other side, intermediate (around 5%) and nonclassical (approximately 10%) monocytes (CD16⁺) secrete inflammatory cytokines after Toll-like receptor-dependent activation [14, 15].

The heterogeneity of monocytes reflects their plasticity in response to microenvironmental signals [16]. Indeed, preliminary data [17, 18] support that the CD16⁺ subset is increased during inflammatory conditions. Importantly, monocytes could acquire endothelial properties, characterized by specific surface markers of ECs [19], under angiogenic stimulation, becoming endothelial like-cells (ELCs). Several authors have reported ELCs capability to form tubular-like structures *in vitro* [20], and *in vivo* [21], suggesting that they could participate in neovascularization in close relationship with ECs.

The contribution of monocytes to neovascularization remains unclear. Monocytes promote neovessel formation in a paracrine manner [8]; however, it seems that there is a special monocyte-subset contribution [14]. Further investigation on monocytes and ECs crosstalking is crucial to understand the functional role of inflammatory cells in vascular processes. asTF may impact on neovascularization by promoting endothelium-monocyte interaction. In this study, we aimed to investigate whether CD16⁺ subsets of monocytes are able to induce endothelial TF expression and contribute to tube formation through ELCs transdifferentiation.

MATERIAL AND METHODS

Endothelial cell cultures

Immortalized human microvascular endothelial cell line (HMEC-1) [22] from the Center of Disease Control (Atlanta, GA) was used and maintained in MCDB131 media (Life Technologies) supplemented with 10% of Fetal Bovine Serum (FBS), 2mM L-Glutamine (Life Technologies) and 50 mg/ml Gentamicin (Life Technologies).

Monocytes isolation

Regular isolation of human peripheral blood mononuclear cells (PBMC) was performed by gradient centrifugation of human buffy coats from healthy donors over Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare). PBMC were subsequently collected and washed in PBS four times. Cell number and viability were obtained with an equip Multisizer 3 Coulter (Beckham-Coulter). CD16⁺ and CD16⁻ monocytes were separated using magnetic bead sorting (CD16⁺ Isolation Kit, Miltenyi Biotec) following manufacturer's instructions. Cells were seeded on surface-modified polystyrene dishes for enhanced cell attachment (BD Falcon) and cultured in RPMI 1640 (Life Technologies) supplemented with 10% Human Serum A/B and 1% Penicillin/Streptomycin. After 2 hours, cultured monocytes were washed in PBS to remove non-attached cells and fresh medium was added.

Conditioned mediums collection

Monocyte Conditioned Medium (MCM) was collected after 24 hours of monocytes culture, spinned at 300 g, 10 minutes and used immediately. As an indicator of monocytes culture, cells were removed from plates using PBS containing 0.53 mM EDTA and stained with specific PerCP-conjugated mouse monoclonal anti-human-CD14 (Immunostep, dilution 1:10) and analyzed by FACS. For each sample, at least, 10,000 events were acquired on a Coulter Epics XL Flow Cytometer equipped with a 488-nm argon laser (Beckman Coulter). Samples incubated with the same final concentration of isotype-matched antibody were used as a negative control. Data were analyzed with the Expo32 program (Beckman Coulter).

To collect endothelial cell medium, HMEC-1 overexpressing flTF or asTF, obtained as described [23], were cultured in EGM-2 (Lonza). Supernatants were collected at 48 hours, spinned at 127 g, 5 minutes and used immediately.

Wound healing assay

HMEC-1 were seeded on sterile culture dishes and grown on monolayer near to confluence. Then, the monolayer was scratched over the whole plate surface as previously described [8]. Wound repairs were assessed in MCM. After 24 hours, supernatants were collected and processed to isolate microparticles.

Microparticles isolation from endothelial cells

Cell-derived microparticles were obtained by ultracentrifugation of supernatants, washed at 900 g, 15 minutes and pelleted at 20,000 g, 45 minutes. Pellets containing microparticles were resuspended in citrate-PBS 0.32%, pH 7.4 and centrifuged 30 minutes at 16,000 g. MPs concentration was determined using flow cytometry. Isolated MPs were incubated with BD-horizon V450-conjugated annexin V (BD Bioscience, dilution 1:10) combined with FITC-conjugated monoclonal mouse anti-human TF (American Diagnostica, dilution 1:20). Samples were diluted in Annexin Binding Buffer (BD Bioscience) and immediately analyzed with a FACScantoIII™ flow cytometer (BD Bioscience). MPs were identified and quantified based on their FSC/SSC characteristics, according to their size, binding to annexin V and reactivity to cell-specific TF mAb. MPs gate limits were established using a Flow-Check Size Range Calibration Kit (Polysciences) [24]. The lower detection limit was placed as a threshold above the electronic noise of our flow cytometer. To identify TF positive marker events, thresholds were also set based on samples incubated with isotype control. Data were analyzed with FACSDiva™ software (BD Bioscience). The concentration (number of MPs and TF⁺-MPs per μ l of supernatants) was determined according to Nieuwland's procedure [25], based on sample's volume, flow cytometer's flow rate and the number of fluorescence positive events. TF⁺-MPs were defined as elements with a size of 0.1-1 μ m that were positively labelled by specific anti-TF antibody. Particle size was determined by comparison with carboxylate-modified fluorescent

microspheres (FluoSpheres, Molecular Probes). Background cell autofluorescence was assessed by omission of the primary antibody.

Monocytes transdifferentiation into endothelial-like cells

Monocytes were seeded on 10 µg/ml of human fibronectin covered plates with RPMI 1640 (Life Technologies), 10% Human Serum A/B for 2 hours, washed with PBS and cultured in endothelial conditioned medium or in EGM-2 supplemented with human recombinant TF (50 nM), human recombinant CCL2 (50ng/ml) or a cocktail of VEGF (50 ng/ml), bFGF (50 ng/ml) and TNFα (4 ng/ml), as described [19], with 10% Human Serum A/B. Medium was replaced every 48 hours. Cells were used between within 10 days. Images were acquired under 10x objective, digitalized and processed with Leica DMIRE2 microscope attached to a video SPOT Leica-DFC350FX camera. Spindle-shaped cells were counted by using ImageJ software.

FACS Analysis

Monocytes-derived ELCs were removed from plates with PBS/EDTA 0.53 mM. VE-Cadherin, vWF and e-NOS expression was analyzed by FACS. Briefly, cells were stained with PE-conjugated mouse anti-human-VE-Cadherin (eBioscience, dilution 1:20), FITC-conjugated sheep anti-human-vWF (Abcam, dilution 1:20), PE-conjugated mouse anti-eNOS (BD Bioscience, dilution 1:10) and FITC-conjugated mouse anti-human-CD16. eNOS incubation was performed with a kit for cell permeabilization and fixation (Intracell, Immunostep) following manufacturer instructions. For each sample, at least 10,000 events in live gate were acquired on an Epics XL Flow Cytometer equipped with a 488-nm argon laser (Beckman Coulter). Samples incubated with the same final concentration of isotype-matched antibody were used as a negative control. Data were analyzed with the Expo32 program (Beckman Coulter). Percentage of positive events was quantified.

***In vitro* tube formation in conditioned medium**

Tube formation assay was performed as described [26]. ECs and ELCs were seeded on three dimensional basement membrane (3DBM) system (BD Matrigel™, BD Biosciences). ECs were incubated in freshly medium or in MCM for 24 hours and ELCs were incubated in their corresponding endothelial conditioned medium for 24 hours. Nodules, tube length and tube covered area

were analyzed with ImageJ software. Results are expressed as quantity of nodules, tube length and percentage of covered area of tubes.

Cell labelling

HMEC-1 and monocytes co-cultures (1:1) in a 3DBM system were labelled to discriminate each cell type with two different living cell fluorescent membrane dyes, PKH26 and PKH67 Linker for red/green cell labelling and Cell Linker Kit (Sigma-Aldrich), following manufacturer's indications. Cells movements were monitored by time lapse video microscopy at 10 minutes-intervals for 24 hours. Images were acquired on a Leica inverted fluorescence confocal microscope (Leica TCS SP2-AOBS, Germany).

Immunocytochemistry

Cultures fixed in 4% paraformaldehyde solution were incubated with primary antibody rabbit anti-human-vWF (1:50) (Dako, #A0082) for 1 hour. Nuclei were counterstained with Hoechst 33342. Appropriated secondary antibodies were added for 1 hour and stained cells were washed and covered with Prolong Gold antifade reagent (Molecular Probes). Controls were stained only with secondary antibody. Images of immunostained sections were recorded on a Leica inverted fluorescence confocal microscope (Leica TCS SP2-AOBS, Germany).

RNA and protein extraction from 3DBM cultures

Cells grown in matrigel were isolated and washed with cold PBS without Ca^{2+} and Mg^{2+} , containing 5 mM EDTA, as described [26]. Cells were scraped and incubated for 45 minutes on ice with 15 ml cold PBS/EDTA in a centrifuge tube. Then, tubes were centrifuged at 120 g, for 4 minutes and the pellet was resuspended in appropriate lysis buffer for RNA or protein isolation.

Real Time PCR

Total RNA from cultures was isolated with the RNeasy isolation kit (Qiagen) according to manufacturer's instructions. Reverse transcripts were obtained with High Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems) with random primers. Assays-on-Demand™ (Applied Biosystems) of TaqMan™ fluorescent real-time PCR primers were used for TF (Hs00175225_m1), ETS-1 (Hs00428287_m1), CCL2 (Hs00234140_m1), CCR2 (Hs00174150_m1). asTF and flTF forward and reverse primers and probe sequence described by Szotowski *et al.* [27] were purchased in IDT. GAPDH (4326317E) from Applied Biosystems was used as endogenous control.

Western blot analysis

Protein was extracted from total cell lysates using RIPA-buffer (50 mM Tris-HCl pH8; 150 mM NaCl; 1% NP-40; 0.5% sodium Deoxycholate; 0.1% SDS). Protein concentrations were measured with BCA™ protein assay reagent (Pierce). 25 µg of protein samples were separated by 10% SDS-PAGE gels. Then, they were transferred onto nitrocellulose membranes. After blocking for non-specific binding with 5% Albumin Bovine Fraction V (MP Biomedical), membranes were incubated with: a polyclonal anti-TF antibody (American Diagnostica, #4501, dilution 1:1000); monoclonal anti-ETS-1 antibody (Abcam, #1G11, dilution 1:500); monoclonal anti-CCL2/MCP-1 antibody (R&D Systems, dilution 1:250); polyclonal anti-Frizzled 5 antibody (Abcam, #ab75234, dilution 1:1000), monoclonal anti-Wnt5a antibody [3D10] (Abcam, #ab86720, dilution 1:500); polyclonal anti-CCR2 antibody (Abcam, dilution 1:1000) followed by rabbit anti-goat-HRP (1:10000), rabbit anti-mouse-HRP (1:10000) or goat anti-rabbit-HRP (1:10000), according to convenience. Then membranes were stripped, blocked again and treated with a polyclonal anti-β-actin antibody (Abcam, #ab8227, 0.2 µg/ml), followed by rabbit anti-mouse-HRP (1:10000) or goat anti-rabbit-HRP (1:10000), depending on the requirements. Membranes were washed to remove excess of antibodies and blots were revealed by ECL systems (Amersham Biosciences). Band densities were analyzed with the ChemiDoc XRS™ system (Bio Rad) in chemiluminescence detection modus and with Quantity-One software (Bio Rad).

Statistical analysis

Results were expressed as Mean \pm Standard Error of the mean (SEM). The number of experiments is shown in every case in the figure legends. Values were tested for statistical differences by the parametric analysis of variance T-Student or ANOVA for independent measures and the Tukey HSD *post hoc* test. The statistical software package IBM®SPSS Statistics 22 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) was used for statistical analyses. Differences were considered statistically significant for $p < 0.05$.

RESULTS

TF/ETS-1/CCL2 signaling pathway stimulation in microvascular endothelial cells by monocytes conditioned medium

We tried to elucidate whether monocytes secretome stimulate TF/ETS1/CCL2 signaling pathway and tube formation in mECs. We studied the effect of MCM on the TF, ETS-1 and CCL2 expression in mECs cultured in 3DBM system. We analyzed mRNA levels at 2 hours and observed induction of flTF, asTF, ETS-1 and CCL2 expression (Figure 1A). Western blots showed an increment in TF protein expression at 4 hours, and in ETS-1 expression at 4 and 24 hours (Figure 1B). In addition, MCM promoted TF⁺-MPs release of mECs (Figure 1C). To guarantee that TF⁺-MPs detected were released by mECs, we quantified TF⁺-MPs in MCM at 24 hours.

Monocytes stimulate angiogenesis in mECs through induction of TF/ETS-1/CCL2 signaling pathway.

Particular roles for monocyte subsets in endothelial angiogenesis

We studied the effect of monocytes subset on endothelial angiogenesis. We separated CD16⁺ expressing monocytes (CD16⁺), which includes intermediate and nonclassical subsets, from classical monocytes (CD16⁻) and co-cultured them with mECs on 3DBM system. We observed an increment of endothelial tube formation when mECs were cultured with CD16⁺, since nodules, tube length and covered area of tubes were significantly higher than controls. Although CD16⁻ seemed to induce tube formation as well, it was not statistically significant (Figure 2A). Then, we studied FDZ5 expression and TF/ETS-1/CCL2 signaling pathway in mECs co-cultured with separated CD16⁻ or CD16⁺ populations of monocytes. CD16⁺ induced an increase of mRNA levels of flTF, asTF, ETS-1 and CCL2. CD16⁻ only induced asTF and CCL2 expression (Figure 2B). Protein levels of FZD5, TF and ETS-1 were also significantly increased in ECs in CD16⁺ presence (Figure 2C). TF⁺-MPs releases from ECs in MCM from CD16⁻ (MCM-) or CD16⁺ (MCM+) were also analyzed. Cells released significantly higher amount of TF⁺-MPs after MCM+ stimulation (Figure 2D).

These results show that CD16⁺ monocytes have a main role in endothelial angiogenesis, compared to CD16⁻, probably through the induction of TF/ETS-1/CCL2 signaling pathway.

Monocytes subset expansion under endothelial induction

We analyzed how the endothelial secretions could affect monocytes subsets plasticity. We used the media of 48 hours of ECs cultures overexpressing fITF or asTF to treat monocytes, then, we studied their profile expression. PCR analysis showed that both fITF and asTF-enriched endothelial release increased TF, Wnt5a and CCL2 but decreased CCR2 mRNA levels (Figure 3A). Immunoblotting of separated subsets showed that both endothelial releases modified monocytes protein profiles. TF was significantly increased in CD16⁻ and CD16⁺ monocytes in presence of fITF or asTF-enriched medium. Wnt5a expression was higher with fITF or asTF treatments comparing to controls. In comparison with CD16⁻, CD16⁺ cells presented significantly higher levels of Wnt5a, CCL2 was significantly increased in fITF or asTF CD16⁺ treated cells, and CCR2, on the opposite, presented a significantly lower (Figure 3B).

We cultured monocytes in endothelial fITF or asTF-enriched secretome and analyzed CD16 expression with FACS at different times and doses (Figure 3C). Results showed that endothelial fITF and asTF releases expanded CD16⁺ monocytes population since 12 hours of culture. The increment was adjusted to a dose-dependent effect. However, asTF effect was significantly higher than fITF.

Monocytes transdifferentiation into endothelial-like cells

ELCs were obtained from isolated monocytes cultured on fibronectin coated dishes with EGM-2 medium supplemented with 50 nM of recombinant soluble TF (rTF) or 50 ng/ml of recombinant CCL2 (rCCL2). We used a supplemented cultured with TNF α (10 μ g/ml), VEGF (100 μ g/ml) and bFGF (10 μ g/ml) as a positive control of angiogenic stimulation and RPMI fresh medium as negative control. Panels from figure 4A show the morphology of monocytes under each treatment at 10 days of culture. Negative control presented macrophages morphology. rCCL2 and positive control showed ELCs as single cells or clusters and sprouts of spindle shaped cells. rTF supplemented cultures presented

highly significant amount of spindle cells comparing controls. Next, we evaluated the expression of the endothelial markers VE-Cadherin, vWF and eNOS of monocytes after 10 days of angiogenic stimulation by FACS (Figure 4B). rTF, rCCL2 and positive control samples presented increased levels of the three markers compared to macrophages. In addition, rTF significantly increased the expression of VE-Cadherin of the cells compared to positive control. On the other hand, rCCL2 supplemented samples presented significantly lower expression of eNOS than positive control.

To further corroborate these results, we analyzed the expression of vWF with confocal microscopy. Clusters of high vWF-expression (around 15%) were detected in ELCs treated with rTF, meanwhile it was undetectable in controls and rCCL2 supplemented cultures (Figure 4C).

Moreover, tube-like structures were detected in monocytes cultured in a 3DBM system with fTF or asTF-enriched medium from mECs. Well-developed zones of neovascularization were observed in asTF-treated cultures (Figure 4D). We also observed significant differences in number of nodules, tube length and covered area from tubes formed in asTF treatment in comparison to control.

These results indicate that monocytes transdifferentiate into ELCs under endothelial TF released stimulation. asTF has stronger effect on this stimulation than regular fTF.

In an effort to elucidate the role of CD16⁻ and CD16⁺ monocytes in endothelial angiogenesis, we transdifferentiated CD16⁻ and CD16⁺ isolated monocytes into ELCs under fTF or asTF-enriched endothelial secretome. Figure 5A and B show morphology of cells at 3 and 10 days of culture. Since the third day, it could be observed outgrowth colonies (arrows in Figure 5A) and cobblestone morphology of colonized cells, especially in asTF treatment. In addition, at tenth day, we analyzed the quantity of spindle-shaped cells, obtaining significantly higher values in CD16⁺-derived cells with asTF-enriched medium. Furthermore, we evaluated the expression of VE-Cadherin, vWF and eNOS of these cells (Figure 6) by FACS. CD16⁻ population increased significantly in the VE-Cadherin and vWF expression under asTF endothelial treatment. CD16⁺

RESULTADOS

cells also increased its expression of VE-Cadherin, vWF and eNOS under asTF treatment and VE-Cadherin expression under fITF treatment.

Thus, CD16⁺ monocytes have higher capability to transdifferentiate into ELCs than CD16⁻, and that asTF contributes to this differentiation more intensively than fITF.

DISCUSSION

During atherosclerotic plaque generation, inflammatory cell infiltration, endothelial activation and high levels of LDL promote plaque neovascularization [28]. New capillaries formed in atherosclerotic plaques may promote intermittent hemorrhages which abruptly induce inflammation and trigger plaque instability [1, 29]. Monocytes are actively recruited to atherosclerotic lesions. They are considered pro-inflammatory cells, due to their production of a wide range of cytokines, chemokines and ROS that promote oxidation of LDL and activation of ECs. Activated ECs, in turn, interact with monocytes, resulting in a vicious cycle of self-activation [30]. Monocytes-mECs interactions play a key role in the innate inflammatory response, thrombosis and development of atherosclerotic lesions [31].

ECs are significantly influenced by inflammatory leukocytes that release angiogenic factors such as VEGF, HGF, TNF α , IL-8, among others [32]. In this study, our results show that secretome of monocytes stimulate endothelial TF/ETS-1/CCL2 pathway as well as angiogenesis process. We have previously demonstrated that monocytes secrete Wnt5a that binds to FZD5 of mECs and activates Wnt non-canonical pathway, inducing TF expression and tube formation [8]. Previous data support that TF expression in mECs signals through ETS-1 upregulation and activation, that triggers CCL2 release, which stabilize new microvessels formed [33]. In addition, vulnerable plaques are also characterized by increased levels of TF from infiltrated macrophages [34]. Marumo T. and colleagues [35] reported that macrophages express VEGF, that activates the production of CCL2 in ECs and increase the permeability of endothelial layer.

Monocytes are a heterogeneous cell population. It has been reported that monocyte subsets possess distinct cell surface markers and functional characteristics relevant to their contribution to angiogenesis [36]. Although there are controversial results, it is well established that CD16⁺ population have a role in advanced inflammation-mediated intraplaque angiogenesis, due to their increasing proportions in patients with coronary artery disease and myocardial infarctions [37, 38]. Moreover, CD14⁺CD16⁺⁺ are low in healthy individuals but increases after vascular injury and CD14⁺⁺CD16⁺ present a gene expression profile linked to angiogenesis [39]. CD16⁺ population has been related to the up-regulation of inflammatory cytokines [40, 41]. Accordingly,

here, we reported that CD16⁺ subsets of monocytes are better inducers of TF, ETS-1 and CCL2 expression and tube formation than CD16⁻. Current results showed an increase in FZD5, TF, ETS-1 and CCL2 endothelial gene expression and protein level when mECs were in contact with monocytes. Interestingly, co-cultures of ECs-CD16⁺ presented higher stimulation than co-cultures of ECs-CD16⁻.

Furthermore, TF could be found on cell surface as full length isoform (flTF) and in circulation as soluble (asTF) or in microparticles (TF⁺-MPs). We observed that mECs stimulated with CD16⁺ monocytes presented higher expression of flTF and asTF, and release higher quantities of TF⁺-MPs. CD16⁺ monocytes are great producers of CCL2 and present poor levels of CCR2. On the other side, CD16⁻ monocytes express high levels of CCR2 but low levels of CCL2 [42-44]. Our analysis of monocytes mRNA and protein profile under endothelial flTF or asTF stimulation showed an increase of the CD16⁺ monocyte marker CCL2, while CD16⁻ monocytes marker CCR2 decreased, suggesting a conversion from CD16⁻ into CD16⁺. In addition, TF and Wnt5a monocyte expression also increased, suggesting a higher contribution in the angiogenic process.

Classical monocytes typically differentiate into M1 macrophages, while non-classical monocytes differentiate into M2. However, discrepancies in types and functions of macrophages in tumor microenvironment have suggested that classical monocytes-derived M1 macrophages could polarize into M2 in tumor tissue [45]. Recently, it has been reported that classical monocytes could be precursors of M2 macrophages too [46]. In view of these data and the reported expansion of CD16⁺ population of monocytes in vascular injury, we analyzed the alterations in monocyte subsets proportions under endothelial stimulation. Our results confirmed that classical monocytes polarize into CD16⁺ expression through time, adjusting to a dose-dependent response. Moreover, in accordance with Bogdanov and colleagues [9], asTF-enriched secretome had higher significant effects than flTF medium, suggesting that asTF is principally involved in angiogenic signaling.

Monocytes and macrophages display high plasticity [47, 48]. In the last years, it has been reported that monocytes are capable to transdifferentiate into ELCs under angiogenic conditions [49]. However, the preferential differentiation of certain monocyte populations has been suggested but needs further evidence [50]. Indeed, the role of the microenvironment and local

factors in driving monocyte differentiation also need to be further elucidated. Considering our previous results, we cultured monocytes with soluble recombinant proteins CCL2 and TF, as the products released by mECs stimulated with monocytes presence. We used as positive control VEGF, bFGF and TNF α , as described Fernandez Pujol and colleagues [19]. Soluble rTF induced significantly monocytes transdifferentiation into ELCs, detected by the quantity of spindle-shaped cells and the expression of VE-cadherin, vWF and e-NOS endothelial markers.

It has been reported that circulating TF, constituted by TF⁺-MPs and asTF, could be more procoagulant and angiogenic than the flTF form [9]. To further investigate the role of endothelial TF release on monocyte subsets, we culture isolated monocytes subsets in flTF or asTF-enriched medium from mECs cultures. Our results demonstrated that monocytes formed small aggregates under flTF and asTF at first days of culture; then, after 10 days of endothelial stimulation, these cells acquired spindle shape and presented endothelial markers expression. It is worth of noting that CD16⁺ subsets of monocytes presented higher quantity of colonies and spindle-shaped cells than classical monocytes, and in most cases, higher endothelial-markers expression, particularly when they were culture in medium rich with endothelial asTF release. Moreover, when we cultured ELCs-derived monocytes in a 3DBM system in flTF or asTF-enriched medium, we observed that ELCs formed tube-like structures under asTF stimulation.

asTF impact on atherosclerosis by promoting endothelium-monocyte interaction and by including plaque-destabilizing capillaries [51]. Here, we identified asTF as a clue signal molecule to lead ELCs transformation and angiogenesis. In this study, we demonstrated for the first time that CD16⁺ monocyte subsets highly potentiate endothelial TF signaling pathway, which, in turn, promotes CD16⁺ expansion and differentiation into ELCs. We defend that CD16⁺ monocytes, compared to CD16⁻ subset, have a main role in leading endothelial angiogenesis. In addition, mECs signal monocytes subsets transdifferentiation through releasing asTF, suggesting that a positive feedback cycle of angiogenesis stimulation could be mediate between monocytes and mECs through TF.

REFERENCES

1. Virmani, R., et al., *Atherosclerotic plaque progression and vulnerability to rupture: angiogenesis as a source of intraplaque hemorrhage*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005. **25**(10): p. 2054-61.
2. Carmeliet, P., *Angiogenesis in health and disease*. *Nat Med*, 2003. **9**(6): p. 653-60.
3. Capoccia, B.J., A.D. Gregory, and D.C. Link, *Recruitment of the inflammatory subset of monocytes to sites of ischemia induces angiogenesis in a monocyte chemoattractant protein-1-dependent fashion*. *J Leukoc Biol*, 2008. **84**(3): p. 760-8.
4. Bouchentouf, M., et al., *Monocyte derivatives promote angiogenesis and myocyte survival in a model of myocardial infarction*. *Cell Transplant*, 2010. **19**(4): p. 369-86.
5. Lopez-Pedreria, C., et al., *Tissue factor as an effector of angiogenesis and tumor progression in hematological malignancies*. *Leukemia*, 2006. **20**(8): p. 1331-40.
6. Drake, T.A., J.H. Morrissey, and T.S. Edgington, *Selective cellular expression of tissue factor in human tissues. Implications for disorders of hemostasis and thrombosis*. *Am J Pathol*, 1989. **134**(5): p. 1087-97.
7. Napoleone, E., A. Di Santo, and R. Lorenzet, *Monocytes upregulate endothelial cell expression of tissue factor: a role for cell-cell contact and cross-talk*. *Blood*, 1997. **89**(2): p. 541-9.
8. Arderiu, G., et al., *Monocyte-secreted Wnt5a interacts with FZD5 in microvascular endothelial cells and induces angiogenesis through tissue factor signaling*. *J Mol Cell Biol*, 2014. **6**(5): p. 380-93.
9. Bogdanov, V.Y., et al., *Alternatively spliced human tissue factor: a circulating, soluble, thrombogenic protein*. *Nat Med*, 2003. **9**(4): p. 458-62.
10. Lechner, D. and A. Weltermann, *Circulating tissue factor-exposing microparticles*. *Thromb Res*, 2008. **122 Suppl 1**: p. S47-54.
11. Srinivasan, R., et al., *Splice variants of tissue factor promote monocyte-endothelial interactions by triggering the expression of cell adhesion molecules via integrin-mediated signaling*. *J Thromb Haemost*, 2011. **9**(10): p. 2087-96.
12. van den Berg, Y.W., et al., *Alternatively spliced tissue factor induces angiogenesis through integrin ligation*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009. **106**(46): p. 19497-502.
13. Ziegler-Heitbrock, L., et al., *Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood*. *Blood*, 2010. **116**(16): p. e74-80.
14. Hristov, M. and G.H. Heine, *Monocyte subsets in atherosclerosis*. *Hamostaseologie*, 2014. **35**(1).

15. Hristov, M. and C. Weber, *Differential role of monocyte subsets in atherosclerosis*. *Thromb Haemost*, 2011. **106**(5): p. 757-62.
16. Mantovani, A., et al., *The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization*. *Trends Immunol*, 2004. **25**(12): p. 677-86.
17. Chuluundorj, D., et al., *Expansion and preferential activation of the CD14(+)CD16(+) monocyte subset during multiple sclerosis*. *Immunol Cell Biol*, 2014. **92**(6): p. 509-17.
18. Mysliwska, J., et al., *Expansion of CD14+CD16+ monocytes producing TNF-alpha in complication-free diabetes type 1 juvenile onset patients*. *Cytokine*, 2012. **60**(1): p. 309-17.
19. Fernandez Pujol, B., et al., *Endothelial-like cells derived from human CD14 positive monocytes*. *Differentiation*, 2000. **65**(5): p. 287-300.
20. Schmeisser, A., et al., *Monocytes coexpress endothelial and macrophagocytic lineage markers and form cord-like structures in Matrigel under angiogenic conditions*. *Cardiovasc Res*, 2001. **49**(3): p. 671-80.
21. Moldovan, N.I., et al., *Contribution of monocytes/macrophages to compensatory neovascularization: the drilling of metalloelastase-positive tunnels in ischemic myocardium*. *Circ Res*, 2000. **87**(5): p. 378-84.
22. Ades, E.W., et al., *HMEC-1: establishment of an immortalized human microvascular endothelial cell line*. *J Invest Dermatol*, 1992. **99**(6): p. 683-90.
23. Arderiu, G., E. Pena, and L. Badimon, *Angiogenic microvascular endothelial cells release microparticles rich in tissue factor that promotes postischemic collateral vessel formation*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2015. **35**(2): p. 348-57.
24. Lacroix, R., et al., *Standardization of platelet-derived microparticle enumeration by flow cytometry with calibrated beads: results of the International Society on Thrombosis and Haemostasis SSC Collaborative workshop*. *J Thromb Haemost*, 2010. **8**(11): p. 2571-4.
25. Nieuwland, R., et al., *Cellular origin and procoagulant properties of microparticles in meningococcal sepsis*. *Blood*, 2000. **95**(3): p. 930-5.
26. Arderiu, G., et al., *HoxA5 stabilizes adherens junctions via increased Akt1*. *Cell Adh Migr*, 2007. **1**(4): p. 185-95.
27. Szotowski, B., et al., *Alterations in myocardial tissue factor expression and cellular localization in dilated cardiomyopathy*. *J Am Coll Cardiol*, 2005. **45**(7): p. 1081-9.
28. Jain, R.K., et al., *Antiangiogenic therapy for normalization of atherosclerotic plaque vasculature: a potential strategy for plaque stabilization*. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*, 2007. **4**(9): p. 491-502.
29. Kolodgie, F.D., et al., *Intraplaque hemorrhage and progression of coronary atheroma*. *N Engl J Med*, 2003. **349**(24): p. 2316-25.

30. Pamukcu, B., et al., *The role of monocytes in atherosclerotic coronary artery disease*. Ann Med, 2010. **42**(6): p. 394-403.
31. Ross, R., *Atherosclerosis--an inflammatory disease*. N Engl J Med, 1999. **340**(2): p. 115-26.
32. Jaipersad, A.S., et al., *The role of monocytes in angiogenesis and atherosclerosis*. J Am Coll Cardiol, 2014. **63**(1): p. 1-11.
33. Arderiu, G., et al., *Ets-1 transcription is required in tissue factor driven microvessel formation and stabilization*. Angiogenesis, 2012. **15**(4): p. 657-69.
34. Moons, A.H., M. Levi, and R.J. Peters, *Tissue factor and coronary artery disease*. Cardiovasc Res, 2002. **53**(2): p. 313-25.
35. Marumo, T., V.B. Schini-Kerth, and R. Busse, *Vascular endothelial growth factor activates nuclear factor-kappaB and induces monocyte chemoattractant protein-1 in bovine retinal endothelial cells*. Diabetes, 1999. **48**(5): p. 1131-7.
36. Czepluch, F.S., et al., *In vitro and in vivo effects of human monocytes and their subsets on new vessel formation*. Microcirculation, 2014. **21**(2): p. 148-58.
37. Rogacev, K.S., et al., *Monocyte heterogeneity in obesity and subclinical atherosclerosis*. Eur Heart J, 2010. **31**(3): p. 369-76.
38. Wildgruber, M., et al., *Monocyte subset dynamics in human atherosclerosis can be profiled with magnetic nano-sensors*. PLoS One, 2009. **4**(5): p. e5663.
39. Kowal, K., et al., *Allergen challenge differentially affects the number of circulating monocyte subsets*. Scand J Immunol, 2012. **75**(5): p. 531-9.
40. Schlitt, A., et al., *CD14+CD16+ monocytes in coronary artery disease and their relationship to serum TNF-alpha levels*. Thromb Haemost, 2004. **92**(2): p. 419-24.
41. Tapp, L.D., et al., *The CD14++CD16+ monocyte subset and monocyte-platelet interactions in patients with ST-elevation myocardial infarction*. J Thromb Haemost, 2012. **10**(7): p. 1231-41.
42. Shantsila, E., et al., *Monocyte subsets in coronary artery disease and their associations with markers of inflammation and fibrinolysis*. Atherosclerosis, 2014. **234**(1): p. 4-10.
43. Ancuta, P., et al., *Fractalkine preferentially mediates arrest and migration of CD16+ monocytes*. J Exp Med, 2003. **197**(12): p. 1701-7.
44. Ancuta, P., J. Wang, and D. Gabuzda, *CD16+ monocytes produce IL-6, CCL2, and matrix metalloproteinase-9 upon interaction with CX3CL1-expressing endothelial cells*. J Leukoc Biol, 2006. **80**(5): p. 1156-64.
45. Italiani, P. and D. Boraschi, *From Monocytes to M1/M2 Macrophages: Phenotypical vs. Functional Differentiation*. Front Immunol, 2014. **5**: p. 514.

46. Movahedi, K., et al., *Different tumor microenvironments contain functionally distinct subsets of macrophages derived from Ly6C(high) monocytes*. *Cancer Res*, 2010. **70**(14): p. 5728-39.
47. Ashhurst, T.M., et al., *The plasticity of inflammatory monocyte responses to the inflamed central nervous system*. *Cell Immunol*, 2014. **291**(1-2): p. 49-57.
48. Tarique, A.A., et al., *Phenotypic, Functional and Plasticity Features of Classical and Alternatively Activated Human Macrophages*. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2015.
49. Sharifi, B.G., et al., *Pleiotrophin induces transdifferentiation of monocytes into functional endothelial cells*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2006. **26**(6): p. 1273-80.
50. Terry, R.L. and S.D. Miller, *Molecular control of monocyte development*. *Cell Immunol*, 2014. **291**(1-2): p. 16-21.
51. Kocaturk, B. and H.H. Versteeg, *Tissue factor isoforms in cancer and coagulation: may the best isoform win*. *Thromb Res*, 2012. **129 Suppl 1**: p. S69-75.

Figure 1

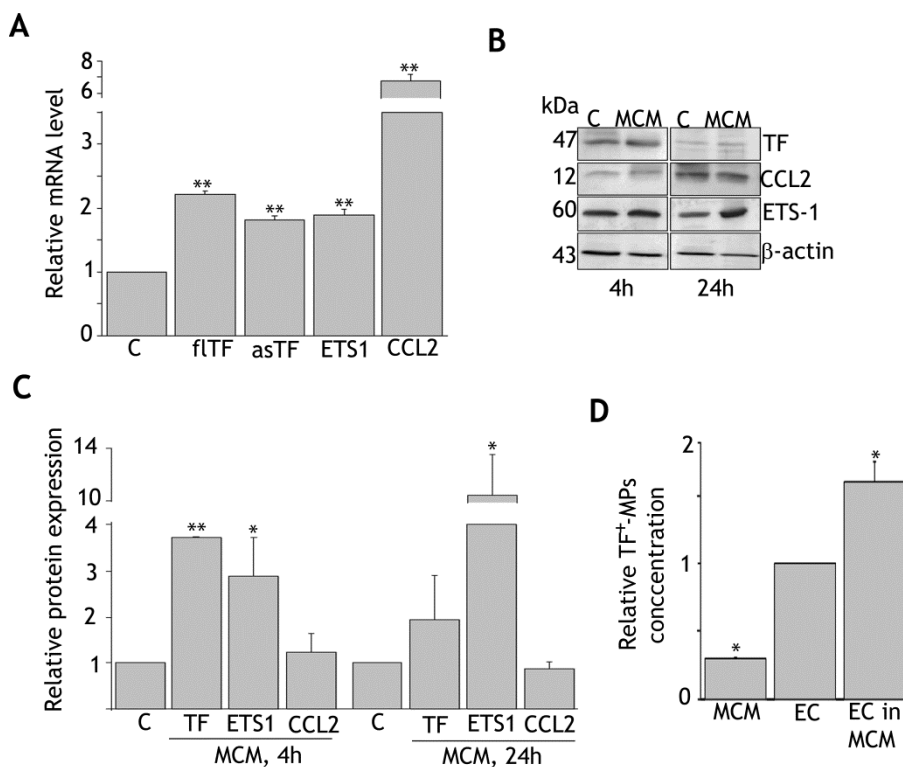


Figure 1. Angiogenic signalling pathway stimulation by monocytes. A) mRNA levels of flTF, asTF, ETS-1 and CCL2 of mECs in MCM. **B and C)** Blots and relative levels of TF, ETS-1 and CCL2 protein expression in mECs at 4 and 24 hours. **D)** Relative levels of TF⁺-MPs concentration of mECs cultivated in MCM stimulation. Experiments were done per triplicate. Values are represented as mean \pm SEM (* p <0.05, ** p <0.005).

Figure 2

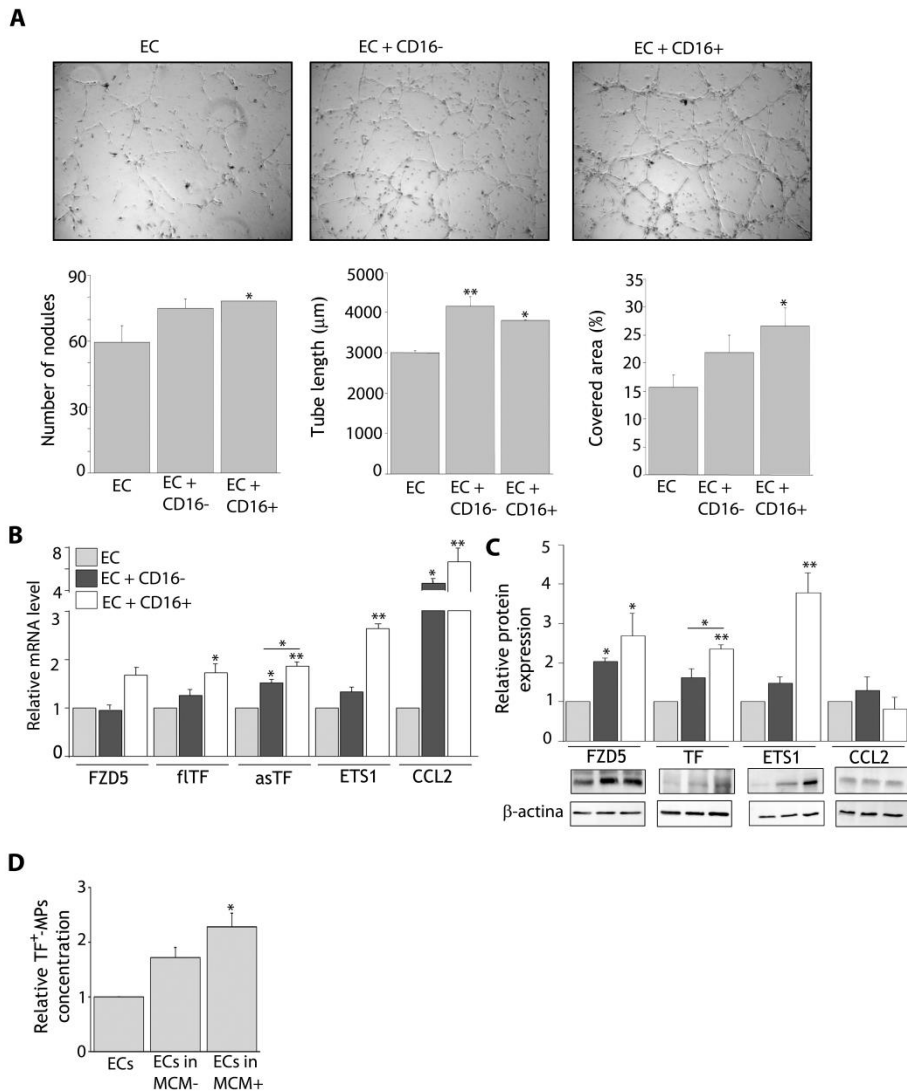


Figure 2. Effect of separated subsets of monocytes in endothelial angiogenesis. A) Phase contrast micrographs show morphology of tube-like structures of mECs in absence/presence of monocytes CD16⁻ or CD16⁺. Histograms show number of nodules, tube length and percentage of covered area. Results are represented as mean ± SEM from three independent experiments (*p<0.05, **p<0.005). **B)** mRNA levels of mECs in co-culture with monocytes CD16^{-/+}. **C)** Protein levels of expression of FZD5, TF, ETS1 and CCL2 of mECs cultivated with separated monocytes populations. **D)** Relative endothelial TF⁺-MPs concentrations after 24 hours of mECs migration in MCM from CD16^{-/+}.

Figure 3

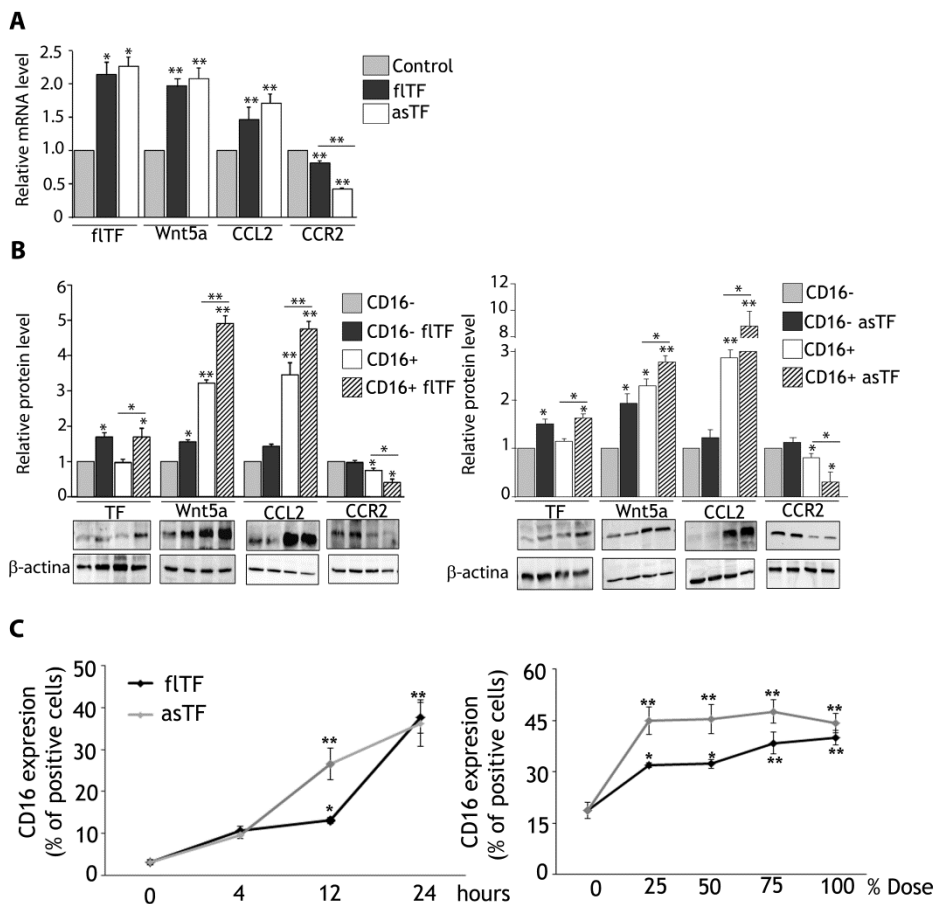


Figure 3. CD16+ expansion under mECs stimulation. A) mRNA levels of TF, Wnt5a, CCL2 and CCR2 in monocytes cultured with supernatants of mECs overexpressing fITF and asTF. **B)** Protein levels of separated monocytes subsets in endothelial fITF or asTF treatment from mECs. Experiments were done per triplicate. **C)** CD16+ expansion through time and in different doses of endothelial fITF and asTF from overexpressing mECs supernatants (n = 5). Results are expressed as mean ± SEM (*p<0.05, **p<0.005).

Figure 4

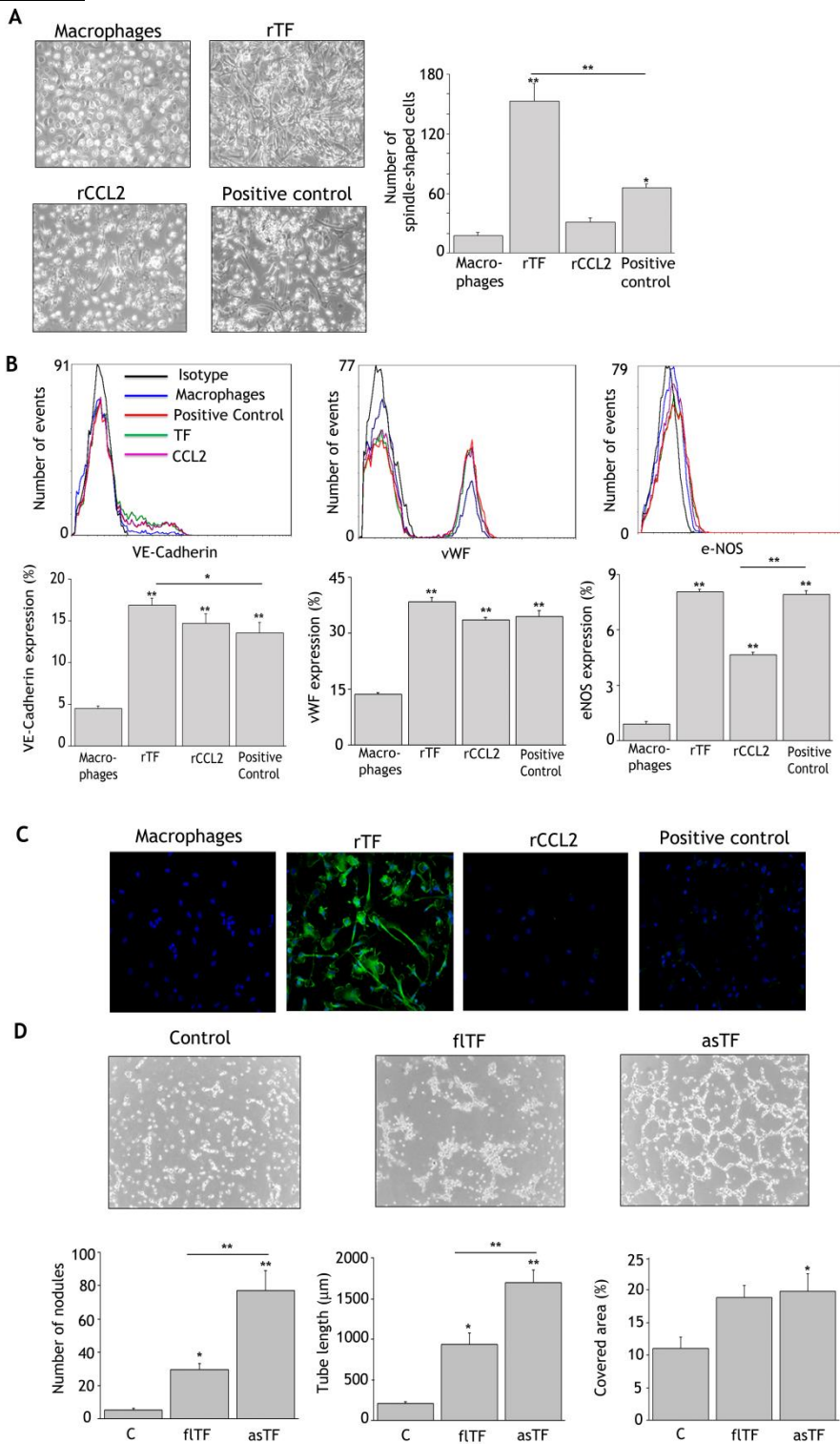


Figure 4. ELCs derived from monocytes in supplemented cultures of recombinant TF or CCL2. Tube-like structures of ELCs in TF or asTF-enriched medium from mECs. A) Phase contrast micrographs show morphology of ELCs after 10 days of corresponding stimulation. We used a culture of macrophages as negative control and a culture of monocytes in presence of TNF α , VEGF and bFGF, as positive control. Histogram shows spindle-shaped counting of cells from captured images (n = 3). Values are represented as mean \pm SEM (*p<0.05, **p<0.005). Legend: rTF, human recombinant TF protein; rCCL2, human recombinant CCL2 protein. **B)** Percentage of positive cells expressing VE-Cadherin, vWF and e-NOS from these cultures. Histograms show the expression from three independent experiments. Values are represented as mean \pm SEM (*p<0.05, **p<0.005). **C)** Panels show immunohistochemistry of ELCs with anti-vWF antibody. **D)** Tube formation of ELCs in conditioned medium rich in TF or asTF from mECs. Histograms show number of nodules, tube length and percentage of covered area by tubes. Results are expressed as mean \pm SEM (*p<0.05, **p<0.005).

Figure 5

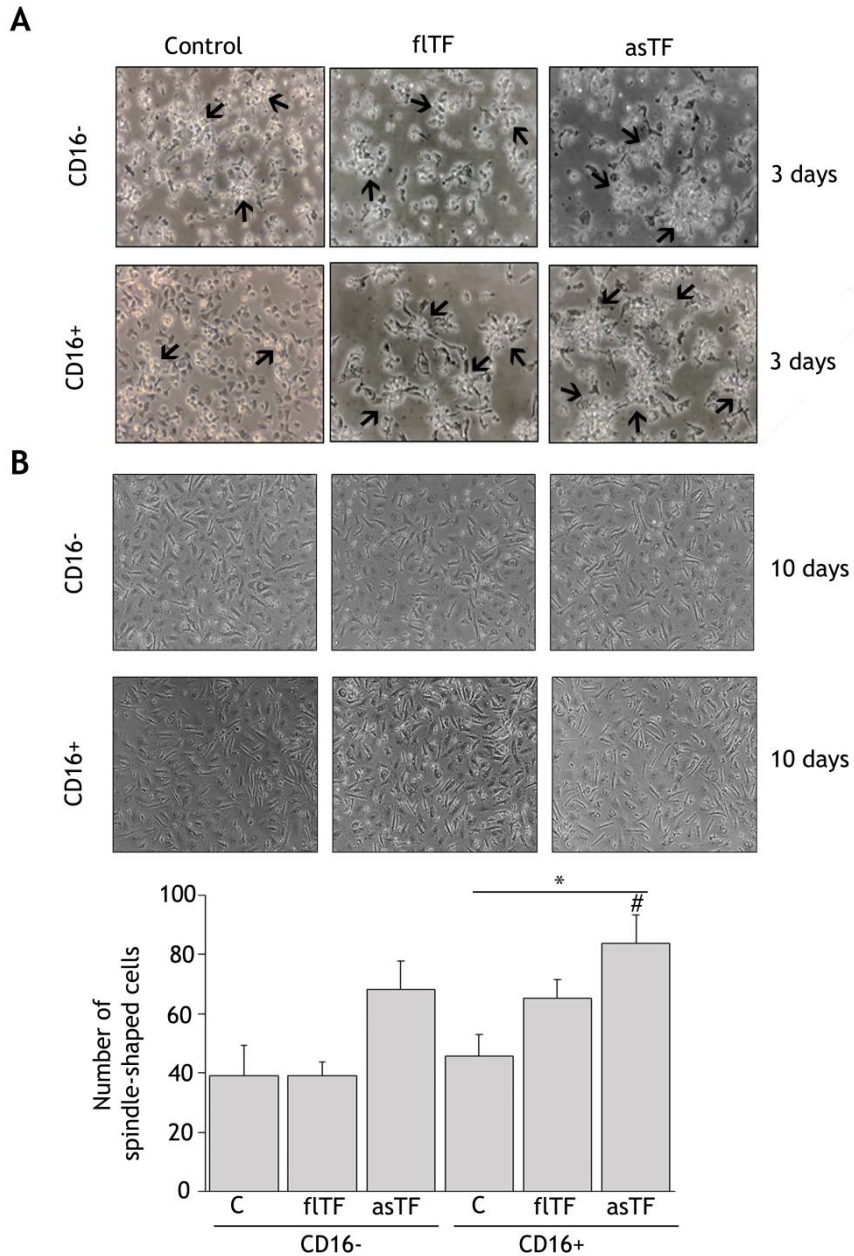


Figure 5. ELCs derived from monocytes subsets. A) Phase contrast micrographs show the morphology of ELCs from CD16⁻ and CD16⁺ monocytes at 3 days of culture in endothelial supernatant rich of fITF and asTF. We observed outgrowth colonies (arrows) with cobblestone structure, particularly in asTF cultures. **B)** ELCs morphology at 10 day of culture. Histogram shows the analysis of spindle-shaped cells counting from these cultures. Values are from four independent experiments. Results are expressed as mean ± SEM (*p<0.05 compared to CD16⁺ control, #p<0.05 versus CD16⁻ control).

Figure 6

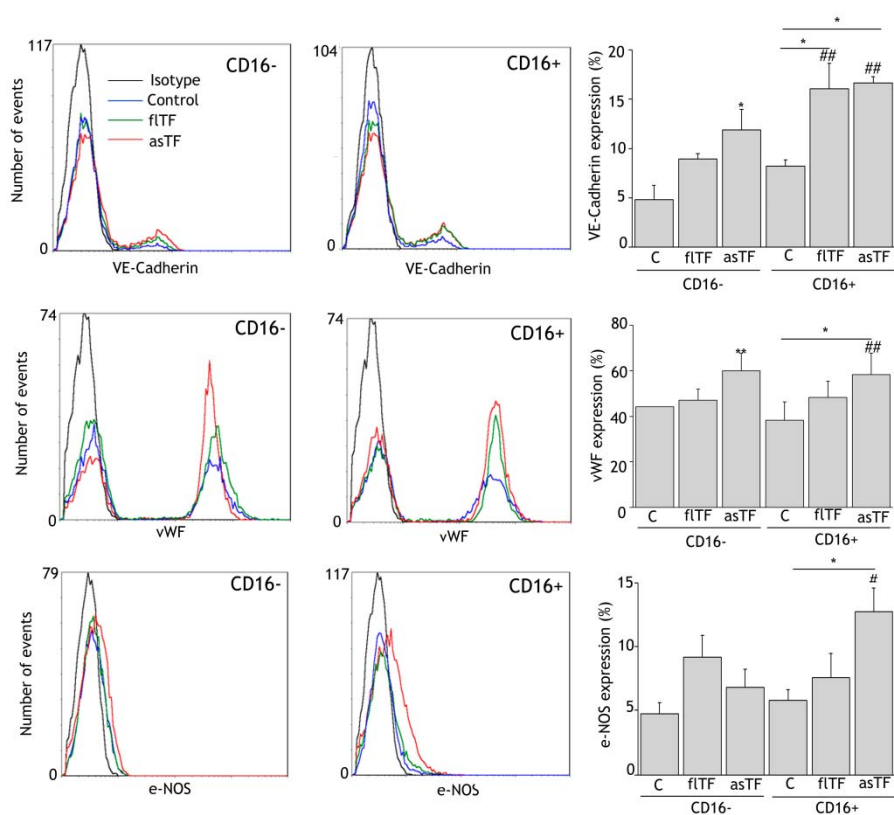


Figure 6. Endothelial profile of ELCs derived from CD16- and CD16+ monocytes in fITF or asTF-rich supernatant from mECs. Panels show FACS analysis of VE-Cadherin, vWF and e-NOS expression. Results are represented as percentage of positive ELCs derived from separated subsets of monocytes under fITF or asTF treatment. Histograms show results from seven experiments. Values are expressed as mean \pm SEM (* p <0.05, ** p <0.005 compared to CD16+ control, # p <0.05, ## p <0.005 compared to CD16- control).

DISCUSIÓN

Las ECVs son la principal causa de muerte en todo el mundo [3], por ello, representan uno de los desafíos más importantes en la investigación biomédica. La aterosclerosis es la causa subyacente de las ECVs de origen isquémico. Nuestro conocimiento sobre la aterosclerosis ha avanzado considerablemente, sin embargo, muchos de los factores que contribuyen a su progresión y complicación son aún desconocidos.

Durante el desarrollo de la lesión aterosclerótica, el proceso inflamatorio y la activación endotelial promueven la neovascularización de la placa [35]. En las etapas iniciales, las placas ateroscleróticas son estables y asintomáticas, sin embargo, a medida que progresa la enfermedad, las placas pueden transformarse en inestables y susceptibles de ruptura. Un factor clave en la transformación de la aterosclerosis subclínica en eventos isquémicos es la vulnerabilidad de las placas ateromatosas [193].

No se conocen las causas que provocan que una placa estable se transforme en vulnerable y se produzca su ruptura. No obstante, se ha observado una asociación entre eventos coronarios agudos y la aparición de nuevos vasos sanguíneos en la placa aterosclerótica. Estudios previos han demostrado que la neovascularización promueve la ruptura de la placa [36, 37]. Las hemorragias intermitentes que provienen de los nuevos capilares formados atrapan las células de la sangre y las moléculas pro-aterogénicas que inducen inflamación y que conducen a un periodo de inestabilidad de la placa. De hecho, se ha descrito que vasos sanguíneos inmaduros en la placa aterosclerótica contribuyen a la expansión de la íntima y a un fenotipo pro-trombótico de la lesión [37].

El conocimiento de los mecanismos que conllevan a la formación de nuevos vasos sanguíneos, así como el desarrollo de nuevas técnicas para el estudio de los procesos angiogénicos, es de gran interés en la práctica clínica y en el desarrollo de nuevos tratamientos, no sólo de las ECVs, sino también de una gran variedad de patologías que cursan con procesos angiogénicos. En la presente tesis doctoral hemos hipotetizado que la estabilidad de los nuevos vasos formados es esencial en los procesos angiogénicos. Un mayor conocimiento de los mecanismos que inducen a la formación de neovasos estables podría contribuir al desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas, evitar hemorragias dentro de la placa y disminuir así los episodios trombóticos.

Se ha detectado que las CEs que forman los microcapilares del interior de la placa aterosclerótica, las CEm, expresan niveles elevados de FT. Sin embargo, las CEs de la luz del vaso no lo expresan [194]. El FT desarrolla un papel esencial en los procesos angiogénicos. Recientemente, nuestro grupo ha demostrado que las CEm que adquieren un fenotipo angiogénico presentan altos niveles de FT, y por consiguiente, secretan grandes cantidades de CCL2 [45], induciendo la estabilización de los vasos formados gracias a la atracción de pericitos. Por tanto, el primer objetivo de esta tesis doctoral fue analizar los mecanismos de señalización inducidos por el FT en CEm que dan lugar a la formación de nuevos vasos sanguíneos.

El FT es una glicoproteína de membrana considerada el principal activador de la cascada de la coagulación [34, 83]. El FT funciona como receptor celular y cofactor catalítico para el FVIIa, activando los factores IX y X y conduciendo a la formación de fibrina. Por otro lado, el complejo FT-FVIIa activa las proteínas PAR e induce la movilización del calcio y la transducción de señales vía MAPK, que pueden activar la transcripción de genes críticos para la proliferación, la migración y la angiogénesis [195, 196]. La expresión del FT puede ser inducida en CEm en respuesta a varios estímulos tales como citoquinas, factores de crecimiento y aminas biogénicas. Estos mediadores actúan a través de diversos mecanismos de transducción de señales, incluyendo MAPK, PI3K y PKC [197, 198]. Estudios de nuestro grupo sugieren que el FT también induce la activación de factores de transcripción mediante señalización a través de Akt, de forma independiente de PAR2 [151]. En los últimos años, el FT ha sido el foco de atención de muchos grupos de investigación debido a su participación en eventos no-hemostáticos y patológicos [82, 143]. Judah Folkman, un pionero en la investigación de la angiogénesis, fue el primero en establecer una conexión entre la coagulación y la formación de vasos sanguíneos, sugiriendo que los dos procesos están íntimamente entrelazados [199]. Posteriormente, se describió que el FT es indispensable para el desarrollo embrionario normal y que la ausencia de FT conduce a una neovascularización embrionaria defectuosa que lleva a la muerte del individuo [200, 201]. Se han observado concentraciones elevadas de FT en individuos con FRC, así como en pacientes con síndromes coronarios agudos. Por otro lado, se ha descrito que las células tumorales a menudo expresan constitutivamente FT [202], las vías de señalización inducidas por la expresión de FT en estas células se han relacionado con la inducción de genes que promueven la angiogénesis.

El proceso de angiogénesis es complejo y está robustamente controlado por varias vías de señalización. Para elucidar los mecanismos de señalización inducidos por el FT, nos centramos en los posibles factores de transcripción regulados por éste. Inicialmente, nuestros estudios se enfocaron en la familia de factores de transcripción ETS, ya que mantienen una fuerte implicación en procesos de angiogénesis y de desarrollo vascular [203, 204]. La familia de factores de transcripción ETS controla procesos biológicos mediante el reconocimiento de un consenso de purinas GGA en la región promotora de sus genes diana [205]. ETS1 es el primer miembro de la familia ETS, se empieza a expresar durante la embriogénesis y ha sido relacionado con la regulación de CCL2 y con varias moléculas que controlan la función celular [204, 206] y que están implicadas en el balance angiogénico (factores pro- y anti-angiogénicos), entre ellos VE-Cadherina [207], VEGF [208], angiotensina II (Ang-II) [209] y TGF β [210].

En esta tesis, mediante técnicas de silenciamiento y sobreexpresión de genes involucrados en las vías de señalización de angiogénesis desencadenada por el FT, hemos demostrado que la expresión de ETS1 se regula a través de la señalización de FT en CEm. De hecho, hemos observado que las CEm silenciadas de FT presentan bajos niveles de expresión y de activación de ETS1. Además, estudios de angiogénesis *in vitro* e *in vivo* han mostrado que las CEm silenciadas de FT o de ETS1 son incapaces de formar microvasos.

Se ha descrito que ETS1 es capaz de promover el cambio del fenotipo quiescente de las CE a fenotipo angiogénico [211, 212]. Una de las moléculas involucradas en este cambio angiogénico es la VE-Cadherina, la cual se regula a través de ETS1 [207, 213]. En nuestros estudios, hemos observado que el silenciamiento de FT en CEm reduce la expresión de VE-Cadherina.

Varios grupos de investigación han destacado el papel de ETS1 en la regulación de CCL2 [214, 215]. En este sentido, se ha descrito que ETS1 se une a la región promotora de CCL2 en la inflamación vascular mediada por Ang-II [209]. La Ang-II induce la expresión de CCL2 en CE y CMLVs en ratones *wild-type* pero no en ratones knock-out ETS1^{-/-} [209]. En esta tesis, hemos demostrado que el FT, a través de la activación de ETS1, induce la expresión de CCL2. Mediante ensayos de inmunoprecipitación de cromatina y de actividad luciferasa del promotor CCL2, demostramos que el FT potencia la unión de ETS1 en la región promotora del gen CCL2 en CEm.

Además, nuestro grupo ha descrito que el FT señala la expresión y secreción de CCL2, el cual ayuda a reclutar pericitos y CMLVs, esenciales para la formación de microcapilares estables [45]. En esta ocasión, hemos observado por medio de la inhibición de FT y de ETS1 *in vivo* e *in vitro*, que CCL2 recluta CMLVs y pericitos a través de la activación de ETS1, mediada por FT.

El FT desencadena una ruta de señalización intracelular a través de la unión al FVIIa, resultando en una activación de las quinasas ERK1/2 [163]. Estudios de nuestro grupo han demostrado que el FT permite la fosforilación de Akt1, que a su vez regula la fosforilación de la Ser²⁵⁹ de Raf, lo cual estimula la fosforilación de ERK1/2 [151]. Nuestros resultados señalan que la inhibición de FT en CEm no solamente reduce los niveles de fosforilación de ERK1/2, sino que esta reducción conlleva una disminución de la actividad de ETS1 y de la expresión de CCL2. Se ha descrito que las quinasas ERK1/2 fosforiladas aumentan la actividad de ETS1 mediante la fosforilación de su Thr³⁸ [216]. Hemos demostrado que la activación de ETS1 mediada por FT se da a través de las quinasas ERK1/2 y que el eje de señalización FT/ETS1/CCL2 ejerce un papel fundamental en el proceso de formación y de estabilización de los vasos.

Los procesos angiogénicos están regulados mediante una compleja red de factores de transcripción. ETS1 media la activación de la transcripción de algunos de los genes reguladores del balance angiogénico. Este fenómeno suele implicar sinergismos con otros factores de transcripción [217]. Se han descrito interacciones entre ETS1 y factores de transcripción como AP-1 [218], la proteína de leucemia mieloide aguda-1 (AML-1) [219], el factor de transcripción E3 (TFE3) [220] y la proteína de especificidad 1 (SP1) [221]. Dado que los factores de transcripción involucrados en la señalización mediada por FT para inducir angiogénesis aun no son muy conocidos, estudiamos posibles reguladores que pudieran cooperar con ETS1 regulando los procesos angiogénicos.

Las proteínas SMAD son factores de transcripción que a menudo presentan un sinergismo con otras moléculas reguladoras de procesos celulares [222]. En este sentido, se ha descrito que SMAD3 coopera con ETS1 para regular la expresión proteica de la hormona paratiroidea en células de cáncer de mama [223]. SMAD3 es el miembro 3 de la familia SMAD, reconocidos factores angiogénicos que regulan la expresión de VEGF-A mediada por TGFβ1 [224]. La proteína SMAD3 también se ve alterada por la señalización de FT y comparte

con ETS1 la capacidad de cooperar con los factores de transcripción AP-1 [225], AML-1 [226], TFE3 [222] y SP1 [227].

En nuestros estudios, hemos comprobado que el FT regula la expresión y la activación de SMAD3 por medio de ensayos de silenciamiento y sobreexpresión de FT en CEm. Además, a través de la inhibición y la sobreexpresión de ETS1 y SMAD3, y de ensayos de actividad luciferasa del promotor CCL2, hemos identificado la cooperación de los factores de transcripción ETS1 y SMAD3 en la regulación de la expresión génica de CCL2 y en la angiogénesis mediada por FT.

Nuestro grupo ha descrito que Akt1, activado a través de FT en CEs, permite la fosforilación de ETS1, la expresión de CCL2 y el desencadenamiento de un proceso de angiogénesis [151]. En este estudio, hemos demostrado que una sobreexpresión de SMAD3 permite al FT señalar la expresión de CCL2 en ausencia de Akt1. En células de carcinoma mamario, SMAD3 regula la fosforilación de ERK1/2 [228], y nuestros resultados previos mostraron que el FT señala a través de ERK1/2 para activar ETS1 y CCL2. En esta ocasión, la inhibición de Akt redujo los niveles de fosforilación de ERK1/2 y de ETS1, excepto en los casos en que SMAD3 estaba sobreexpresado. Estos resultados sugieren que, además de la ruta de FT/Akt/ETS1; el FT puede señalar a través de una ruta alternativa que implica la presencia de SMAD3 y que puede activar la expresión de los genes diana de ETS1. Concretamente, hemos averiguado que de forma independiente de Akt1, SMAD3 puede señalar la fosforilación de ETS1 a través de las quinasas ERK1/2 e inducir expresión de CCL2.

Asimismo, se ha demostrado que en fibroblastos se forman complejos de SMAD3, p38 y ERK1/2 que regulan la expresión génica [229]. También existen evidencias de que PAR2 puede activar vías de MAPK [230] y ERK1/2 mediante rutas de señalización dependientes de PKC en células murinas [231]. Mediante ensayos de formación de tubos *in vitro* con CEm y análisis de western blot, hemos observado que, mientras la vía FT/Akt/ETS1 es independiente de PAR2, la activación de SMAD3 se desencadena a partir de la interacción de FT y PAR2, de forma independiente de Akt1. Esta conclusión está muy relacionada con otros estudios recientes que apuntan que PAR2 activa la vía de SMAD2 [232] por una transactivación de un receptor de TGF β . Las proteínas SMAD son proteínas intracelulares que transducen señales desde ligandos TGF β al núcleo, donde activan una cascada de transcripción de genes, sin embargo,

nuestros estudios han demostrado que la inhibición del receptor de TGF β no fue suficiente para inhibir la fosforilación de SMAD3 estimulada por FT y PAR2. Ahora bien, existen evidencias de que algunos mediadores independientes de TGF β , tales como las MAPK, pueden activar SMAD2 [233]. La señalización por MAPK puede estar mediada por PCK α [234]. Nosotros estudiamos la vía de activación de SMAD3, que tiene lugar a través de la señalización de FT/PAR2, observando que ésta también está mediada por PKC α . Consistente con nuestros resultados, se ha descrito que la señalización de SMAD3 se da a través de PKC en fibroblastos [235].

Seguidamente, mediante ensayos *in vivo* con CEs silenciadas de ETS1, SMAD3 y PAR2, estudiamos la funcionalidad que desarrollan estas dos rutas de señalización en la angiogénesis. Mientras que el silenciamiento de ETS1 daba lugar a una formación de vasos deficiente, sugiriendo que la vía de FT/Akt/ETS1 está involucrada en el desencadenamiento de formación de estructuras tubulares; el silenciamiento de SMAD3 y de PAR2 dio lugar a una angiogénesis activa pero con vasos inestables que provocaron hemorragias, sugiriendo que la vía de FT/PAR2/SMAD3 contribuye a que los vasos formados sean estables. En definitiva, la señalización de la angiogénesis a través de FT tiene una regulación cruzada. Hemos descrito dos vías de señalización desencadenadas por FT que dan lugar a angiogénesis. La primera, FT/Akt/ETS1, activa la creación de nuevos vasos sanguíneos; y la segunda, FT/PAR2/SMAD3, permite que los vasos sean estables. Por último, la combinación de los dos produce grandes cantidades de CCL2 que recluyen CMLVs y pericitos y ayudan a estabilizar los nuevos vasos.

El FT tiene un papel multifactorial en la aterogénesis, la inflamación, la angiogénesis y la metástasis [236]. Su expresión se ve inducida en respuesta a diversos estímulos en CEs, sin embargo, las señales que desencadenan expresión de FT en CEm no se conocen con profundidad. En vista de los resultados obtenidos hasta el momento, nos preguntamos qué estímulos desencadenan la expresión de FT en CEs para dar lugar a neovascularización de la placa aterosclerótica. Reparando en la presencia de inflamación en la misma, y dado que las interacciones entre CEs y monocitos juegan un papel clave en la respuesta inflamatoria, la trombosis y el desarrollo de la lesión aterosclerótica [237], descubrimos que los monocitos ejercen un importante papel en la formación de vasos. De hecho, se ha descrito que los monocitos tienen una función protectora porque mejoran la reperusión del tejido; y

también una función perjudicial, ya que se les ha localizado en vasos sanguíneos de la placa de ateroma [238].

Además de que los monocitos ya han sido relacionados con un aumento de la actividad procoagulante de FT en CEs [239], también son participativos del proceso angiogénico mediante la secreción de citoquinas pro- y anti-inflamatorias, que pueden controlar la proliferación, la supervivencia y la apoptosis de las CEm. Mediante un sistema de migración de CEm y ensayos de angiogénesis *in vitro*, hemos identificado que el secretoma de monocitos induce la reparación de las heridas en cultivos en monocapa. Nuestros resultados indican que las moléculas secretadas por los monocitos inducen la expresión de FT, desencadenando una vía de señalización intrínseca en las CEm que desemboca en un aumento de la angiogénesis.

En esta línea, varios grupos de investigación han estudiado las citoquinas pro-inflamatorias secretadas por monocitos. Leibovich *et al.* [240], propuso que el TNF α secretado por monocitos induce expresión de FT, así como también se ha demostrado que los monocitos inducen actividad procoagulante de FT y angiogénesis en CEs [148, 239]. Sin embargo, cuando nosotros bloqueamos el TNF α de la secreción monocitaria con un anticuerpo específico, la inducción de angiogénesis y la expresión de FT se mantuvo elevada, sin presentar diferencias significativas ante el medio condicionante de monocito con TNF α funcional. Por lo tanto, deducimos que los monocitos desencadenan una inducción de angiogénesis en CEm independiente de TNF α .

La angiogénesis requiere migración y proliferación celular. Las vías de señalización Wnt regulan aspectos fundamentales del desarrollo vascular y de la morfogénesis en general. Ya se ha descrito que los macrófagos regulan la formación de vasos y la reparación de heridas por medio de la señalización de Wnt [241, 242]. En este sentido, hemos identificado la proteína Wnt5a como una proteína presente en las secreciones de monocitos.

Las proteínas Wnt son una familia de glicoproteínas secretadas, ricas en cisteínas, muy conservadas a lo largo de la evolución [243, 244]. Ejercen un papel esencial en la regulación de procesos celulares de desarrollo del individuo, modelado de tejidos, proliferación y migración celular [245, 246]. Estas proteínas ejercen su función mediante el desencadenamiento de vías de

señalización celular que pueden ser canónica o no canónica, en dependencia de los ligandos que las activen y los co-receptores implicados, normalmente desencadenados por la interacción de Wnt con los receptores de membrana Frizzled (FZD) [245]. En este estudio, hemos demostrado que a través de la secreción de la proteína Wnt5a, los monocitos activan la vía de señalización no canónica de Wnt en las CEs. La proteína Wnt5a ha sido relacionada con un aumento de la supervivencia, la proliferación, la migración y la activación de CEs; y se sabe que señala a través de una vía no canónica [247]. En macrófagos, también ha sido descrita una vía de señalización no canónica de Wnt para la reparación de heridas [242].

Existen dos vías de señalización no canónicas. Una de ellas, la Wnt/Ca²⁺, señala a través de la interacción con un receptor FZD y de la formación de complejos con co-receptores como Ror2 o RYK [245], a través de la liberación de Ca²⁺ intracelular. La otra vía no canónica, llamada vía de polaridad celular planar (PCP), señala mediante GTPasas pequeñas que regulan la remodelación del citoesqueleto. Mediante la activación de FZD se incrementa la actividad de las GTPasas Rac y Rho y, así, se reorganiza el citoesqueleto y cambia la polaridad celular [248].

A través de ensayos de PCR y western blot, hemos relacionado FZD5 y FT de CEs mediante una vía de señalización de Wnt no canónica. FZD5 es esencial en la angiogénesis que tiene lugar durante la formación de la placenta y la embriogénesis [249]. Además, nuestros ensayos de movilización de Ca²⁺ nos han permitido observar que Wnt5a, al unirse a su receptor FZD5 de la membrana celular endotelial, genera la liberación de Ca²⁺ intracelular, que lleva a la activación del NF-κB [250]. Se ha descrito que el NF-κB activado transloca al núcleo de la célula y allí se une al promotor de FT, incrementando su expresión y activando la formación de estructuras capilares [250, 251].

Nuestros resultados concuerdan con otros estudios que demuestran que la vía de Wnt/Ca²⁺ promueve la formación de redes capilares de CEs *in vitro* así como la proliferación de CEs y la supervivencia celular, indicando un posible efecto pro-angiogénico *in vivo* [252]. Además, niveles elevados de Ca²⁺ en el citoplasma permiten la activación del NF-κB, que regula una multitud de funciones celulares, incluyendo remodelación del citoesqueleto, polaridad y movilidad celular [253].

La señalización transducida a través de NF- κ B está muy relacionada con la progresión de la placa aterosclerótica, su desestabilización y su ruptura [254]. El NF- κ B también ha sido relacionado con la sobreexpresión de genes responsables de la proliferación celular y del cáncer [255]. En el presente trabajo demostramos como los monocitos, a través de Wnt5a, señalizan la activación de NF- κ B, que induce la expresión de FT en las CEm y la formación de microvasos.

Los monocitos son células activamente reclutadas en las lesiones ateroscleróticas. En efecto, hemos localizado monocitos en arterias coronarias humanas procedentes de corazones explantados. En estas mismas arterias hemos encontrado proteína Wnt5a y CEm que expresan FT, formando neovasos en el mismo nicho. En resumen, nuestros experimentos *in vitro* e *in vivo* indican que los monocitos ejercen un papel indispensable en la promoción de la angiogénesis, mediante las secreciones de Wnt5a y la activación de la vía de señalización no canónica de Wnt en CEm. Wnt5a interacciona con FZD5, el receptor de Wnt5a, y señala la movilización de Ca²⁺ intracelular. De esta forma se induce la activación de NF- κ B y la sobreexpresión de FT en CEm.

Por otro lado, es importante destacar que el comportamiento de las CE está fuertemente influenciado por los leucocitos que secretan factores angiogénicos tales como VEGF, HGF, TNF α , IL-8, entre otros [256, 257]. Se ha descrito que los macrófagos expresan VEGF, que también activa la producción de CCL2 en CE y aumenta la permeabilidad del endotelio arterial [258]. La adhesión de los monocitos a las CE sobreexpone la actividad procoagulante del FT [239, 259].

Los monocitos constituyen una población heterogénea con características funcionales particulares. Cada subpoblación contribuye de forma independiente en los procesos angiogénicos intraplaca y en la reparación de tejidos [260]. La identificación de diferentes propiedades angiogénicas de los monocitos ha llevado a varios grupos de investigación a tratar de elucidar funciones específicas de cada uno. Aunque existe mucha controversia, está bien establecido que los monocitos que expresan CD16 tienen una relación más estrecha con la angiogénesis intraplaca, ya que se ha detectado como la proporción de esta población respecto al total de monocitos está claramente aumentada en pacientes con enfermedades cardíacas y eventos

protrombóticos [71, 72]. Además, la subpoblación de monocitos no-clásica, CD14⁺CD16⁺⁺, es relativamente baja en condiciones fisiológicas en pacientes sanos, pero aumenta tras una lesión vascular. La subpoblación intermedia, CD14⁺⁺CD16⁺, presenta un perfil de expresión génica muy relacionado con la angiogénesis [73]. Estas dos subpoblaciones han sido relacionadas con una sobreexpresión de las citoquinas inflamatorias [261, 262]. En concordancia con estos antecedentes, nuestros estudios demuestran que los monocitos CD16⁺ son fuertes estimuladores de la vía de señalización FT/ETS1/CCL2, así como de la formación de tubos, en comparación con la población CD16⁻. Nuestros resultados señalan que las secreciones de CD16⁺ estimulan más significativamente la activación de esta vía en CEM que la población CD16⁻. Existen diferencias entre las poblaciones de monocitos respecto a su capacidad paracrina para estimular la neovascularización [65]. En este sentido, hemos observado que la población de monocitos CD16⁺ estimula las CEs a expresar FT en sus diferentes formas, de manera más eficiente que la población CD16⁻, contribuyendo a una mayor neovascularización.

Durante la reparación del daño cardíaco tras sufrir una isquemia, los monocitos clásicos CD14⁺⁺CD16⁻ son atraídos a la lesión durante las primeras etapas de la reparación y reducen el efecto inflamatorio, mientras que en etapas más avanzadas de la recuperación cardíaca, son los monocitos CD14⁺⁺CD16⁺ y CD14⁺CD16⁺⁺ los que alteran la remodelación de la matriz extracelular y estimulan la angiogénesis, llevando a un adelgazamiento de la lesión infartada [263, 264]. La especificidad de cada población de monocitos puede ser dependiente de la expresión de múltiples receptores y de la señalización mediada por CCL2 [46]. El análisis del patrón génico y proteico de monocitos bajo un estímulo endotelial de FT mostró que, mientras que Wnt5a, FT y CCL2, que son genes implicados en la estimulación de formación de nuevos vasos, se veían sobreexpresados, el gen CCR2 se veía reducido. Las poblaciones CD16⁺ son poco frecuentes (menos del 15% del total de monocitos en individuos sanos), pero sus proporciones se ven aumentadas en pacientes con infarto de miocardio, estando relacionadas con la sobreexpresión de citoquinas inflamatorias [261, 262]. Nuestros resultados no solamente indican un refuerzo de las rutas de señalización angiogénica sino que sugieren una expansión de la población CD16⁺ respecto a la población CD16⁻. Estos datos apuntan a un posible papel de los monocitos CD16⁺ en la angiogénesis intraplaca mediada por inflamación.

Los monocitos clásicos se diferencian típicamente a macrófagos M1, mientras que los no clásicos se diferencian a macrófagos M2. No obstante, en el microambiente tumoral, existen discrepancias respecto a los tipos y funciones de los macrófagos, que han sugerido que los M1 derivados de los monocitos clásicos pueden polarizarse y transformarse en macrófagos M2 en el tejido tumoral. Recientemente, se ha descrito que los monocitos clásicos pueden ser también precursores de los macrófagos M2 [265]. En vista de estos datos y de la expansión de monocitos CD16⁺ que se observa durante la reparación de la lesión vascular, hemos estudiado los cambios en las proporciones de las poblaciones de monocitos bajo un estímulo endotelial. Nuestros análisis de citometría de flujo de monocitos sometidos a un estímulo de FT endotelial confirman que los monocitos clásicos polarizan hacia monocitos CD16⁺ a lo largo del tiempo, ajustando este cambio a un efecto dosis-respuesta. Estos resultados concuerdan con estudios en ratones, en los que se ha observado que los monocitos Ly6C^{high}, análogos a los monocitos humanos CD14⁺⁺CD16⁻, pueden convertirse en Ly6C^{low} *in vivo* [266].

Por otra parte, el FT puede ser encontrado en diferentes formas, con su secuencia completa, fITF, soluble en su forma trunca, asTF, y podemos encontrarlo en la células o bien en micropartículas, TF⁺-MPs. Se ha descrito recientemente que el FT presente en la circulación podría tener mayor actividad angiogénica que la forma habitual de fITF ancorada a la membrana celular [88]. Nuestros resultados mostraron que la secreción de CEm asTF-positiva tuvo un efecto significativamente más elevado que el medio rico en fITF, sugiriendo que asTF es la forma de FT principal para el estímulo de la angiogénesis mediada por monocitos.

Los monocitos se consideran células pro-inflamatorias que liberan un amplio abanico de citoquinas, quimioquinas y especies reactivas de oxígeno (ROS), que promueven la oxidación de las LDL y la activación de las CEs. El endotelio activado, por su parte, interacciona con los monocitos [267]. La densidad de los vasos intraplaca se corresponde con la acumulación de monocitos y macrófagos, creándose así un círculo patológico: angiogénesis – movilización de células inflamatorias – angiogénesis [60]. Las interacciones entre monocitos y CEm juegan un papel esencial en la respuesta inflamatoria innata, en la trombosis y en el desarrollo de la lesión aterosclerótica [13].

Una gran parte de las EPCs son de origen monocítico [268]. Entre los monocitos humanos se incluye una población que es capaz de generar un fenotipo endotelial en cultivo [74]. Estas células derivadas de monocitos con propiedades endoteliales son llamadas *endotelial-like cells*, ELCs, y se caracterizan por su expresión de marcadores endoteliales, como VE-Cadherina, vWF y eNOs, en respuesta a factores pro-angiogénicos [269]. Sin embargo, no está claro lo que ocurre durante la diferenciación de los monocitos en las placas coronarias y en el tejido infartado. La diferenciación preferente de las subpoblaciones de monocitos ha sido sugerida en varias ocasiones [270, 271], pero se necesitan más evidencias acerca de este proceso. De hecho, el papel del microambiente y de los factores locales que estimulan a los monocitos, conduciendo su diferenciación, tampoco ha sido todavía elucidado. En vista de que bajo la secreción endotelial, los monocitos ven alterada su expresión génica y proteica, nos planteamos si también presentarían diferente plasticidad ante estímulos angiogénicos. Cultivamos monocitos en presencia de proteínas recombinantes que son liberadas por las CEm durante la estimulación angiogénica: FT y CCL2. Además, también añadimos como control positivo un coctel de proteínas recombinantes de TNF α , VEGF y bFGF [74]. Mediante microscopía confocal y citometría de flujo, observamos que el FT soluble en el medio ejerce un fuerte papel sobre los monocitos, provocándoles un cambio radical en su morfología hacia una morfología polarizada en forma de huso y una expresión de los marcadores endoteliales VE-cadherina, vWF y eNOS significativamente más elevada que en los otros casos. Este comportamiento ya ha sido descrito en otras ocasiones para explicar la transdiferenciación de monocitos a ELCs [74, 272]. Seguidamente, observamos también que las ELCs derivadas de los monocitos, bajo un estímulo endotelial rico en asTF, son capaces de formar estructuras tubulares en cultivos en matrigel. Además, nuestros análisis han mostrado que las poblaciones CD16⁺ presentan una mayor capacidad para transdiferenciar a ELCs que las poblaciones CD16⁻, ya que tras 10 días en medio endotelial rico en fITF o asTF, se observó una mayor cantidad de células con morfología de huso característica de ELCs en los cultivos provenientes de monocitos CD16⁺, y su expresión de marcadores endoteliales fue significativamente mayor. Se debe destacar que la estimulación con asTF provocó un mayor efecto de transdiferenciación que el FT de secuencia completa.

En resumen, a partir de los resultados presentados en esta tesis podemos establecer que la expresión de FT en CEm desencadena dos vías de

señalización que cooperan entre ellas. Por un lado, FT/Akt/ETS1 estimula la formación de tubos, y por otro, FT/PAR2/SMAD3 permite que los tubos sean estables (**Figura 30A**). Además, los monocitos estimulan a las CEm a que expresen FT y formen nuevos vasos por medio de la secreción de la proteína Wnt5a y la activación de una vía de señalización de Wnt no canónica. El FT de las CEs, especialmente el asTF, constituye un estímulo al que los monocitos responden expandiendo la población CD16⁺ y transdiferenciando a ELCs (**Figura 30B**). De esta manera, se genera un ciclo de retroalimentación positiva donde ambos tipos celulares colaboran para la formación y estabilización de los nuevos vasos formados.

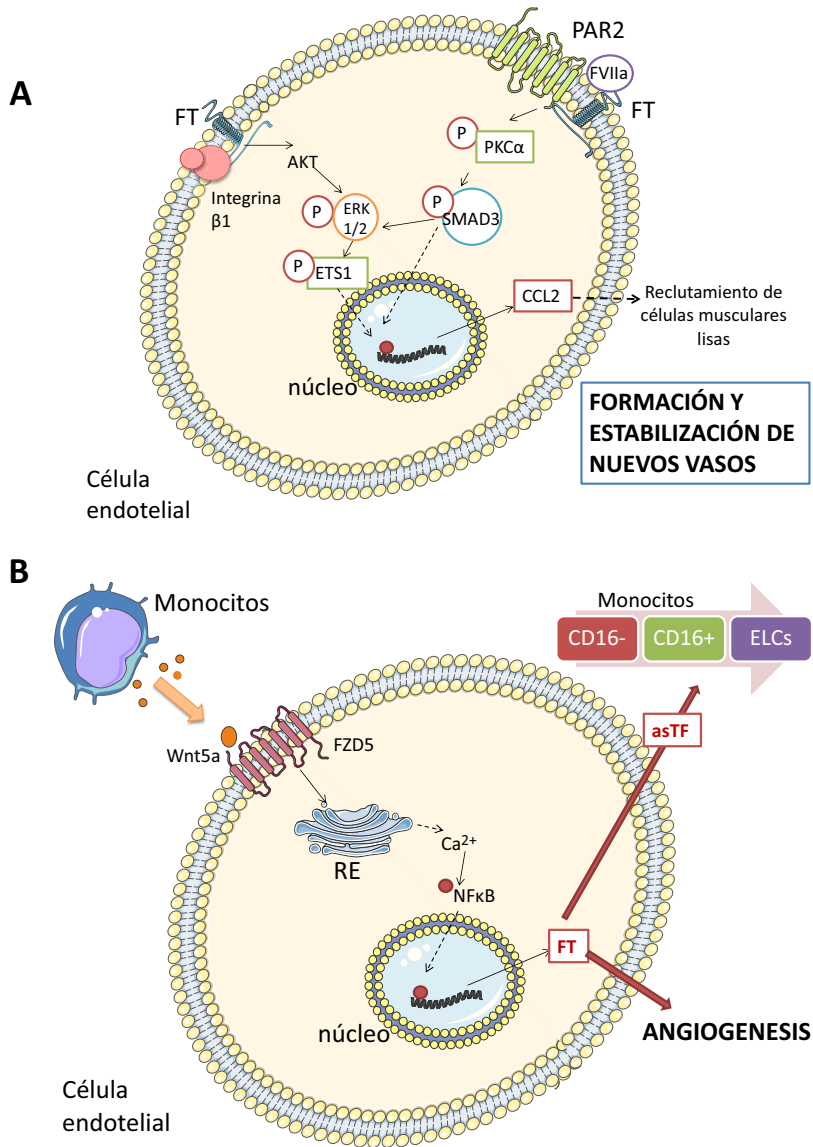


Figura 30. A) Vías de señalización FT/Akt/ETS1 y FT/PAR2/SMAD3. **B)** Vía de señalización Wnt5a no canónica en CEm. Estimulación de monocitos a través de asTF: CD16⁻ → conversión a CD16⁺ → transdiferenciación a ELCs.

CONCLUSIONES

En resumen, las conclusiones de esta tesis doctoral son las siguientes:

- El FT expresado en las CEs señala la activación de ETS1 y permite la formación y estabilización de nuevos microvasos.
- La ruta de señalización FT/PAR2/SMAD3 coopera con la ruta FT/Akt/ETS1 en CEm para estimular la formación de vasos sanguíneos estables.
- Los monocitos, mediante la secreción de Wnt5a, activan la vía de señalización no-canónica que involucra el receptor FZD5 y que estimula la expresión de FT en CEm.
- La población de monocitos CD16⁺ estimula la expresión de FT en CEm de forma más intensa que la población CD16⁻.
- Las CEs, por medio de FT, provocan una expansión de la población de monocitos CD16⁺ y una transdiferenciación a ELCs.
- La transdiferenciación de monocitos a ELCs mediada por el FT endotelial es más intensa a través de a^sTF que de fITF.
- A través de la estimulación de FT en CEs mediada por monocitos, se genera un ciclo de retroalimentación positiva que estimula la formación de nuevos vasos sanguíneos.

REFERENCIAS

1. Frohlich, J. and A. Al-Sarraf, *Cardiovascular risk and atherosclerosis prevention*. Cardiovasc Pathol, 2013. **22**(1): p. 16-8.
2. *Global atlas on cardiovascular disease prevention and control*. Geneva, Switzerland. World Health Organization, 2011.
3. Cannon, B., *Cardiovascular disease: Biochemistry to behaviour*. Nature, 2013. **493**(7434): p. S2-3.
4. Regidor E, G.-F.J., *Patrones de mortalidad en España, 2010*. . Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad, 2013.
5. *Global status report on noncommunicable diseases. "Attaining the nine global noncommunicable diseases targets; a shared responsibility"*. World Health Organization, 2014.
6. Mackay J, M., G., *The atlas of Heart Disease and Stroke*. World Health Organization, 2004.
7. Wilson, P.W., et al., *Prediction of coronary heart disease using risk factor categories*. Circulation, 1998. **97**(18): p. 1837-47.
8. Kivimaki, M., et al., *Work stress and risk of cardiovascular mortality: prospective cohort study of industrial employees*. BMJ, 2002. **325**(7369): p. 857.
9. Lett, H.S., et al., *Depression as a risk factor for coronary artery disease: evidence, mechanisms, and treatment*. Psychosom Med, 2004. **66**(3): p. 305-15.
10. Vasan, R.S., *Biomarkers of cardiovascular disease: molecular basis and practical considerations*. Circulation, 2006. **113**(19): p. 2335-62.
11. Badimon, L., et al., *Circulating biomarkers*. Thromb Res, 2012. **130 Suppl 1**: p. S12-5.
12. Meens, M.J., A. Pfenniger, and B.R. Kwak, *Risky communication in atherosclerosis and thrombus formation*. Swiss Med Wkly, 2012. **142**: p. w13553.
13. Ross, R., *Atherosclerosis--an inflammatory disease*. N Engl J Med, 1999. **340**(2): p. 115-26.
14. Rokitsansky, C.v., *A Manual Of Pathological Anatomy*. 1852.
15. Anitskchow, C., *Über experimentelle cholesterinöse und ihre Bedeutung für die Entstehung einiger pathologischer Prozesse*. Pathol Anat, 1913.
16. Fuster, V., et al., *The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes (2)*. N Engl J Med, 1992. **326**(5): p. 310-8.
17. Ross, R. and V. Fuster, *Atherosclerosis y enfermedad arterial coronaria*. Springer-Verlag Ibérica, 1997(La patogenia de la aterosclerosis): p. 489-508.
18. Badimon, J.J., et al., *Coronary atherosclerosis. A multifactorial disease*. Circulation, 1993. **87**(3 Suppl): p. II3-16.
19. Badimon, L., et al., *Pathogenesis of the acute coronary syndromes and therapeutic implications*. Pathophysiol Haemost Thromb, 2002. **32**(5-6): p. 225-31.
20. Tuñón, J., Martín-Ventura, J.L., Gómez-Hernández, A., Blanco-Colio, L.M., Vicente, N.T., Egido, J., *Etiopatogenia y correlaciones clínicas de la aterotrombosis, in ATEROTROMBOSIS. De la disfunción endotelial a la regeneración miocárdica*, L.d. Comunicación, Editor. 2004: Madrid. p. 19-37.

REFERENCIAS

21. Martínez-González, J., Juan-Babot, O., Badimon, L., *Neovascularización de la placa aterosclerótica*, in *ATEROTROMBOSIS. De la disfunción endotelial a la regeneración miocárdica*, L.d. Comunicación, Editor. 2004: Madrid. p. 235-243.
22. Vane, J.R., E.E. Anggard, and R.M. Botting, *Regulatory functions of the vascular endothelium*. *N Engl J Med*, 1990. **323**(1): p. 27-36.
23. Ignarro, L.J., et al., *Nitric oxide as a signaling molecule in the vascular system: an overview*. *J Cardiovasc Pharmacol*, 1999. **34**(6): p. 879-86.
24. Mombouli, J.V. and P.M. Vanhoutte, *Endothelial dysfunction: from physiology to therapy*. *J Mol Cell Cardiol*, 1999. **31**(1): p. 61-74.
25. Ibanez, B., G. Vilahur, and J.J. Badimon, *Plaque progression and regression in atherothrombosis*. *J Thromb Haemost*, 2007. **5 Suppl 1**: p. 292-9.
26. Jaipersad, A.S., et al., *The role of monocytes in angiogenesis and atherosclerosis*. *J Am Coll Cardiol*, 2014. **63**(1): p. 1-11.
27. Mizutani, K., et al., *The chemokine CCL2 increases prostate tumor growth and bone metastasis through macrophage and osteoclast recruitment*. *Neoplasia*, 2009. **11**(11): p. 1235-42.
28. Badimon, L., R.F. Storey, and G. Vilahur, *Update on lipids, inflammation and atherothrombosis*. *Thromb Haemost*, 2011. **105 Suppl 1**: p. S34-42.
29. Libby, P., et al., *Inflammation in atherosclerosis: from pathophysiology to practice*. *J Am Coll Cardiol*, 2009. **54**(23): p. 2129-38.
30. Lusis, A.J., *Atherosclerosis*. *Nature*, 2000. **407**(6801): p. 233-41.
31. Kunjathoor, V.V., et al., *Scavenger receptors class A-I/II and CD36 are the principal receptors responsible for the uptake of modified low density lipoprotein leading to lipid loading in macrophages*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(51): p. 49982-8.
32. Fuster, V., *Lewis A. Conner Memorial Lecture. Mechanisms leading to myocardial infarction: insights from studies of vascular biology*. *Circulation*, 1994. **90**(4): p. 2126-46.
33. Bentzon, J.F., et al., *Mechanisms of plaque formation and rupture*. *Circ Res*, 2014. **114**(12): p. 1852-66.
34. Badimon, L., G. Vilahur, and T. Padro, *Lipoproteins, platelets and atherothrombosis*. *Rev Esp Cardiol*, 2009. **62**(10): p. 1161-78.
35. Jain, R.K., et al., *Antiangiogenic therapy for normalization of atherosclerotic plaque vasculature: a potential strategy for plaque stabilization*. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*, 2007. **4**(9): p. 491-502.
36. Kolodgie, F.D., et al., *Intraplaque hemorrhage and progression of coronary atheroma*. *N Engl J Med*, 2003. **349**(24): p. 2316-25.
37. Virmani, R., et al., *Atherosclerotic plaque progression and vulnerability to rupture: angiogenesis as a source of intraplaque hemorrhage*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005. **25**(10): p. 2054-61.
38. Toschi, V., et al., *Tissue factor modulates the thrombogenicity of human atherosclerotic plaques*. *Circulation*, 1997. **95**(3): p. 594-9.
39. Camerer, E., A.B. Kolsto, and H. Prydz, *Cell biology of tissue factor, the principal initiator of blood coagulation*. *Thromb Res*, 1996. **81**(1): p. 1-41.

40. Fuster, V., R. Corti, and J.J. Badimon, *The Mikamo Lecture 2002. Therapeutic targets for the treatment of atherothrombosis in the new millennium--clinical frontiers in atherosclerosis research*. *Circ J*, 2002. **66**(9): p. 783-90.
41. Fuster, V., et al., *Atherothrombosis and high-risk plaque: Part II: approaches by noninvasive computed tomographic/magnetic resonance imaging*. *J Am Coll Cardiol*, 2005. **46**(7): p. 1209-18.
42. Krupinski, J., et al., *Blood-borne tissue factor activity predicts major cerebrovascular events in patients undergoing carotid endarterectomy: results from a 1-year follow-up study*. *Cerebrovasc Dis*, 2008. **25**(1-2): p. 32-9.
43. Jude, B., et al., *Relevance of tissue factor in cardiovascular disease*. *Arch Mal Coeur Vaiss*, 2005. **98**(6): p. 667-71.
44. Mumford, A.D. and J.H. McVey, *Tissue factor in the myocardium: evidence of roles in haemostasis and inflammation*. *Dis Markers*, 2004. **20**(6): p. 353-8.
45. Arderiu, G., et al., *Tissue factor regulates microvessel formation and stabilization by induction of chemokine (C-C motif) ligand 2 expression*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2011. **31**(11): p. 2607-15.
46. Capoccia, B.J., A.D. Gregory, and D.C. Link, *Recruitment of the inflammatory subset of monocytes to sites of ischemia induces angiogenesis in a monocyte chemoattractant protein-1-dependent fashion*. *J Leukoc Biol*, 2008. **84**(3): p. 760-8.
47. Sanberg, P.R., et al., *Monocyte transplantation for neural and cardiovascular ischemia repair*. *J Cell Mol Med*, 2010. **14**(3): p. 553-63.
48. Bouchentouf, M., et al., *Monocyte derivatives promote angiogenesis and myocyte survival in a model of myocardial infarction*. *Cell Transplant*, 2010. **19**(4): p. 369-86.
49. Jeziorska, M. and D.E. Woolley, *Local neovascularization and cellular composition within vulnerable regions of atherosclerotic plaques of human carotid arteries*. *J Pathol*, 1999. **188**(2): p. 189-96.
50. Silvestre, J.S., et al., *Post-ischaeamic neovascularization and inflammation*. *Cardiovasc Res*, 2008. **78**(2): p. 242-9.
51. Bergers, G. and L.E. Benjamin, *Tumorigenesis and the angiogenic switch*. *Nat Rev Cancer*, 2003. **3**(6): p. 401-10.
52. Bosco, M.C., et al., *Monocytes and dendritic cells in a hypoxic environment: Spotlights on chemotaxis and migration*. *Immunobiology*, 2008. **213**(9-10): p. 733-49.
53. Kim, Y.W., X.Z. West, and T.V. Byzova, *Inflammation and oxidative stress in angiogenesis and vascular disease*. *J Mol Med (Berl)*, 2013. **91**(3): p. 323-8.
54. Wragg, J.W., et al., *Shear stress regulated gene expression and angiogenesis in vascular endothelium*. *Microcirculation*, 2014. **21**(4): p. 290-300.
55. Carmeliet, P., *Angiogenesis in health and disease*. *Nat Med*, 2003. **9**(6): p. 653-60.
56. Carmeliet, P. and R.K. Jain, *Angiogenesis in cancer and other diseases*. *Nature*, 2000. **407**(6801): p. 249-57.
57. Wietecha, M.S. and L.A. Dipietro, *Therapeutic Approaches to the Regulation of Wound Angiogenesis*. *Adv Wound Care (New Rochelle)*, 2013. **2**(3): p. 81-86.
58. The_Angiogenesis_Foundation, *The Angiogenesis Process*. www.angio.org, 2015.

REFERENCIAS

59. Johnstone, C.C. and A. Farley, *The physiological basics of wound healing*. Nurs Stand, 2005. **19**(43): p. 59-65; quiz 66.
60. Moulton, K.S., et al., *Inhibition of plaque neovascularization reduces macrophage accumulation and progression of advanced atherosclerosis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(8): p. 4736-41.
61. Woollard, K.J. and F. Geissmann, *Monocytes in atherosclerosis: subsets and functions*. Nat Rev Cardiol, 2010. **7**(2): p. 77-86.
62. Ziegler-Heitbrock, L., et al., *Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood*. Blood, 2010. **116**(16): p. e74-80.
63. Hristov, M. and G.H. Heine, *Monocyte subsets in atherosclerosis*. Hamostaseologie, 2014. **35**(1).
64. Hristov, M. and C. Weber, *Differential role of monocyte subsets in atherosclerosis*. Thromb Haemost, 2011. **106**(5): p. 757-62.
65. Czepluch, F.S., et al., *In vitro and in vivo effects of human monocytes and their subsets on new vessel formation*. Microcirculation, 2014. **21**(2): p. 148-58.
66. Shantsila, E., et al., *Monocyte subsets in coronary artery disease and their associations with markers of inflammation and fibrinolysis*. Atherosclerosis, 2014. **234**(1): p. 4-10.
67. Ancuta, P., et al., *Fractalkine preferentially mediates arrest and migration of CD16+ monocytes*. J Exp Med, 2003. **197**(12): p. 1701-7.
68. Ancuta, P., J. Wang, and D. Gabuzda, *CD16+ monocytes produce IL-6, CCL2, and matrix metalloproteinase-9 upon interaction with CX3CL1-expressing endothelial cells*. J Leukoc Biol, 2006. **80**(5): p. 1156-64.
69. Ancuta, P., A. Moses, and D. Gabuzda, *Transendothelial migration of CD16+ monocytes in response to fractalkine under constitutive and inflammatory conditions*. Immunobiology, 2004. **209**(1-2): p. 11-20.
70. Mosig, S., et al., *Different functions of monocyte subsets in familial hypercholesterolemia: potential function of CD14+ CD16+ monocytes in detoxification of oxidized LDL*. FASEB J, 2009. **23**(3): p. 866-74.
71. Rogacev, K.S., et al., *Monocyte heterogeneity in obesity and subclinical atherosclerosis*. Eur Heart J, 2010. **31**(3): p. 369-76.
72. Wildgruber, M., et al., *Monocyte subset dynamics in human atherosclerosis can be profiled with magnetic nano-sensors*. PLoS One, 2009. **4**(5): p. e5663.
73. Kowal, K., et al., *Allergen challenge differentially affects the number of circulating monocyte subsets*. Scand J Immunol, 2012. **75**(5): p. 531-9.
74. Fernandez Pujol, B., et al., *Endothelial-like cells derived from human CD14 positive monocytes*. Differentiation, 2000. **65**(5): p. 287-300.
75. Rehman, J., et al., *Peripheral blood "endothelial progenitor cells" are derived from monocyte/macrophages and secrete angiogenic growth factors*. Circulation, 2003. **107**(8): p. 1164-9.
76. Harraz, M., et al., *CD34- blood-derived human endothelial cell progenitors*. Stem Cells, 2001. **19**(4): p. 304-12.
77. Mantovani, A., et al., *The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization*. Trends Immunol, 2004. **25**(12): p. 677-86.

78. Schmeisser, A., et al., *Monocytes coexpress endothelial and macrophagocytic lineage markers and form cord-like structures in Matrigel under angiogenic conditions*. Cardiovasc Res, 2001. **49**(3): p. 671-80.
79. Moldovan, N.I., et al., *Contribution of monocytes/macrophages to compensatory neovascularization: the drilling of metalloelastase-positive tunnels in ischemic myocardium*. Circ Res, 2000. **87**(5): p. 378-84.
80. Kuwana, M., et al., *Endothelial differentiation potential of human monocyte-derived multipotential cells*. Stem Cells, 2006. **24**(12): p. 2733-43.
81. Kocaturk, B. and H.H. Versteeg, *Tissue factor-integrin interactions in cancer and thrombosis: every Jack has his Jill*. J Thromb Haemost, 2013. **11 Suppl 1**: p. 285-93.
82. Milsom, C., et al., *Diverse roles of tissue factor-expressing cell subsets in tumor progression*. Semin Thromb Hemost, 2008. **34**(2): p. 170-81.
83. van der Poll, T., *Tissue factor as an initiator of coagulation and inflammation in the lung*. Crit Care, 2008. **12 Suppl 6**: p. S3.
84. Butenas, S., *Tissue factor structure and function*. Scientifica (Cairo), 2012. **2012**: p. 964862.
85. Fiore, M.M., P.F. Neuenschwander, and J.H. Morrissey, *The biochemical basis for the apparent defect of soluble mutant tissue factor in enhancing the proteolytic activities of factor VIIa*. J Biol Chem, 1994. **269**(1): p. 143-9.
86. Ruf, W., et al., *Phospholipid-independent and -dependent interactions required for tissue factor receptor and cofactor function*. J Biol Chem, 1991. **266**(24): p. 16256.
87. Ahamed, J. and W. Ruf, *Protease-activated receptor 2-dependent phosphorylation of the tissue factor cytoplasmic domain*. J Biol Chem, 2004. **279**(22): p. 23038-44.
88. Bogdanov, V.Y., et al., *Alternatively spliced human tissue factor: a circulating, soluble, thrombogenic protein*. Nat Med, 2003. **9**(4): p. 458-62.
89. Davila, M., et al., *Microparticle association and heterogeneity of tumor-derived tissue factor in plasma: is it important for coagulation activation?* J Thromb Haemost, 2014. **12**(2): p. 186-96.
90. Nieuwland, R., et al., *Cellular origin and procoagulant properties of microparticles in meningococcal sepsis*. Blood, 2000. **95**(3): p. 930-5.
91. Lechner, D. and A. Weltermann, *Circulating tissue factor-exposing microparticles*. Thromb Res, 2008. **122 Suppl 1**: p. S47-54.
92. Maly, M.A., et al., *The role of tissue factor in thrombosis and hemostasis*. Physiol Res, 2007. **56**(6): p. 685-95.
93. Butenas, S., et al., *Tissue factor in thrombosis and hemorrhage*. Surgery, 2007. **142**(4 Suppl): p. S2-14.
94. van den Berg, Y.W., et al., *Alternatively spliced tissue factor induces angiogenesis through integrin ligation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(46): p. 19497-502.
95. Kocaturk, B. and H.H. Versteeg, *Tissue factor isoforms in cancer and coagulation: may the best isoform win*. Thromb Res, 2012. **129 Suppl 1**: p. S69-75.
96. Eisenreich, A., et al., *Overexpression of alternatively spliced tissue factor induces the pro-angiogenic properties of murine cardiomyocytic HL-1 cells*. Circ J, 2011. **75**(5): p. 1235-42.

REFERENCIAS

97. Versteeg, H.H., et al., *Inhibition of tissue factor signaling suppresses tumor growth*. Blood, 2008. **111**(1): p. 190-9.
98. Srinivasan, R. and V.Y. Bogdanov, *Splice variants of Tissue Factor and integrin-mediated signaling*. Thromb Res, 2012. **129 Suppl 2**: p. S34-7.
99. Zwicker, J.I., et al., *Tissue factor-bearing microparticles and thrombus formation*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2011. **31**(4): p. 728-33.
100. Kleinjan, A., et al., *Microparticles in vascular disorders: how tissue factor-exposing vesicles contribute to pathology and physiology*. Thromb Res, 2012. **130 Suppl 1**: p. S71-3.
101. Aleman, M.M., et al., *Differential contributions of monocyte- and platelet-derived microparticles towards thrombin generation and fibrin formation and stability*. J Thromb Haemost, 2011. **9**(11): p. 2251-61.
102. Meerarani, P., et al., *Atherothrombosis: role of tissue factor; link between diabetes, obesity and inflammation*. Indian J Exp Biol, 2007. **45**(1): p. 103-10.
103. van der Pol, E., et al., *Single vs. swarm detection of microparticles and exosomes by flow cytometry*. J Thromb Haemost, 2012. **10**(5): p. 919-30.
104. Wang, J.G., et al., *Tumor-derived tissue factor activates coagulation and enhances thrombosis in a mouse xenograft model of human pancreatic cancer*. Blood, 2012. **119**(23): p. 5543-52.
105. Eisenreich, A. and U. Rauch, *Regulation and differential role of the tissue factor isoforms in cardiovascular biology*. Trends Cardiovasc Med, 2010. **20**(6): p. 199-203.
106. Chand, H.S., S.A. Ness, and W. Kiesel, *Identification of a novel human tissue factor splice variant that is upregulated in tumor cells*. Int J Cancer, 2006. **118**(7): p. 1713-20.
107. Eisenreich, A., et al., *Cdc2-like kinases and DNA topoisomerase I regulate alternative splicing of tissue factor in human endothelial cells*. Circ Res, 2009. **104**(5): p. 589-99.
108. Ryden, L., et al., *Evidence for tissue factor phosphorylation and its correlation with protease-activated receptor expression and the prognosis of primary breast cancer*. Int J Cancer, 2010. **126**(10): p. 2330-40.
109. Collier, M.E. and C. Ettelaie, *Regulation of the incorporation of tissue factor into microparticles by serine phosphorylation of the cytoplasmic domain of tissue factor*. J Biol Chem, 2011. **286**(14): p. 11977-84.
110. van den Besselaar, A.M. and R.M. Bertina, *Interaction of thromboplastin apoprotein of different tissues with concanavalin A--evidence for heterogeneous glycosylation of the human apoprotein*. Thromb Haemost, 1984. **52**(2): p. 192-5.
111. Kothari, H., L.V. Rao, and U.R. Pendurthi, *Glycosylation of tissue factor is not essential for its transport or functions*. J Thromb Haemost, 2011. **9**(8): p. 1511-20.
112. Bach, R., W.H. Konigsberg, and Y. Nemerson, *Human tissue factor contains thioester-linked palmitate and stearate on the cytoplasmic half-cystine*. Biochemistry, 1988. **27**(12): p. 4227-31.
113. Dorfleutner, A. and W. Ruf, *Regulation of tissue factor cytoplasmic domain phosphorylation by palmitoylation*. Blood, 2003. **102**(12): p. 3998-4005.
114. Ahamed, J., et al., *Disulfide isomerization switches tissue factor from coagulation to cell signaling*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(38): p. 13932-7.

115. Chu, A.J., *Tissue factor, blood coagulation, and beyond: an overview*. Int J Inflam, 2011. **2011**: p. 367284.
116. Monroe, D.M. and N.S. Key, *The tissue factor-factor VIIa complex: procoagulant activity, regulation, and multitasking*. J Thromb Haemost, 2007. **5**(6): p. 1097-105.
117. Chen, V.M., *Tissue factor de-encryption, thrombus formation, and thiol-disulfide exchange*. Semin Thromb Hemost, 2013. **39**(1): p. 40-7.
118. Belting, M., et al., *Regulation of angiogenesis by tissue factor cytoplasmic domain signaling*. Nat Med, 2004. **10**(5): p. 502-9.
119. Rao, L.V. and U.R. Pendurthi, *Regulation of tissue factor coagulant activity on cell surfaces*. J Thromb Haemost, 2012. **10**(11): p. 2242-53.
120. Balasubramanian, K., B. Mirnikjoo, and A.J. Schroit, *Regulated externalization of phosphatidylserine at the cell surface: implications for apoptosis*. J Biol Chem, 2007. **282**(25): p. 18357-64.
121. Langer, F. and W. Ruf, *Synergies of phosphatidylserine and protein disulfide isomerase in tissue factor activation*. Thromb Haemost, 2014. **111**(4): p. 590-7.
122. Winckers, K., H. ten Cate, and T.M. Hackeng, *The role of tissue factor pathway inhibitor in atherosclerosis and arterial thrombosis*. Blood Rev, 2013. **27**(3): p. 119-32.
123. Maroney, S.A., P.E. Ellery, and A.E. Mast, *Alternatively spliced isoforms of tissue factor pathway inhibitor*. Thromb Res, 2010. **125 Suppl 1**: p. S52-6.
124. Teruel, R., et al., *Identification of miRNAs as potential modulators of tissue factor expression in patients with systemic lupus erythematosus and antiphospholipid syndrome*. J Thromb Haemost, 2011. **9**(10): p. 1985-92.
125. Zhang, X., et al., *MicroRNA-19 (miR-19) regulates tissue factor expression in breast cancer cells*. J Biol Chem, 2011. **286**(2): p. 1429-35.
126. Chuang, T.D., et al., *miR-93/106b and their host gene, MCM7, are differentially expressed in leiomyomas and functionally target F3 and IL-8*. Mol Endocrinol, 2012. **26**(6): p. 1028-42.
127. Eisenreich, A. and U. Leppert, *The impact of microRNAs on the regulation of tissue factor biology*. Trends Cardiovasc Med, 2014. **24**(3): p. 128-32.
128. Drake, T.A., J.H. Morrissey, and T.S. Edgington, *Selective cellular expression of tissue factor in human tissues. Implications for disorders of hemostasis and thrombosis*. Am J Pathol, 1989. **134**(5): p. 1087-97.
129. Osterud, B. and E. Bjorklid, *Sources of tissue factor*. Semin Thromb Hemost, 2006. **32**(1): p. 11-23.
130. Zillmann, A., et al., *Platelet-associated tissue factor contributes to the collagen-triggered activation of blood coagulation*. Biochem Biophys Res Commun, 2001. **281**(2): p. 603-9.
131. Muller, I., et al., *Intravascular tissue factor initiates coagulation via circulating microvesicles and platelets*. FASEB J, 2003. **17**(3): p. 476-8.
132. Schwertz, H., et al., *Signal-dependent splicing of tissue factor pre-mRNA modulates the thrombogenicity of human platelets*. J Exp Med, 2006. **203**(11): p. 2433-40.
133. Morrissey, J.H., *Plasma factor VIIa: measurement and potential clinical significance*. Haemostasis, 1996. **26 Suppl 1**: p. 66-71.

REFERENCIAS

134. Pawlinski, R., et al., *Hematopoietic and nonhematopoietic cell tissue factor activates the coagulation cascade in endotoxemic mice*. *Blood*, 2010. **116**(5): p. 806-14.
135. Osterud, B. and J.O. Olsen, *Human platelets do not express tissue factor*. *Thromb Res*, 2013. **132**(1): p. 112-5.
136. Giesen, P.L., et al., *Blood-borne tissue factor: another view of thrombosis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999. **96**(5): p. 2311-5.
137. Leroyer, A.S., A. Tedgui, and C.M. Boulanger, *Role of microparticles in atherothrombosis*. *J Intern Med*, 2008. **263**(5): p. 528-37.
138. Rauch, U. and Y. Nemerson, *Circulating tissue factor and thrombosis*. *Curr Opin Hematol*, 2000. **7**(5): p. 273-7.
139. Rivers, R.P., W.E. Hathaway, and W.L. Weston, *The endotoxin-induced coagulant activity of human monocytes*. *Br J Haematol*, 1975. **30**(3): p. 311-6.
140. Egorina, E.M., et al., *Intracellular and surface distribution of monocyte tissue factor: application to intersubject variability*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005. **25**(7): p. 1493-8.
141. Butenas, S., et al., *Tissue factor activity in whole blood*. *Blood*, 2005. **105**(7): p. 2764-70.
142. Pinder, P.B., J.A. Hunt, and L.R. Zacharski, *In vitro stimulation of monocyte tissue factor activity by autologous platelets*. *Am J Hematol*, 1985. **19**(4): p. 317-25.
143. Bogdanov, V.Y. and B. Osterud, *Cardiovascular complications of diabetes mellitus: The Tissue Factor perspective*. *Thromb Res*, 2010. **125**(2): p. 112-8.
144. Egorina, E.M., et al., *Granulocytes do not express but acquire monocyte-derived tissue factor in whole blood: evidence for a direct transfer*. *Blood*, 2008. **111**(3): p. 1208-16.
145. Darbousset, R., et al., *Tissue factor-positive neutrophils bind to injured endothelial wall and initiate thrombus formation*. *Blood*, 2012. **120**(10): p. 2133-43.
146. Moosbauer, C., et al., *Eosinophils are a major intravascular location for tissue factor storage and exposure*. *Blood*, 2007. **109**(3): p. 995-1002.
147. Sovershaev, M.A., et al., *No evidence for the presence of tissue factor in high-purity preparations of immunologically isolated eosinophils*. *J Thromb Haemost*, 2008. **6**(10): p. 1742-9.
148. Bevilacqua, M.P., et al., *Recombinant tumor necrosis factor induces procoagulant activity in cultured human vascular endothelium: characterization and comparison with the actions of interleukin 1*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1986. **83**(12): p. 4533-7.
149. Blum, S., et al., *An inhibitory role of the phosphatidylinositol 3-kinase-signaling pathway in vascular endothelial growth factor-induced tissue factor expression*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(36): p. 33428-34.
150. Kim, I., et al., *Angiopoietin-1 negatively regulates expression and activity of tissue factor in endothelial cells*. *FASEB J*, 2002. **16**(1): p. 126-8.
151. Arderiu, G., et al., *Tissue factor-Akt signaling triggers microvessel formation*. *J Thromb Haemost*, 2012. **10**(9): p. 1895-905.
152. Camino-Lopez, S., et al., *Aggregated low density lipoprotein induces tissue factor by inhibiting sphingomyelinase activity in human vascular smooth muscle cells*. *J Thromb Haemost*, 2009. **7**(12): p. 2137-46.

153. Taubman, M.B., et al., *Agonist-mediated tissue factor expression in cultured vascular smooth muscle cells. Role of Ca²⁺ mobilization and protein kinase C activation*. J Clin Invest, 1993. **91**(2): p. 547-52.
154. Zhang, J.C., et al., *Stimulation of tissue factor expression in human microvascular and macrovascular endothelial cells by cultured vascular smooth muscle cells in vitro*. J Vasc Res, 1999. **36**(2): p. 126-32.
155. Pena, E., G. Arderiu, and L. Badimon, *Subcellular localization of tissue factor and human coronary artery smooth muscle cell migration*. J Thromb Haemost, 2012. **10**(11): p. 2373-82.
156. Fernandez, P.M. and F.R. Rickles, *Tissue factor and angiogenesis in cancer*. Curr Opin Hematol, 2002. **9**(5): p. 401-6.
157. Rickles, F.R., S. Patierno, and P.M. Fernandez, *Tissue factor, thrombin, and cancer*. Chest, 2003. **124**(3 Suppl): p. 58S-68S.
158. Versteeg, H.H., M.P. Peppelenbosch, and C.A. Spek, *Tissue factor signal transduction in angiogenesis*. Carcinogenesis, 2003. **24**(6): p. 1009-13.
159. Han, X., et al., *Tissue factor in tumor microenvironment: a systematic review*. J Hematol Oncol, 2014. **7**: p. 54.
160. Camerer, E., et al., *Coagulation factors VII and X induce Ca²⁺ oscillations in Madin-Darby canine kidney cells only when proteolytically active*. J Biol Chem, 1996. **271**(46): p. 29034-42.
161. Rottingen, J.A., et al., *Binding of human factor VIIa to tissue factor induces cytosolic Ca²⁺ signals in J82 cells, transfected COS-1 cells, Madin-Darby canine kidney cells and in human endothelial cells induced to synthesize tissue factor*. J Biol Chem, 1995. **270**(9): p. 4650-60.
162. Camerer, E., et al., *Coagulation factors VIIa and Xa induce cell signaling leading to up-regulation of the egr-1 gene*. J Biol Chem, 1999. **274**(45): p. 32225-33.
163. Poulsen, L.K., et al., *Signal transduction via the mitogen-activated protein kinase pathway induced by binding of coagulation factor VIIa to tissue factor*. J Biol Chem, 1998. **273**(11): p. 6228-32.
164. Lavenburg, K.R., et al., *Coordinated functions of Akt/PKB and ETS1 in tubule formation*. FASEB J, 2003. **17**(15): p. 2278-80.
165. Chen, J., et al., *Akt1 regulates pathological angiogenesis, vascular maturation and permeability in vivo*. Nat Med, 2005. **11**(11): p. 1188-96.
166. Somanath, P.R., J. Chen, and T.V. Byzova, *Akt1 is necessary for the vascular maturation and angiogenesis during cutaneous wound healing*. Angiogenesis, 2008. **11**(3): p. 277-88.
167. Takano, S., et al., *Tissue factor, osteopontin, alphavbeta3 integrin expression in microvasculature of gliomas associated with vascular endothelial growth factor expression*. Br J Cancer, 2000. **82**(12): p. 1967-73.
168. Zheng, D.Q., et al., *Substrate specificity of alpha(v)beta(3) integrin-mediated cell migration and phosphatidylinositol 3-kinase/AKT pathway activation*. J Biol Chem, 2000. **275**(32): p. 24565-74.

REFERENCIAS

169. Srinivasan, R., et al., *Splice variants of tissue factor promote monocyte-endothelial interactions by triggering the expression of cell adhesion molecules via integrin-mediated signaling*. *J Thromb Haemost*, 2011. **9**(10): p. 2087-96.
170. Mackman, N. and G.E. Davis, *Blood coagulation and blood vessel development: is tissue factor the missing link?* *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2011. **31**(11): p. 2364-6.
171. American Heart Association, www.heart.org, 2015.
172. Slevin, M., J. Krupinski, and L. Badimon, *Controlling the angiogenic switch in developing atherosclerotic plaques: possible targets for therapeutic intervention*. *J Angiogenes Res*, 2009. **1**: p. 4.
173. Obeso, J., J. Weber, and R. Auerbach, *A hemangioendothelioma-derived cell line: its use as a model for the study of endothelial cell biology*. *Lab Invest*, 1990. **63**(2): p. 259-69.
174. Arderiu, G., et al., *HoxA5 stabilizes adherens junctions via increased Akt1*. *Cell Adh Migr*, 2007. **1**(4): p. 185-95.
175. Varela, O., J. Martinez-Gonzalez, and L. Badimon, *The response of smooth muscle cells to alpha-thrombin depends on its arterial origin: comparison among different species*. *Eur J Clin Invest*, 1998. **28**(4): p. 313-23.
176. Sharma, S., et al., *Cellular volume and marker expression in human peripheral blood apheresis stem cells*. *Cytometry A*, 2008. **73**(2): p. 160-7.
177. *Data on File, Report No. R-88-99-QC-195, BD Vacutainer Systems, NJ*.
178. Irvine Scientific., *Protocol for mesenchymal stem cell isolation*. www.irvinesci.com, 2015.
179. Choi, Y.B. and J. Nicholas, *Induction of angiogenic chemokine CCL2 by human herpesvirus 8 chemokine receptor*. *Virology*, 2010. **397**(2): p. 369-78.
180. Gao, S., et al., *Ubiquitin ligase Nedd4L targets activated Smad2/3 to limit TGF-beta signaling*. *Mol Cell*, 2009. **36**(3): p. 457-68.
181. Ibidi., www.ididi.com, 2015.
182. Carrio, M., et al., *Homeobox D10 induces phenotypic reversion of breast tumor cells in a three-dimensional culture model*. *Cancer Res*, 2005. **65**(16): p. 7177-85.
183. Kitahara, T., et al., *Mesangial cells stimulate differentiation of endothelial cells to form capillary-like networks in a three-dimensional culture system*. *Nephrol Dial Transplant*, 2005. **20**(1): p. 42-9.
184. Uciechowski, P., et al., *Analysis of CD16+dim and CD16+bright lymphocytes--comparison of peripheral and clonal non-MHC-restricted T cells and NK cells*. *Immunobiology*, 1992. **185**(1): p. 28-40.
185. Miltenyi Biotec., *MACS cells separation*. www.miltenyibiotec.com, 2015.
186. Lacroix, R., et al., *Standardization of platelet-derived microparticle enumeration by flow cytometry with calibrated beads: results of the International Society on Thrombosis and Haemostasis SSC Collaborative workshop*. *J Thromb Haemost*, 2010. **8**(11): p. 2571-4.
187. Sztowski, B., et al., *Alterations in myocardial tissue factor expression and cellular localization in dilated cardiomyopathy*. *J Am Coll Cardiol*, 2005. **45**(7): p. 1081-9.

188. Livak, K.J. and T.D. Schmittgen, *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method*. *Methods*, 2001. **25**(4): p. 402-8.
189. Lowry, O.H., et al., *Protein measurement with the Folin phenol reagent*. *J Biol Chem*, 1951. **193**(1): p. 265-75.
190. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. *Nature*, 1970. **227**(5259): p. 680-5.
191. Adini, A., et al., *Matrigel cytometry: a novel method for quantifying angiogenesis in vivo*. *J Immunol Methods*, 2009. **342**(1-2): p. 78-81.
192. Romon, R., et al., *Nerve growth factor promotes breast cancer angiogenesis by activating multiple pathways*. *Mol Cancer*, 2010. **9**: p. 157.
193. Davies, M.J. and A. Thomas, *Thrombosis and acute coronary-artery lesions in sudden cardiac ischemic death*. *N Engl J Med*, 1984. **310**(18): p. 1137-40.
194. Osterud, B. and E. Bjorklid, *Tissue factor in blood cells and endothelial cells*. *Front Biosci (Elite Ed)*, 2012. **4**: p. 289-99.
195. Dutra-Oliveira, A., R.Q. Monteiro, and A. Mariano-Oliveira, *Protease-activated receptor-2 (PAR2) mediates VEGF production through the ERK1/2 pathway in human glioblastoma cell lines*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2012. **421**(2): p. 221-7.
196. Trivedi, V., et al., *Platelet matrix metalloprotease-1 mediates thrombogenesis by activating PAR1 at a cryptic ligand site*. *Cell*, 2009. **137**(2): p. 332-43.
197. Buzby, J.S., et al., *Tissue factor inflammatory response regulated by promoter genotype and p38 MAPK in neonatal vs. adult microvascular endothelial cells*. *Inflamm Res*, 2014. **63**(4): p. 299-308.
198. Oku, K., et al., *Essential role of the p38 mitogen-activated protein kinase pathway in tissue factor gene expression mediated by the phosphatidylserine-dependent antiprothrombin antibody*. *Rheumatology (Oxford)*, 2013. **52**(10): p. 1775-84.
199. Folkman, J., *Fundamental concepts of the angiogenic process*. *Curr Mol Med*, 2003. **3**(7): p. 643-51.
200. Bugge, T.H., et al., *Fatal embryonic bleeding events in mice lacking tissue factor, the cell-associated initiator of blood coagulation*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996. **93**(13): p. 6258-63.
201. Toomey, J.R., et al., *Targeted disruption of the murine tissue factor gene results in embryonic lethality*. *Blood*, 1996. **88**(5): p. 1583-7.
202. van den Berg, Y.W., et al., *The relationship between tissue factor and cancer progression: insights from bench and bedside*. *Blood*, 2012. **119**(4): p. 924-32.
203. Dejana, E., A. Taddei, and A.M. Randi, *Foxs and Ets in the transcriptional regulation of endothelial cell differentiation and angiogenesis*. *Biochim Biophys Acta*, 2007. **1775**(2): p. 298-312.
204. Sato, Y., *Role of ETS family transcription factors in vascular development and angiogenesis*. *Cell Struct Funct*, 2001. **26**(1): p. 19-24.
205. Wasylyk, B., S.L. Hahn, and A. Giovane, *The Ets family of transcription factors*. *Eur J Biochem*, 1993. **211**(1-2): p. 7-18.

REFERENCIAS

206. Oda, N., M. Abe, and Y. Sato, *ETS-1 converts endothelial cells to the angiogenic phenotype by inducing the expression of matrix metalloproteinases and integrin beta3*. J Cell Physiol, 1999. **178**(2): p. 121-32.
207. Gory, S., et al., *Requirement of a GT box (Sp1 site) and two Ets binding sites for vascular endothelial cadherin gene transcription*. J Biol Chem, 1998. **273**(12): p. 6750-5.
208. Iwasaka, C., et al., *Ets-1 regulates angiogenesis by inducing the expression of urokinase-type plasminogen activator and matrix metalloproteinase-1 and the migration of vascular endothelial cells*. J Cell Physiol, 1996. **169**(3): p. 522-31.
209. Zhan, Y., et al., *Ets-1 is a critical regulator of Ang II-mediated vascular inflammation and remodeling*. J Clin Invest, 2005. **115**(9): p. 2508-16.
210. Tanaka, K., M. Abe, and Y. Sato, *Roles of extracellular signal-regulated kinase 1/2 and p38 mitogen-activated protein kinase in the signal transduction of basic fibroblast growth factor in endothelial cells during angiogenesis*. Jpn J Cancer Res, 1999. **90**(6): p. 647-54.
211. Sato, Y., et al., *Signal transduction and transcriptional regulation of angiogenesis*. Adv Exp Med Biol, 2000. **476**: p. 109-15.
212. Vandebunder, B., et al., *Complementary patterns of expression of c-ets 1, c-myb and c-myc in the blood-forming system of the chick embryo*. Development, 1989. **107**(2): p. 265-74.
213. Lelievre, E., et al., *ETS1 lowers capillary endothelial cell density at confluence and induces the expression of VE-cadherin*. Oncogene, 2000. **19**(20): p. 2438-46.
214. Aoki, T., et al., *Ets-1 promotes the progression of cerebral aneurysm by inducing the expression of MCP-1 in vascular smooth muscle cells*. Gene Ther, 2010. **17**(9): p. 1117-23.
215. Russell, L. and L.A. Garrett-Sinha, *Transcription factor Ets-1 in cytokine and chemokine gene regulation*. Cytokine, 2010. **51**(3): p. 217-26.
216. Goetze, S., et al., *TNFalpha induces expression of transcription factors c-fos, Egr-1, and Ets-1 in vascular lesions through extracellular signal-regulated kinases 1/2*. Atherosclerosis, 2001. **159**(1): p. 93-101.
217. Li, R., H. Pei, and D.K. Watson, *Regulation of Ets function by protein - protein interactions*. Oncogene, 2000. **19**(55): p. 6514-23.
218. Wasyluk, B., et al., *The c-ets proto-oncogenes encode transcription factors that cooperate with c-Fos and c-Jun for transcriptional activation*. Nature, 1990. **346**(6280): p. 191-3.
219. Kim, W.Y., et al., *Mutual activation of Ets-1 and AML1 DNA binding by direct interaction of their autoinhibitory domains*. EMBO J, 1999. **18**(6): p. 1609-20.
220. Tian, G., et al., *Transcriptional activation by ETS and leucine zipper-containing basic helix-loop-helix proteins*. Mol Cell Biol, 1999. **19**(4): p. 2946-57.
221. Dittmer, J., et al., *Regulation of parathyroid hormone-related protein (PTHrP) gene expression. Sp1 binds through an inverted CACCC motif and regulates promoter activity in cooperation with Ets1*. J Biol Chem, 1994. **269**(34): p. 21428-34.

222. Hua, X., et al., *Synergistic cooperation of TFE3 and smad proteins in TGF-beta-induced transcription of the plasminogen activator inhibitor-1 gene*. *Genes Dev*, 1998. **12**(19): p. 3084-95.
223. Lindemann, R.K., et al., *Transforming growth factor beta regulates parathyroid hormone-related protein expression in MDA-MB-231 breast cancer cells through a novel Smad/Ets synergism*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(49): p. 46661-70.
224. Nakagawa, T., et al., *TGF-beta induces proangiogenic and antiangiogenic factors via parallel but distinct Smad pathways*. *Kidney Int*, 2004. **66**(2): p. 605-13.
225. Zhang, Y., X.H. Feng, and R. Derynck, *Smad3 and Smad4 cooperate with c-Jun/c-Fos to mediate TGF-beta-induced transcription*. *Nature*, 1998. **394**(6696): p. 909-13.
226. Pardali, E., et al., *Smad and AML proteins synergistically confer transforming growth factor beta1 responsiveness to human germ-line IgA genes*. *J Biol Chem*, 2000. **275**(5): p. 3552-60.
227. Moustakas, A. and D. Kardassis, *Regulation of the human p21/WAF1/Cip1 promoter in hepatic cells by functional interactions between Sp1 and Smad family members*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998. **95**(12): p. 6733-8.
228. Fang, W.B., et al., *CCL2/CCR2 chemokine signaling coordinates survival and motility of breast cancer cells through Smad3 protein- and p42/44 mitogen-activated protein kinase (MAPK)-dependent mechanisms*. *J Biol Chem*, 2012. **287**(43): p. 36593-608.
229. Leivonen, S.K., et al., *TGF-beta-elicited induction of tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP)-3 expression in fibroblasts involves complex interplay between Smad3, p38alpha, and ERK1/2*. *PLoS One*, 2013. **8**(2): p. e57474.
230. Liu, Y. and B.M. Mueller, *Protease-activated receptor-2 regulates vascular endothelial growth factor expression in MDA-MB-231 cells via MAPK pathways*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006. **344**(4): p. 1263-70.
231. DeFea, K.A., et al., *beta-arrestin-dependent endocytosis of proteinase-activated receptor 2 is required for intracellular targeting of activated ERK1/2*. *J Cell Biol*, 2000. **148**(6): p. 1267-81.
232. Chung, H., et al., *Proteinase-activated receptor-2 transactivation of epidermal growth factor receptor and transforming growth factor-beta receptor signaling pathways contributes to renal fibrosis*. *J Biol Chem*, 2013. **288**(52): p. 37319-31.
233. Li, J.H., et al., *Advanced glycation end products activate Smad signaling via TGF-beta-dependent and independent mechanisms: implications for diabetic renal and vascular disease*. *FASEB J*, 2004. **18**(1): p. 176-8.
234. Mauro, A., et al., *PKCalpha-mediated ERK, JNK and p38 activation regulates the myogenic program in human rhabdomyosarcoma cells*. *J Cell Sci*, 2002. **115**(Pt 18): p. 3587-99.
235. Yakymovych, I., et al., *Regulation of Smad signaling by protein kinase C*. *FASEB J*, 2001. **15**(3): p. 553-5.
236. Carmeliet, P., et al., *Role of tissue factor in embryonic blood vessel development*. *Nature*, 1996. **383**(6595): p. 73-5.
237. Ross, R., *The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s*. *Nature*, 1993. **362**(6423): p. 801-9.

REFERENCIAS

238. Ribatti, D., F. Levi-Schaffer, and P.T. Kovanen, *Inflammatory angiogenesis in atherogenesis—a double-edged sword*. *Ann Med*, 2008. **40**(8): p. 606-21.
239. Napoleone, E., A. Di Santo, and R. Lorenzet, *Monocytes upregulate endothelial cell expression of tissue factor: a role for cell-cell contact and cross-talk*. *Blood*, 1997. **89**(2): p. 541-9.
240. Leibovich, S.J., et al., *Macrophage-induced angiogenesis is mediated by tumour necrosis factor-alpha*. *Nature*, 1987. **329**(6140): p. 630-2.
241. Stefater, J.A., 3rd, et al., *Regulation of angiogenesis by a non-canonical Wnt-Flt1 pathway in myeloid cells*. *Nature*, 2011. **474**(7352): p. 511-5.
242. Stefater, J.A., 3rd, et al., *Macrophage Wnt-Calcineurin-Flt1 signaling regulates mouse wound angiogenesis and repair*. *Blood*, 2013. **121**(13): p. 2574-8.
243. Takada, R., et al., *Monounsaturated fatty acid modification of Wnt protein: its role in Wnt secretion*. *Dev Cell*, 2006. **11**(6): p. 791-801.
244. Willert, K., et al., *Wnt proteins are lipid-modified and can act as stem cell growth factors*. *Nature*, 2003. **423**(6938): p. 448-52.
245. Logan, C.Y. and R. Nusse, *The Wnt signaling pathway in development and disease*. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2004. **20**: p. 781-810.
246. Port, F. and K. Basler, *Wnt trafficking: new insights into Wnt maturation, secretion and spreading*. *Traffic*, 2010. **11**(10): p. 1265-71.
247. Masckauchan, T.N., et al., *Wnt5a signaling induces proliferation and survival of endothelial cells in vitro and expression of MMP-1 and Tie-2*. *Mol Biol Cell*, 2006. **17**(12): p. 5163-72.
248. Sherwood, V., *WNT signaling: an emerging mediator of cancer cell metabolism?* *Mol Cell Biol*, 2015. **35**(1): p. 2-10.
249. Ishikawa, T., et al., *Mouse Wnt receptor gene Fzd5 is essential for yolk sac and placental angiogenesis*. *Development*, 2001. **128**(1): p. 25-33.
250. Parry, G.C. and N. Mackman, *Transcriptional regulation of tissue factor expression in human endothelial cells*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1995. **15**(5): p. 612-21.
251. Holschermann, H., et al., *Opposite regulation of tissue factor expression by calcineurin in monocytes and endothelial cells*. *J Immunol*, 2001. **166**(12): p. 7112-20.
252. Cheng, C.W., et al., *Wnt5a-mediated non-canonical Wnt signalling regulates human endothelial cell proliferation and migration*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008. **365**(2): p. 285-90.
253. Mill, C. and S.J. George, *Wnt signalling in smooth muscle cells and its role in cardiovascular disorders*. *Cardiovasc Res*, 2012. **95**(2): p. 233-40.
254. Brand, K., et al., *Activated transcription factor nuclear factor-kappa B is present in the atherosclerotic lesion*. *J Clin Invest*, 1996. **97**(7): p. 1715-22.
255. Grivennikov, S.I. and M. Karin, *Dangerous liaisons: STAT3 and NF-kappaB collaboration and crosstalk in cancer*. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2010. **21**(1): p. 11-9.
256. Hoeben, A., et al., *Vascular endothelial growth factor and angiogenesis*. *Pharmacol Rev*, 2004. **56**(4): p. 549-80.
257. Hoefler, I.E., et al., *Direct evidence for tumor necrosis factor-alpha signaling in arteriogenesis*. *Circulation*, 2002. **105**(14): p. 1639-41.

258. Marumo, T., V.B. Schini-Kerth, and R. Busse, *Vascular endothelial growth factor activates nuclear factor-kappaB and induces monocyte chemoattractant protein-1 in bovine retinal endothelial cells*. *Diabetes*, 1999. **48**(5): p. 1131-7.
259. Sakamoto, T., et al., *Endogenous NO blockade enhances tissue factor expression via increased Ca²⁺ influx through MCP-1 in endothelial cells by monocyte adhesion*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005. **25**(9): p. 2005-11.
260. Elsheikh, E., et al., *Only a specific subset of human peripheral-blood monocytes has endothelial-like functional capacity*. *Blood*, 2005. **106**(7): p. 2347-55.
261. Schlitt, A., et al., *CD14+CD16+ monocytes in coronary artery disease and their relationship to serum TNF-alpha levels*. *Thromb Haemost*, 2004. **92**(2): p. 419-24.
262. Tapp, L.D., et al., *The CD14++CD16+ monocyte subset and monocyte-platelet interactions in patients with ST-elevation myocardial infarction*. *J Thromb Haemost*, 2012. **10**(7): p. 1231-41.
263. Ghattas, A., et al., *Monocytes in coronary artery disease and atherosclerosis: where are we now?* *J Am Coll Cardiol*, 2013. **62**(17): p. 1541-51.
264. Swirski, F.K. and M. Nahrendorf, *Macrophage-stem cell crosstalk after myocardial infarction*. *J Am Coll Cardiol*, 2013. **62**(20): p. 1902-4.
265. Movahedi, K., et al., *Different tumor microenvironments contain functionally distinct subsets of macrophages derived from Ly6C(high) monocytes*. *Cancer Res*, 2010. **70**(14): p. 5728-39.
266. Fenyó, I.M. and A.V. Gafencu, *The involvement of the monocytes/macrophages in chronic inflammation associated with atherosclerosis*. *Immunobiology*, 2013. **218**(11): p. 1376-84.
267. Pamukcu, B., et al., *The role of monocytes in atherosclerotic coronary artery disease*. *Ann Med*, 2010. **42**(6): p. 394-403.
268. Shantsila, E., T. Watson, and G.Y. Lip, *Endothelial progenitor cells in cardiovascular disorders*. *J Am Coll Cardiol*, 2007. **49**(7): p. 741-52.
269. Sharifi, B.G., et al., *Pleiotrophin induces transdifferentiation of monocytes into functional endothelial cells*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2006. **26**(6): p. 1273-80.
270. Ancuta, P., et al., *Transcriptional profiling reveals developmental relationship and distinct biological functions of CD16+ and CD16- monocyte subsets*. *BMC Genomics*, 2009. **10**: p. 403.
271. Favre, J., N. Terborg, and A.J. Horrevoets, *The diverse identity of angiogenic monocytes*. *Eur J Clin Invest*, 2013. **43**(1): p. 100-7.
272. Bohgaki, M. and H. Kitaguchi, *Conversion of cultured monocytes/macrophages into endothelial-like cells through direct contact with endothelial cells*. *Int J Hematol*, 2007. **86**(1): p. 42-8.

APÉNDICE

MUTACIONES EN LA SECUENCIA DEL FACTOR TISULAR

1ATGGAGACCCTGCCT
 1-M--E--T--P--A--

17 GGCCC CGG GTC CCG CGC CCC GAG ACC GCC GTG GCT CCG ACC CTC TCG GCT CGG GTC T
 6 W--P--R--V--P--R--P--E--T--A--V--A--R--T--L--L--L--G--W--V--

77 TCGCCCAGGTGCGCGCGCTTCAGGCCACTACAATACTGTGGCAGCATATAATTTAACTT
 26 F--A--Q--V--A--G--A--S--G--T--T--N--T--V--A--A--Y--N--L--T--

137 GGAAATCAACTAATTTCAACAATT TTGGAGTGGGAAACCCAAACCGTCAATCAAGTCT
 46 W--K--S--T--N--F--K--T--I--L--E--W--E--P--K--P--V--N--Q--V--
 Lys20 (K20)

197 ACACTGTTCAAATAAGCACTAAGTCAGGAGATTGGAAAAGCAAATGCTTTTACACAACAG
 66 Y--T--V--Q--I--S--T--K--S--G--D--W--K--S--K--C--F--Y--T--T--

257 ACACAGAGTGTACTCTACCCGACGAGATTGTGAAGGATGTGAAGCAGACGTACTTTGGCAC
 86 D--T--E--C--D--L--T--D--E--I--V--K--D--V--K--Q--T--Y--L--A--
 Asp58 (D58)

317 GGGTCTTCTCC TACCCTGCAGGGAATGTGGAGAGCACCGGTTCTGTCTGGGAGCCTCTGT
 106 R--V--F--S--Y--P--A--G--N--V--E--S--T--G--S--A--G--E--P--L--

377 ATGAGAACTCCCCAGAGTTTACACCTTACCTGGAGACAACCTCGGACAGCCAACAATTC
 126 Y--E--N--S--P--E--F--T--P--Y--L--E--T--N--L--G--Q--P--T--I--

437 AGAGTTTTGAA CAGGTGGGAACAAAAGTGAATGTGACCGTAGAAGATGAAAGGACTTTAG
 146 Q--S--F--E--Q--V--G--T--K--V--N--V--T--V--E--D--E--R--T--L--

497 TCAGAAGGAACAACACTCTAAGCCTCCGGGATGTTTTTGGCAAGGACTTAATTTATA
 166 V--R--R--N--N--T--F--L--S--L--R--D--V--F--G--K--D--L--I--Y--
 Phe140 (F140)

557 CACTTTATTATTGGAAATCTTCAAGTTCAGGAAAGAAAACAGCCAAAACAACACTAATG
 186 T--L--Y--Y--W--K--S--S--S--S--G--K--K--T--A--K--T--N--T--N--

617 AGTTTTTGATTGATGTGGATAAAGGAGAAAAC TACGTTTTCAGTGTTC AAGCAGTGATTC
 206 E--F--L--I--D--V--D--K--G--E--N--Y--C--F--S--V--Q--A--V--I--

677 CCTCCGGAACAGTTAACCGGAAGAGTACAGACAGCCGGTAGAGTGTATGGCC CAGGAGA
 226 P--S--R--T--V--N--R--K--S--T--D--S--P--V--E--C--M--G--Q--E--

737 AAGGGGAATTCAGAGAAATATTCATCATTTGGAGCTGTGGTATTTGTGGTCATCATCC
 246 K--G--E--F--R--E--I--F--Y--I--I--G--A--V--V--F--V--V--I--I--

797 TTGTCATCATCCTGGCTATACTCTACACAAGTGTAGAAAGGCAGAGTGGGGCAGAGCT
 266 L--V--I--I--L--A--I--S--L--H--K--C--R--K--A--G--V--G--Q--S--

inicio dominio citoplasmático

857 GGAAGGAGAACTCCCCACTGAATGTTTCATAAA
 286 W--K--E--N--S--P--L--N--V--S--*--

Figura Suplementaria 1. Secuencia nucleotídica y proteica del FT. Se enumeran los nucleótidos (1 en el primer nucleótido del origen de traducción) y los aminoácidos (1 en la metionina inicial). Los codones se diferencian por alternancia de color. La secuencia correspondiente al péptido líder está subrayada (aminoácidos 1-32), al igual que la secuencia correspondiente al dominio transmembrana (aminoácidos 252-274). El codón de parada TAA está señalado en rojo. El inicio del dominio citoplasmático en el aminoácido 275 se indica en azul. Los aminoácidos K20, D58 y F140 mutados a Ala en la construcción del *FTmut*, están señalados en verde.

MUTACIONES EN LA SECUENCIA DEL PROMOTOR DE CCL2

-560 aaaccctagaactcttagaattcagttcaatgtttacacaatcctacagttctgctagg
 -501 cttctatgatgctactattctgcatttgaatgagcaaatggatttaatgcattgtcaggg
 -441 agccggcctaaagcttgagagctccttcctggctgggagggcccttggaatgtggcctgaa
 -381 ggtaagctggcagcgagcctgacatgctttcatctagtttcctcgcttccttctctttct
 -321 gcagttttcgcttcagagaaagcagaatccttaaaaaataaccctcttagttcacatctgt
 -261 ggtcaggtctgggcttaatggcaccatcctccccatttgctcatttgggtctcagcagtg
 -201 aatggaaaaagtgtctcgtcctgacccctgcttccttctctacttctctggaaatccac
 -141 aggatgctgcatttgctcagcagatttaacagcccacttatcactcatggaagatccctc
 -81 ctctgcttgactccgcccctctctccctctgcccgtttcaataagggcagagacagca
 -21 gccagaggaaccgagaggtgAGACTAACCCAGAAACATCCAAT
 TCTCAAACCTGAAGCTCGCACTCTCGCCT

Figura Suplementaria 2. Secuencia nucleotídica del promotor de CCL2 (-560 a +60 pb). Los lugares de unión de SMAD3 (-253 pb) y de ETS1 (-154 pb) aparecen subrayados en rojo. La región 5' UTR está destacada en mayúsculas.

PARTICIPACIÓN DE LA DOCTORANDA EN LOS ARTÍCULOS PUBLICADOS

La Prof. Lina Badimon Maestro y la Dra. Gemma Arderiu Marquès, como co-directoras de la tesis doctoral de Sonia Espinosa Ferrer, certifican que la contribución de la doctoranda en los artículos presentados en esta tesis ha sido la siguiente:

- **Artículo I**, *Ets-1 transcription is required in tissue factor driven microvessel formation and stabilization*. *Angiogenesis*, 2012. **15**(4): p. 657-69. Factor de impacto (2013) 4,410. Realizó los experimentos que configuran las figuras 1, 4, S1 y S5 y participó en la redacción del artículo.
- **Artículo II**, *PAR2/SMAD3 in microvascular endothelial cells is indispensable for vascular stability via tissue factor signaling*. *Journal of Molecular Cell Biology* (2015, bajo revisión), Factor de impacto 8,432 (2013). Realizó los experimentos de las figuras 1, 2, 3, 6, S3, S4, S5 y S11, así como participó en la redacción del artículo.
- **Artículo III**, *Monocyte-secreted Wnt5a interacts with FZD5 in microvascular endothelial cells and induces angiogenesis through tissue factor signaling*. *J Mol Cell Biol*, 2014. **6**(5): p. 380-93. Factor de impacto 8,432 (2013). Realizó los experimentos de las figuras 1, 2A, 3, 4, 5A, 5B, 5D, 5E, S1, S2A, S2B, S3, S4, S5 y colaboró en la elaboración de los experimentos de las figuras 6, 7, S8 y S9. Además, participó en la redacción del artículo.
- **Artículo IV**, *Alternative spliced tissue factor from endothelial cells mediates CD14⁺CD16⁺ monocytes transdifferentiation into endothelial-like cells* (en preparación). Realizó los experimentos de las figuras 1, 2, 3, 4, 5 y 6 y redactó el artículo.

Además, certifican que estos artículos no han sido incluidos en otra tesis doctoral.

Firmado,

Prof. Lina Badimon Maestro

Dra. Gemma Arderiu Marquès

