



universidad
de león



FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES

**MODELOS CELULARES DE INTERÉS
BIOMÉDICO PARA EL ESTUDIO DE LA
ANGIOGÉNESIS**

**CELLULAR MODELS OF BIOMEDICAL
INTEREST FOR THE STUDY OF ANGIOGENESIS**

Leyre Cuesta Martín

GRADO EN BIOTECNOLOGÍA

Julio, 2020

En León, a 30 de junio de 2020

Fdo.: Leyre Cuesta Martín

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Leyre Cuesta', with a stylized flourish at the end.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	2
MATERIALES Y MÉTODOS	3
1. Métodos bibliográficos	3
2. Materiales y métodos experimentales	3
2.1 Líneas celulares: cultivo y mantenimiento	3
2.2 Ensayos de cinética de crecimiento y viabilidad celular	5
2.3 Ensayo de cierre de herida.....	5
2.4 Ensayo de formación de tubos.....	6
2.5 Análisis estadístico	6
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	6
1. Bases moleculares y celulares de la angiogénesis y su relevancia biomédica	6
1.1 Etapas del proceso angiogénico.....	6
1.1.1 Fase de activación.....	6
1.1.2 Fase de resolución y maduración	8
1.2 Principales rutas de señalización relacionadas con la regulación del proceso angiogénico.....	9
1.2.1 Señalización mediada por VEGF y sus receptores	9
1.2.2 Señalización mediada por Notch y sus ligandos en la selección de las células punta	10
1.2.3 Señalización mediada por angiopoyetinas y sus receptores	10
1.3 Angiogénesis en condiciones patológicas	11
1.3.1 Angiogénesis y cáncer.....	12
2. Modelos de estudio de la angiogénesis. Ventajas y desventajas	13
2.1 Modelos <i>in vivo</i>	13
2.1.1 Pez cebra	13
2.1.2 Modelos oculares	14
2.1.3 Implantación de polímeros y esponjas sintéticas	14
2.1.4 Implantación de cámaras transparentes en la piel	14
2.1.5 Modelos de implantación tumoral.....	15
2.2 Ventajas y limitaciones de los modelos <i>in vivo</i>	15
2.3 Ensayos <i>in vitro</i> con cultivos de órganos (<i>ex vivo</i>)	16
2.4 Ensayos <i>in vitro</i> con cultivos de células endoteliales en dos dimensiones (2D).....	16

2.4.1 Ensayos de proliferación.....	16
2.4.2 Ensayos de migración	17
2.4.3 Ensayos de morfogénesis.....	17
2.5 Ensayos <i>in vitro</i> con cultivos en tres dimensiones (3D).....	18
2.5.1 Ensayos <i>in vitro</i> con células endoteliales en co-cultivo	18
2.5.2 Ensayos <i>in vitro</i> con células troncales en 3D	19
2.6 Ventajas y limitaciones de los ensayos <i>in vitro</i>	20
3. Puesta a punto de ensayos angiogénicos básicos utilizando cultivos primarios de células endoteliales de aorta bovina.....	22
3.1 Ensayos de cinética de crecimiento y viabilidad.....	22
3.2 Ensayos de migración.....	25
3.3 Ensayos de morfogénesis	26
CONCLUSIONES	27
REFERENCIAS	28

RESUMEN

La angiogénesis es el proceso por el cual se forman los vasos sanguíneos a partir de un lecho vascular preexistente. Juega un papel clave en el mantenimiento de la homeostasis del organismo, de tal forma que alteraciones en su regulación dan lugar a patologías tales como el cáncer. Actualmente, se han desarrollado distintos métodos para el estudio del proceso con el objetivo de buscar fármacos que lo modulen. En este contexto, se plantea si los modelos celulares son fundamentales para este fin. Por ello, se ha realizado una revisión bibliográfica con el objetivo de realizar un estudio de los mecanismos moleculares y celulares de dicho proceso, su relevancia biomédica y de los distintos modelos de estudio que se utilizan en la actualidad. Mientras que los modelos celulares son fundamentales en el estudio de la angiogénesis y la identificación de fármacos, el uso de modelos animales es aún necesario para la obtención de información sobre el proceso completo. No obstante, se están desarrollando técnicas innovadoras tales como las tecnologías microfluídicas con células troncales humanas que podrían reproducir los procesos angiogénicos que ocurren *in vivo*. Paralelamente, se ha puesto a punto el cultivo de células endoteliales de aorta bovina, determinando su densidad óptima de siembra en 6×10^3 células/cm², así como la capacidad de migración y morfogénesis celular en respuesta a un agente quimioterapéutico, el etopósido, resultando únicamente la capacidad de morfogénesis afectada.

PALABRAS CLAVE

Angiogénesis, BAEC, células endoteliales, ensayos angiogénicos, mecanismos moleculares, modelos celulares.

ABSTRACT

Angiogenesis is the formation of blood vessels from preexisting vasculature. It is a key process in the maintenance of the organism homeostasis. Thus, alterations in its regulation give rise to pathologies such as cancer. Currently, different methods have been developed to assess angiogenesis in order to look for drugs that modulate it. In this context, it is asked whether cellular models are fundamental for this purpose. For this reason, a bibliographic review has been carried out with the aim of conducting a study of the molecular and cellular mechanisms of this process, its biomedical relevance and the different study models currently used. While cellular models are essential in the assessment of angiogenesis and drug identification, the use of animal models is necessary for obtaining information about the complete process. However, innovative techniques, such as microfluidic technologies with human stem cells, which could mimic the angiogenic mechanisms that occur *in vivo*, are being developed. In parallel, culture of bovine aortic endothelial cells has been developed and their optimal seeding density has been determined (6×10^3 cells/cm²), as well as the cell migration and morphogenesis capacities in response to a chemotherapeutic agent, etoposide, which only affects the morphogenesis capacity.

KEY WORDS

Angiogenesis, angiogenic assays, BAEC, cellular models, endothelial cells, molecular mechanisms.

ABREVIATURAS

AKT	Proteína quinasa B
Ang-1/2	Angiopoyetina 1/2
AT	Azul de tripán
BAEC	Células endoteliales de aorta bovina
CE	Célula endotelial
DMEM	Medio mínimo esencial de Eagle modificado por Dubelcco
DMSO	Dimetilsulfóxido
EB	Cuerpo embrioide
ECGS	Suplemento de factor de crecimiento de células endoteliales procedente de pituitaria bovina
ERK	Quinasa regulada por señales extracelulares
ESC	Célula troncal embrionaria
FAK	Quinasas asociadas a adhesiones focales
FBS	Suero fetal bovino
FGF	Factor de crecimiento fibroblástico
HUVEC	Células endoteliales de vena de cordón umbilical humana
iPSC	Célula troncal pluripotencial inducida
LB	Lámina basal
LIF	Factor inhibidor de leucemia
MAPK	Proteínas quinasas activadas por mitógenos
MEC	Matriz extracelular
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol
PBS	Tampón fosfato salino
PD/PDT	Duplicación poblacional / tiempo de duplicación poblacional
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PI3K	Fosfoinosítido-3 quinasas
PIGF	Factor de crecimiento placentario
TGF- β	Factor de crecimiento transformante beta
VE-cadherina	Cadherina del endotelio vascular
VEGF/R	Factor de crecimiento/ receptor del factor de crecimiento endotelial vascular

INTRODUCCIÓN

Los vasos sanguíneos constituyen una red compleja de estructuras tubulares y huecas que permite la distribución de la sangre por todo el organismo. Este sistema posibilita el intercambio de gases y el transporte de nutrientes, hormonas y células del sistema inmune, así como la eliminación de desechos de los tejidos (Carmeliet y Jain, 2011).

El sistema vascular periférico está compuesto por distintos tipos de vasos sanguíneos en función de su estructura morfológica, lo que les confiere diferentes funciones dentro del cuerpo (Viallard y Larrivé, 2017). La superficie interna de los vasos sanguíneos se compone por una monocapa de células endoteliales (CEs) interconectadas entre sí por moléculas de unión tales como la cadherina endotelial vascular (VE-cadherina) o las claudinas, estableciendo uniones intercelulares adherentes y estrechas, respectivamente (Ribatti y Crivellato, 2012). Además, las CEs están asociadas a una lámina basal (LB) y se encuentran rodeadas por células murales o perivasculares, que participan en el mantenimiento de la cohesión entre las propias CEs y la LB, controlando la permeabilidad vascular. Los vasos de mayor calibre (arterias y venas) se encuentran rodeados por células musculares lisas, mientras que los vasos de menor calibre (arteriolas, vénulas y capilares) se encuentran cubiertos por células especializadas llamadas pericitos, que a su vez están involucrados en la maduración y estabilización de los vasos y, además, participan en la diferenciación y proliferación de las CEs a través del contacto directo con ellas (Viallard y Larrivé, 2017).

La formación del sistema cardiovascular es indispensable para la supervivencia de los organismos vertebrados, siendo este sistema el primero que se forma durante el desarrollo embrionario (Carmeliet y Jain, 2011). Existen dos mecanismos principales para la formación de vasos sanguíneos, la vasculogénesis y la angiogénesis. La vasculogénesis es el proceso por el cual se forman los vasos sanguíneos en las etapas tempranas del desarrollo embrionario. Estos vasos se forman *de novo* a partir de precursores endoteliales mesodérmicos llamados angioblastos, que primero se agrupan en islas y después se ensamblan para formar plexos vasculares primarios, que se expanden y modifican mediante angiogénesis para formar las redes complejas y jerarquizadas que constituyen el sistema vascular funcional. El término angiogénesis, por lo tanto, indica la formación de vasos sanguíneos a partir de un lecho vascular preexistente (Potente y Mäkinen, 2017; Fallah *et al.*, 2019).

Existen dos tipos de procesos angiogénicos: mediante la formación de nuevos vasos que “brotan” de los preexistentes, que es el mecanismo más común de angiogénesis; y mediante la

división de los vasos a través de la formación de pilares transluminales. Mientras que en el primer caso se trata de un mecanismo invasivo, el segundo caso aporta complejidad a la red vascular preexistente (Díaz-Flores *et al.*, 2017).

En el individuo adulto, el endotelio se mantiene en estado quiescente y la angiogénesis queda restringida a un número limitado de condiciones fisiológicas como son la curación de heridas, el ciclo ovárico y endometrial femenino, así como el desarrollo de la placenta durante el embarazo. Sin embargo, la angiogénesis juega un rol importante en diversos procesos patológicos como son la progresión tumoral o la enfermedad isquémica cardiovascular (Carmeliet y Jain, 2011).

El estado de quiescencia del endotelio está controlado por un balance entre señales pro-angiogénicas y anti-angiogénicas producidas tanto por las propias CEs, como por su entorno. Las moléculas activadoras de la angiogénesis son principalmente moduladores paracrinos cuya unión a los receptores de membrana de las CEs desencadena cascadas de señalización que modulan tanto la proliferación, supervivencia y migración de las mismas, como la degradación de la LB y de la matriz extracelular (MEC). Entre ellos, cabe destacar el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), el factor de crecimiento placentario (PIGF), los factores de crecimiento fibroblásticos (FGFs) y las angiopoyetinas 1/2 (Ang-1/2) (Carmeliet y Jain, 2011; Fallah *et al.*, 2019). Por otra parte, los inhibidores endógenos de la angiogénesis son proteínas o fragmentos de las mismas tales como la endostatina y la angiostatina. Muchos de ellos provienen de la MEC y se liberan cuando esta es degradada por proteólisis (Ribatti, 2009).

El proceso angiogénico abarca una serie de eventos coordinados y secuenciales que finalizan con la aparición de nuevos vasos en tejidos que necesitan un mayor aporte sanguíneo. La respuesta angiogénica y los mecanismos que la impulsan pueden variar espacialmente y temporalmente, mostrando características distintas en diferentes sitios a lo largo de la red vascular y dentro de diferentes órganos, a diferentes edades y en diferentes estados fisiológicos o patológicos. Por todo esto, es crucial entender los mecanismos celulares, moleculares y mecánicos involucrados en el proceso para diseñar mejores herramientas que permitan impulsar la angiogénesis fisiológica y modular la angiogénesis patológica (Irvin *et al.*, 2014).

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Nuestra hipótesis de trabajo es que los modelos celulares son fundamentales para el estudio de la angiogénesis y la búsqueda de fármacos, con interés biomédico, que modulen el proceso. Sin embargo, es difícil identificar un modelo que recapitule todos los eventos que tienen lugar en

el proceso angiogénico, por ello, el objetivo general de este trabajo es realizar un estudio en profundidad de los mecanismos del proceso angiogénico, su relevancia biomédica y de los distintos modelos que se han desarrollado para su estudio. Paralelamente, se pretende la puesta a punto del cultivo de CEs y de algunos de los ensayos descritos. Para llevarlo a cabo, los objetivos específicos fueron:

1. Realizar un estudio de las bases moleculares y celulares de la angiogénesis y su relevancia biomédica.
2. Llevar a cabo un compendio de los principales modelos de estudio de la angiogénesis *in vivo* e *in vitro*.
3. Poner a punto ensayos angiogénicos básicos utilizando cultivos primarios de células endoteliales de aorta bovina (BAEC).

MATERIALES Y MÉTODOS

Este trabajo de fin de grado ha cursado con una parte bibliográfica, en la que se revisan las bases moleculares de la angiogénesis y los principales modelos utilizados para el estudio del proceso; y una parte experimental, en la que se pone a punto el cultivo de CEs primarias, así como algunas de las técnicas básicas de evaluación de la angiogénesis *in vitro*.

1. Métodos bibliográficos

Las búsquedas se realizaron en *Google Scholar* y en las bases de datos *PubMed* y *Science Direct*. Se optó por una estrategia de búsqueda adaptada a las bases de datos utilizando varias palabras clave unidas por los operadores booleanos AND y OR. Se emplearon palabras clave tales como “*angiogenesis*”, “*assays*”, “*models*”, “*molecular*”, “*regulation*”, “o “*diseases*”. Una vez realizada una búsqueda intensiva de revisiones para estructurar el trabajo, se realizó una segunda búsqueda más específica en las bases de datos mencionadas y en las referencias de las revisiones para profundizar en determinados aspectos.

Los criterios de inclusión que se utilizaron fueron los siguientes: artículos publicados en inglés a partir del 2005 y que respondiesen a los objetivos planteados. Se excluyeron todos los artículos que no cumplieron estos requisitos.

2. Materiales y métodos experimentales

2.1 Líneas celulares: cultivo y mantenimiento

Las BAEC se cultivan en un medio específico, descrito en la **Tabla 1**, siguiendo las técnicas correctas de asepsia y normas de seguridad del laboratorio de cultivos celulares y se

mantuvieron en un incubador (THERMO Electro Corporation) de atmósfera húmeda, a 37°C y 5% CO₂.

Tabla 1. Composición del medio de cultivo para BAEC.

Componente (concentración final en el medio)	Referencia
Medio mínimo esencial de Eagle modificado por Dubelcco (DMEM)	SIGMA#D5671
20% suero fetal bovino (FBS)	SIGMA#F7524
2 mM L-Glutamina	SIGMA#G7513
100 U/ml penicilina + 0,1 mg/ml streptomina	SIGMA#P4333
30 µg/ml suplemento de factor de crecimiento de células endoteliales procedente de pituitaria bovina (ECGS)	SIGMA#E0760

La línea celular utilizada había sido previamente establecida en el laboratorio de diferenciación celular y desarrollo de modelos celulares (MODCELL) del IBIOMED de la Universidad de León a partir de aortas de terneras. Las células se descongelan en un baño a 37°C, se resuspenden en 9 ml de medio de cultivo y se centrifugan durante 5 min a 1.000 rpm, se retira el sobrenadante y las células se resuspenden en 8 ml de medio de cultivo. A continuación, se siembran en un frasco de T25 y se incuban en atmósfera húmeda a 37°C y 5% CO₂ durante 24 h, tras lo cual se cambia el medio.

Los subcultivos se realizan a las 48 h de la siembra. La densidad de siembra es de 13×10^3 células/cm² en frascos T25.

Recuento celular con exclusión por azul de tripán (AT). Para determinar la concentración celular obtenida de los cultivos, se lavan las células con tampón fosfato salino (PBS, Gibco#18912-014), se añade tripsina y se incuban durante 3 a 5 min a 37°C. Pasado ese tiempo, se resuspenden en medio completo. A continuación, se utiliza una fracción del cultivo para llevar a cabo el recuento celular. Los recuentos celulares se realizan en cámara de Neubauer. Con el fin de excluir las células muertas, se utiliza el colorante AT (dilución 1:2, SIGMA#T8154). El AT es un colorante vital, por lo que solo las células muertas, con la membrana dañada, son permeables al paso del mismo, tiñéndose de azul. El recuento total se divide entre el número de áreas contadas, obteniendo así la media de número de células por cuadrante. La concentración celular (células/ml) se obtiene tras realizar la siguiente multiplicación: media de número de células por cuadrante x factor de dilución x 10.000.

Congelación y almacenaje celular. El medio se cambia 24 h antes de realizar el protocolo de congelación. Se realiza el recuento de las células en fase 3, se centrifugan durante 5 min a 1.000 rpm y se resuspenden en medio de congelación filtrado (FBS suplementado con 10%

dimetilsulfóxido (DMSO, SIGMA#D26500)). Finalmente, se deposita la suspensión celular en viales de congelación (1 ml/vial) a una concentración final de $2,8 \times 10^6$ células/vial. Seguidamente, las células se incuban a -80°C durante 24 h y, transcurrido ese periodo, se depositan en nitrógeno líquido para su almacenaje.

2.2 Ensayos de cinética de crecimiento y viabilidad celular

Curva de crecimiento diaria. Las células se siembran en placas multipocillos P12 a 3 densidades diferentes (6×10^3 , 13×10^3 y 20×10^3 células/cm², 6 pocillos por densidad celular) en 2 ml/pocillo de medio de cultivo. Durante los 6 días siguientes se realizan fotografías (aumentos 5X, 10X y 20X con un microscopio de contraste de fases (Leica) y una cámara digital (Leica)) y el recuento de células de 1 pocillo por cada densidad sembrada, siguiendo el protocolo de recuento antes descrito. Además, el cultivo celular se examina diariamente para observar posible contaminación y la morfología y confluencia celular. Con los resultados obtenidos se calculan la duplicación poblacional (PD) y el tiempo de duplicación poblacional (PDT) en intervalos de 24 h. Para ello se emplean las siguientes fórmulas: $PD = \log (\text{número de células final/número de células inicial}) \times 3,33$; $PDT = (\text{tiempo final} - \text{tiempo inicial})/PD$.

Ensayo de viabilidad celular. La viabilidad celular se analiza midiendo la actividad metabólica celular mediante el ensayo colorimétrico con bromuro de (3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT). Las células se siembran por triplicado en 3 placas multipocillos P48 a 3 densidades (6×10^3 , 13×10^3 y 20×10^3 células/cm²) en 500 μl /pocillo de medio de cultivo. Tras 24, 48 y 72 h de la siembra (una placa/día) se añaden 250 μl /pocillo de MTT (SIGMA#M5655) y se incuban durante 3 h en el incubador. Transcurrido este periodo, se vacía la placa en el fregadero, se añaden 500 μl /pocillo de DMSO y se incuba la placa durante 10 min a temperatura ambiente en condiciones de oscuridad. Finalmente, se mide la absorbancia a 560 nm en un espectrofotómetro para microplacas para obtener los resultados. Las medidas de la absorbancia de cada día se normalizan con respecto a las obtenidas a las 24 h para cada densidad celular.

2.3 Ensayo de cierre de herida

Se siembran 6 pocillos de una placa multipocillos P12 a una densidad de $2,26 \times 10^4$ células/cm² (en 1,5 ml de medio de cultivo) con el objetivo de obtener una monocapa de células (100% de confluencia) a las 48 h. Transcurrido este tiempo, se realiza una herida en la monocapa de células (con puntas amarillas de micropipeta P200) en línea recta en el centro de cada pocillo. Posteriormente, se lavan con PBS y se añade por triplicado 1,5 ml/pocillo de medio fresco

conteniendo etopósido (SIGMA#E1383, 20 mg/ml en DMSO) a una concentración final de 10 µg/ml, o la cantidad correspondiente de DMSO como control. Las células se mantienen en el incubador y se realizan fotografías cada 2 h durante las primeras 12 h y a las 24 h con un microscopio de contraste de fases (Leica) para monitorizar el cierre de la herida. El área libre de células se cuantifica con la herramienta “*wound healing*” del software ImageJ (NIH) y se normaliza respecto al tiempo 0 h.

2.4 Ensayo de formación de tubos

En este ensayo las células se cultivan sobre una matriz denominada Matrigel. Se coloca una placa multipocillos P96 sobre hielo y se cubren los pocillos con 75 µl de Matrigel (CORNING#356231), tras lo cual se incuba a 37°C y 5% CO₂ durante 30 min. Una vez transcurrido ese tiempo, se añaden a cada pocillo 1,9 x 10⁴ células en un volumen final de 200 µl en medio con etopósido (10 µg/ml) o DMSO control. Las placas se mantienen en el incubador y se toman fotografías a 5X y 10X cada 2 h durante las primeras 12 h de incubación y a las 24 h. Las fotografías se toman con un microscopio de contraste de fases (Leica) y se analizan con la herramienta “*angiogenesis analyzer*” del software ImageJ (NIH).

2.5 Análisis estadístico

Los valores se presentan como las medias de las réplicas ± la desviación típica (media ± SD) o el error estándar de la media (media ± SEM). Para determinar si las diferencias fueron significativas se empleó la prueba t ($p < 0,05^*$, $p < 0,005^{**}$, $p < 0,001^{***}$).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Bases moleculares y celulares de la angiogénesis y su relevancia biomédica

1.1 Etapas del proceso angiogénico

En un organismo adulto sano las CEs tienen una vida media larga y están protegidas por la acción autocrina de señales de mantenimiento como VEGF, Ang-1 y FGF, manteniéndose en un estado quiescente (**Figura 1A**). Sin embargo, en determinadas condiciones fisiológicas y patológicas las CEs pueden salir de ese estado quiescente, induciéndose la formación de vasos sanguíneos (Carmeliet y Jain, 2011). Este proceso se lleva a cabo en varias etapas.

1.1.1 Fase de activación

El proceso angiogénico se inicia cuando un vaso sanguíneo quiescente detecta señales pro-angiogénicas tales como VEGF-A, VEGF-C, Ang-2, FGFs o quimiocinas, liberadas por células del tejido en condiciones de hipoxia, células inflamatorias, o células tumorales (**Figura 1B**). En

primer lugar, los pericitos se liberan de la pared vascular (en respuesta a Ang-2) y se inicia la degradación de la LB mediada por metaloproteasas de matriz. Las CEs pierden sus uniones entre ellas y el vaso se dilata. VEGF aumenta la permeabilidad de la monocapa de CEs, lo que desencadena la extravasación de las proteínas plasmáticas, que se acumulan y forman una MEC provisional. Las CEs migran sobre esta MEC provisional de forma dependiente de integrinas gracias al gradiente de señales pro-angiogénicas que se liberan (VEGF principalmente). El fenotipo activado de las CEs se caracteriza por la pérdida de la polaridad ápico-basal y de las uniones adherentes (Carmeliet y Jain, 2011; Ribatti y Crivellato, 2012).

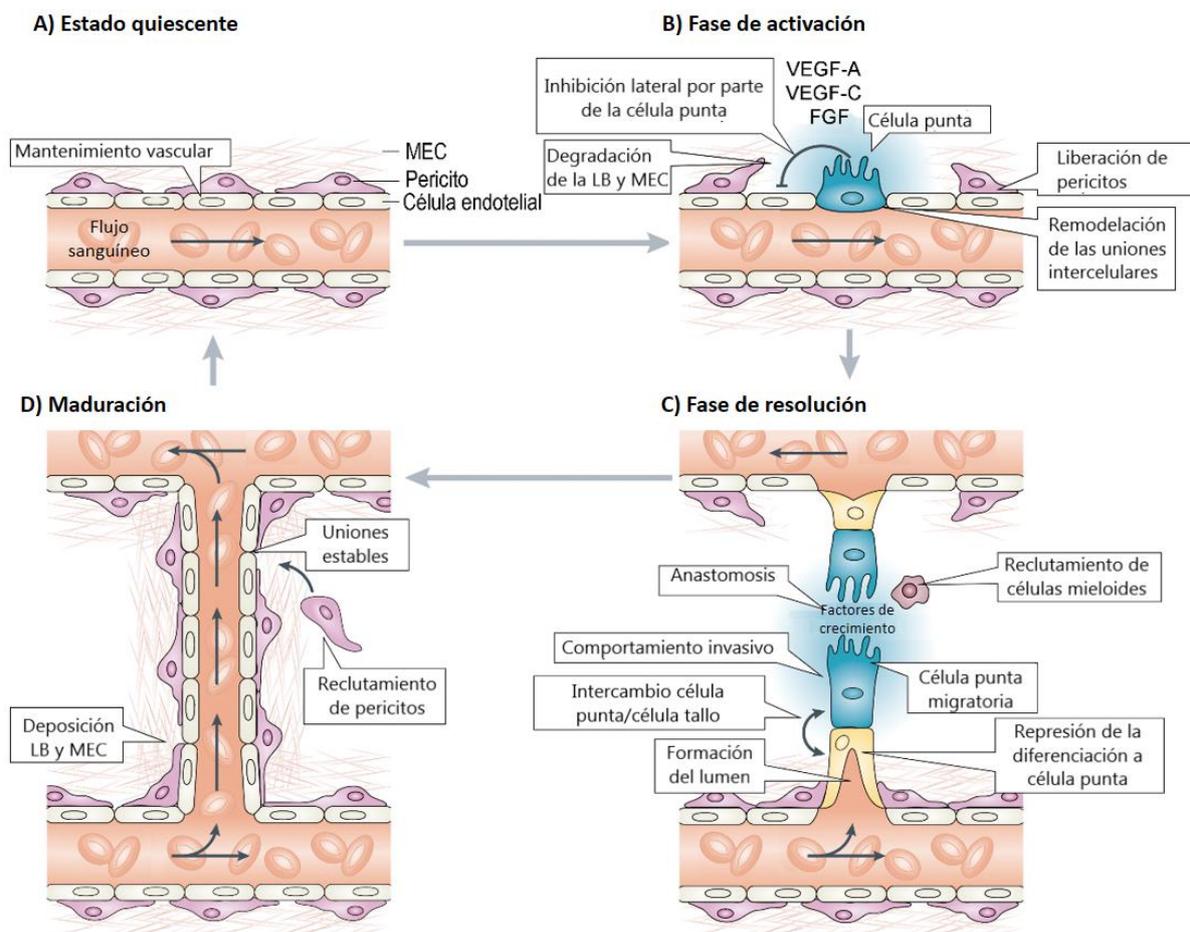


Figura 1: Fases del proceso angiogénico. A) En ausencia de estímulo pro-angiogénico las CEs se encuentran en un estado quiescente. B) En la fase de activación, la presencia de estímulos pro-angiogénicos debilita las uniones entre las CEs, se induce la degradación de la LB y MEC y los pericitos se liberan de las paredes del vaso. Se seleccionan las células punta, que invaden el tejido circundante y las células del tallo, que proliferan para permitir el crecimiento del vaso. C) Las células punta pueden intercambiar sus funciones con las células del tallo. En la fase de resolución, se produce la anastomosis entre dos brotes, se forma el lumen, D) durante la maduración se restablecen las uniones entre las CEs y se reclutan pericitos (adaptado de Herbert y Stainier, 2011).

La proliferación y la migración endotelial tiene lugar de una forma coordinada y ordenada en la cual algunas CEs adoptan un fenotipo pro-migratorio, las llamadas células punta (*tip cells*),

que son las que lideran el brote vascular y otras células, las células del tallo (*stalk cells*), adoptan un fenotipo proliferativo (**Figura 1B**). Las células punta son células móviles e invasivas y con numerosos filopodios, capaces de detectar señales activadoras o repulsivas. Por otra parte, las células del tallo son células proliferativas, que contribuyen a la elongación del vaso y al mantenimiento de la integridad estructural y funcional de los vasos nacientes. La ruta de señalización de Notch es determinante a la hora de establecer ambos fenotipos, que son transitorios ya que al finalizar el proceso las CEs vuelven a adquirir el fenotipo quiescente (Eilken y Adams, 2010; Viallard y Larrivé, 2017).

Durante el proceso angiogénico, la división celular se activa en las células del tallo en respuesta a factores como VEGF, FGF-2 o el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β). Una de las rutas implicadas en la regulación de esta proliferación es la ruta de las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK). Además de proliferar, las células del tallo migran hacia el estímulo angiogénico guiadas por las células punta. Para ello, en un proceso dinámico, desorganizan sus uniones con las otras CEs y con la MEC para establecer otras nuevas. Las principales uniones que tienen lugar entre las CEs y la MEC son las adhesiones focales, que involucran un gran número de moléculas como las quinasas asociadas a adhesiones focales (FAK), las integrinas, las proteínas adaptadoras y los filamentos de actina que forman las fibras de estrés (Herbert y Stainier, 2011; Viallard y Larrivé, 2017; Chen *et al.*, 2019).

1.1.2 Fase de resolución y maduración

En esta etapa final, el estímulo angiogénico cesa y las CEs establecen contactos entre sí y forman el lumen de los vasos, que serán estabilizados con el reclutamiento de células murales y la formación de la nueva LB (Carmeliet y Jain, 2011).

La formación del brote continúa hasta que las células punta conectan con vasos adyacentes y se produce la anastomosis, que es la fusión de dos ramas vasculares (**Figura 1C**). El lumen vascular comienza a formarse con el establecimiento de la polaridad ápico-basal. Las CEs mediante pinocitosis internalizan las proteínas plasmáticas de la MEC provisional y las secretan por el extremo apical, y se fusionan con las vesículas secretadas por las CEs vecinas. La membrana apical se recubre de glicoproteínas cargadas negativamente, lo que le confiere una señal repulsiva que posibilita la apertura del lumen. Cambios posteriores en la morfología de las CEs impulsados por VEGF, junto con una remodelación del citoesqueleto y el establecimiento de la polaridad posibilitan la expansión del lumen (Potente *et al.*, 2011; Viallard y Larrivé, 2017). Después de la formación del lumen, el diámetro del vaso incrementa

debido a fuerzas hemodinámicas en las que están involucrados el citoesqueleto celular y el establecimiento del flujo sanguíneo (Ribatti y Crivellato, 2012).

Por último, las CEs vuelven al fenotipo quiescente presente en los vasos sanguíneos maduros. En este proceso, tienen lugar cambios en la adhesión celular de forma que dejan de expresarse moléculas de unión a la MEC y se distribuyen lateralmente moléculas de unión célula-célula como la VE-cadherina característica de las uniones adherentes, y la zónula ocludens-1 y la claudina, características de las uniones estrechas (Ribatti y Crivellato, 2012). Finalmente, los vasos experimentan una maduración mediante el reclutamiento de células murales y la síntesis de una nueva LB y MEC (Viallard y Larrivé, 2017) (**Figura 1D**).

1.2 Principales rutas de señalización relacionadas con la regulación del proceso angiogénico

1.2.1 Señalización mediada por VEGF y sus receptores

VEGF-A es el principal regulador angiogénico para la formación de nuevos vasos durante el desarrollo, crecimiento y en distintas patologías. VEGF-A es el miembro mejor caracterizado de la familia de glicoproteínas homodiméricas que incluyen VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D y PlGF. Durante la angiogénesis, VEGF-A se une a su receptor de tipo tirosín quinasa de VEGF-2 (VEGFR-2) y activa múltiples cascadas de señalización, entre las que se encuentran la de las MAPK, las fosfoinosítido-3 quinasas (PI3K) y la proteína quinasa B (AKT). Como resultado, VEGF-A promueve la proliferación, la formación de filopodios, la quimiotaxis y la degradación de la MEC (Herbert y Stainier, 2011).

La expresión de VEGF-A está inducida mayoritariamente por condiciones de hipoxia, por lo que el proceso angiogénico se inicia rápidamente en respuesta a situaciones donde hay deficiencia de oxígeno. VEGF-A también estimula la dilatación y la permeabilidad vascular (Herbert y Stainier, 2011; Melincovici *et al.*, 2018). VEGF-B y PlGF también pueden mediar señales pro-angiogénicas mediante su unión a VEGFR-1. VEGF-B está implicado en el desarrollo de la vasculatura cardíaca, mientras que PlGF está involucrado en condiciones patológicas incluyendo el crecimiento tumoral. Por otra parte, VEGF-C presenta afinidad por VEGFR-3, que se expresa en las CEs de los vasos linfáticos promoviendo así su formación. Algunos autores también han descrito que presenta una cierta afinidad a VEGFR-2 en las células punta, donde se une a heterodímeros de VEGFR-2/VEGFR-3 y estimula el inicio de la angiogénesis (Melincovici *et al.*, 2018).

1.2.2 Señalización mediada por Notch y sus ligandos en la selección de las células punta

La vía Notch es un sistema de señalización conservado evolutivamente que está involucrado en el desarrollo embrionario, en la regulación de la homeostasis tisular y en el mantenimiento de las células troncales en organismos adultos (Phng y Gerhardt, 2009).

Las CEs expresan múltiples receptores Notch (NOTCH1, NOTCH3 y NOTCH4) y sus correspondientes ligandos (DLL1, DLL4, Jagged1 y Jagged2). Tanto los receptores Notch como sus ligandos son proteínas transmembrana que constituyen un sistema de señalización yuxtacrino que requiere la interacción física entre las células involucradas (Bray, 2006).

Estudios realizados en ratón y pez cebra muestran que la señalización DLL4/Notch interviene en la selección de las células punta y células del tallo durante la angiogénesis (Phng y Gerhardt, 2009). Según este modelo, la señalización VEGF-A/VEGFR-2 promueve la expresión de DLL4 en las células punta. Cuando DLL4 se une a su receptor Notch ejerce una inhibición lateral en las células del tallo vecinas, disminuyendo en estas la expresión de VEGFR-2 y VEGFR-3 e incrementando la expresión de VEGFR-1, lo que tiene como consecuencia la reducción de su capacidad de respuesta a VEGF (**Figura 2**). Por lo tanto, la selección de la célula punta y célula del tallo recae en la expresión diferencial de VEGFRs y su sensibilidad a VEGF, ambos procesos regulados por la señalización de Notch (Blanco y Gerhardt, 2013; Zarkada *et al.*, 2015). Consecuentemente, las células punta tendrán mayores niveles de DLL4, menor actividad de Notch y mayor transcripción de VEGFRs (Eilken y Adams, 2010).

Además, se ha visto que Notch induce la ruta de señalización de Wnt en las células del tallo, estimulando su proliferación, lo que explica por qué Notch, que normalmente suprime la proliferación y promueve la quiescencia, estimula la proliferación en las células del tallo *in vivo* (Phng y Gerhardt, 2009; Blanco y Gerhardt, 2013) (**Figura 2**).

1.2.3 Señalización mediada por angiopoyetinas y sus receptores

La familia de las angiopoyetinas tiene un papel importante en la función vascular. Este sistema está formado principalmente por dos receptores de tipo tirosín quinasa, TIE1 y TIE2, y sus correspondientes ligandos, Ang-1 y Ang-2 (Augustin *et al.*, 2009; Fagiani y Christofori, 2013). Ang-1 es expresada principalmente por células perivasculares (pericitos, CEs musculares lisas y fibroblastos) y se une a los receptores TIE2 de las CEs actuando de forma paracrina como agonista. Ang-1 tiene un efecto dual, mientras que en CEs confluentes promueve la estabilización de las uniones intercelulares y el reclutamiento de pericitos ocasionando en

última estancia el estado de quiescencia vascular, en endotelios activados promueve la adhesión de las CEs a la MEC y la migración celular de las mismas (Fagiani y Christofori, 2013). Por otra parte, Ang-2 se expresa en CEs y actúa de forma autocrina como antagonista de la señalización inducida por Ang-1 y TIE2, llevando a la desestabilización de los pericitos y a la permeabilidad vascular (Augustin *et al.*, 2009).

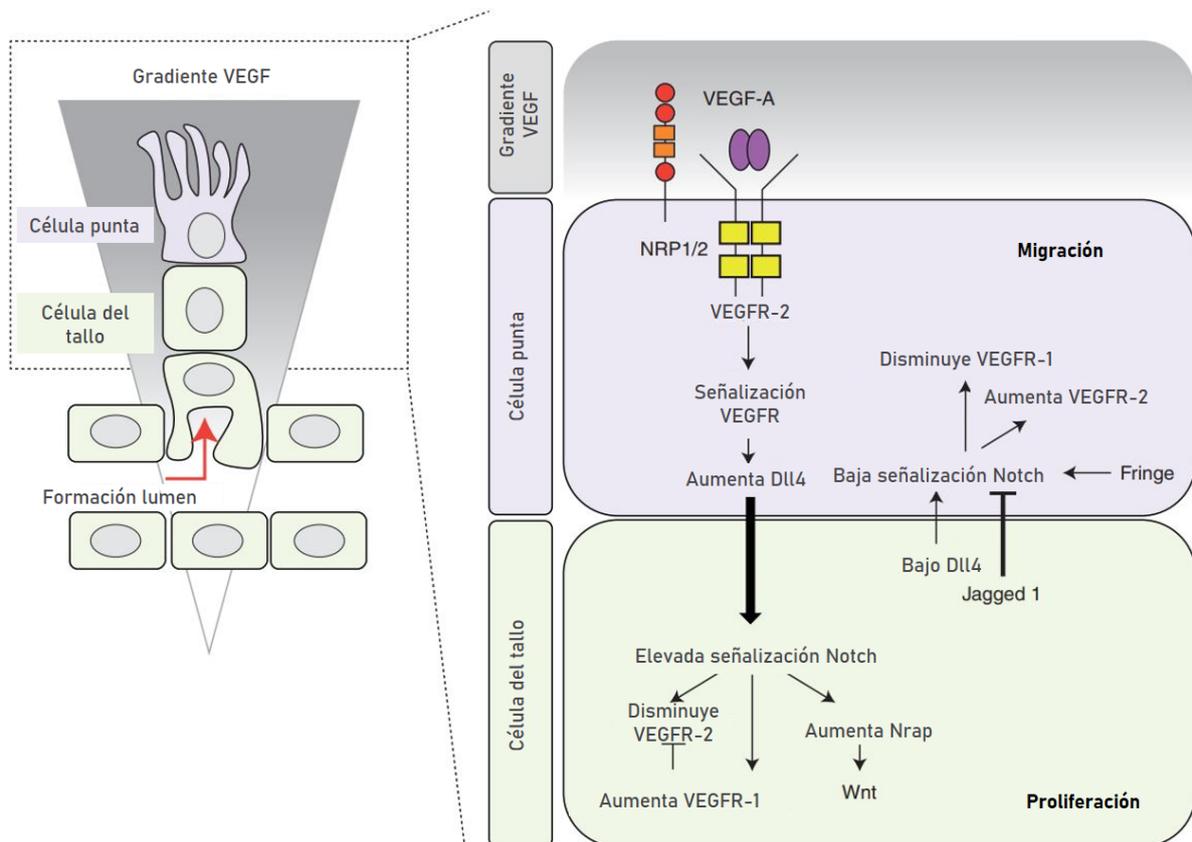


Figura 2: Mecanismos moleculares de la especificación de las células punta y del tallo. VEGF interacciona con VEGFR-2, expresado en la superficie de las CEs quiescentes y las activas. VEGF induce la expresión de DLL4 en las células punta, que activa la señalización de Notch en las células del tallo, suprimiendo en estas el fenotipo de célula punta. La señalización de Notch en las células del tallo reduce la expresión de VEGFR-2 y activa la ruta de señalización de Wnt (adaptado de Blanco y Gerhardt, 2013).

1.3 Angiogénesis en condiciones patológicas

Como ya se dijo anteriormente, la angiogénesis es un proceso estrechamente regulado en condiciones fisiológicas, pero se encuentra desregulado en diversas patologías. Según el modelo de “interruptor angiogénico”, la angiogénesis está regulada por un balance entre factores pro-angiogénicos y anti-angiogénicos. Alteraciones en este balance desembocan en la producción de una lista creciente de enfermedades, llamadas enfermedades dependientes de la angiogénesis, término descrito por Judah Folkman en 1971, quien propuso que el bloqueo de la

formación de vasos sanguíneos en tumores llevaba a la supresión del crecimiento de las células cancerígenas y de la metástasis (Tahergorabi y Khazaei, 2012; Fallah *et al.*, 2019).

Algunas de estas enfermedades en las que se producen malformaciones o regresión vascular, y cursan con un defecto en la irrigación de los tejidos, están relacionadas con una angiogénesis deficiente. Este es el caso de la diabetes, el Alzheimer, la alopecia, la cardiopatía isquémica o la preclamsia. En estas enfermedades, las estrategias terapéuticas se centran en promover la angiogénesis para aumentar el riego sanguíneo (terapias pro-angiogénicas) (Carmeliet, 2005).

Por otro lado, existen patologías producidas por un exceso de angiogénesis. Entre ellas se encuentran el cáncer, la retinopatía diabética, la degeneración macular asociada con la edad, la psoriasis, la endometriosis, así como enfermedades infecciosas y desórdenes autoinmunes. En este tipo de enfermedades, el número elevado de señales pro-angiogénicas resultan en una angiogénesis desmesurada, por lo que en este caso las terapias se centran en bloquear diferentes rutas de señalización involucradas en el proceso angiogénico (terapias anti-angiogénicas) (Fallah *et al.*, 2019).

Debido al papel que tiene el eje VEGF/VEGFR en la activación de la angiogénesis, esta ruta de señalización ha sido la principal diana en la terapia anti-angiogénica. La inhibición puede desarrollarse a diferentes niveles, entre los que se incluyen anticuerpos que se unen al ligando o al receptor, como por ejemplo Bevacizumab (anticuerpo monoclonal anti-VEGF-A) y Ramucicrumab (anticuerpo monoclonal anti-VEGFR-2) o moléculas de bajo peso molecular inhibitoras de los receptores tirosín quinasa como Sunitinib o Sorafenib (que bloquean VEGFRs y los receptores de PDGF) entre otros medicamentos aprobados por la FDA. Además, se están evaluando diferentes técnicas para mejorar la eficacia terapéutica, tales como el desarrollo de nuevos agentes que se sobre-expresan en el tejido afectado (microARNs) o la optimización del horario y la dosis de terapias combinadas con la terapia anti-angiogénica. Sin embargo, el desarrollo de resistencias a la terapia anti-angiogénica, generadas, entre otras causas, por la heterogeneidad tumoral y vascular y la adaptación del microambiente, disminuyen la eficacia de este tipo de terapias (Fallah *et al.*, 2019).

1.3.1 Angiogénesis y cáncer

La angiogénesis es un proceso indispensable en la progresión tumoral y metástasis. Los tumores no pueden crecer más allá de 1 a 2 mm sin un sistema que les aporte oxígeno y nutrientes, así como que les permita eliminar los desechos metabólicos y el CO₂ (Viallard y Larrivé, 2017). Es por eso, por lo que necesitan activar el interruptor angiogénico. El programa se enciende

principalmente en respuesta a condiciones de hipoxia que, junto con la falta de nutrientes, refuerza la expresión de señales pro-angiogénicas como VEGF, TGF- β o PDGF-B por parte de las células tumorales, así como de otras células que componen el ecosistema tumoral como son los fibroblastos o células inflamatorias (macrófagos, células dendríticas y mastocitos) (Masoud y Li, 2015; Zuazo-Gaztelu y Casanovas, 2018).

La desregulación de la angiogénesis en el cáncer desemboca en una red vascular anormal tanto estructural como funcionalmente, que se caracteriza por áreas hiper-vascularizadas y regiones de baja densidad vascular con vasos dilatados, tortuosos y desorganizados (Carmeliet y Jain, 2011). La inmadurez vascular, junto con una adhesión débil e irregular de células murales conlleva a una permeabilidad excesiva y una perfusión baja (Viallard y Larrivé, 2017). Estas anormalidades generan un microambiente tumoral caracterizado por hipoxia, falta de nutrición, bajo pH y alta presión intersticial (Eales *et al.*, 2016). Todo esto, reduce la citotoxicidad de los compuestos anti-angiogénicos administrados sistémicamente, ya que se ve limitada la accesibilidad de los medicamentos a las células cancerígenas. Es por ello, que diversos estudios han demostrado que la combinación de terapias anti-angiogénicas (que llevan a una normalización vascular) con terapias convencionales como la quimioterapia ha incrementado la supervivencia de los pacientes con cáncer (Nerini *et al.*, 2016).

2. Modelos de estudio de la angiogénesis. Ventajas y desventajas

Se han desarrollado diferentes bioensayos *in vivo* e *in vitro* para investigar y explicar los factores individuales que controlan el proceso angiogénico. Estos ensayos han sido clave en el estudio de la biología vascular en la etapa de desarrollo y crecimiento, pero también juegan un papel en el diseño, desarrollo y evaluación de compuestos que modulan la función vascular, tanto positivamente como negativamente (Nowak-Sliwinska *et al.*, 2018).

2.1 Modelos *in vivo*

2.1.1 Pez cebra

El pez cebra es un modelo animal ampliamente usado para el estudio del desarrollo vascular y la angiogénesis fisiológica y patológica debido a múltiples razones como son la fecundación externa de los gametos, el rápido desarrollo embrionario y la transparencia de los embriones, así como la susceptibilidad a la manipulación genética y farmacológica. Además, debido a su pequeño tamaño pueden sobrevivir varios días sin un sistema vascular funcional por un mecanismo de difusión pasiva de oxígeno, lo que ha permitido el análisis de fenotipos relacionados con malformaciones en el sistema cardiovascular que son letales en la etapa

embrionaria (Simons et al., 2015). Mediante el uso de microARNs antisentido para inhibir la expresión génica y más recientemente el uso de estrategias de edición génica se han realizado grandes avances en términos de modificación de la expresión génica en este modelo (Chávez et al., 2016). Al mismo tiempo se han desarrollado líneas transgénicas que expresan proteínas fluorescentes en los vasos sanguíneos, facilitando su visualización y estudio mediante técnicas como la microscopía confocal de lapso de tiempo (Simons et al., 2015).

2.1.2 Modelos oculares

Estos modelos incluyen la córnea y la retina de mamíferos. En el primer caso, el ensayo consiste en realizar una lesión en la córnea de ratas, ratones o conejos para inducir la neovascularización. Transcurrido un periodo de tiempo, las córneas se explantan y se evalúa la formación de nuevos vasos en este tejido inicialmente avascular (Irvin et al., 2014). La retina de ratón, por otra parte, es un buen modelo para evaluar la angiogénesis en la etapa de desarrollo postnatal, permitiendo un análisis espacio-temporal de la formación de los plexos vasculares (en regiones muy definidas con unos patrones altamente reproducibles) en cepas de ratones normales o con modificaciones genéticas que, combinadas con la tecnología inducible Cre-LoxP, pueden extenderse al estudio de cepas con letalidad embrionaria (Simons et al., 2015).

2.1.3 Implantación de polímeros y esponjas sintéticas

Estos ensayos facilitan el estudio de la angiogénesis en 3D mediante la implantación de un biomaterial (Matrigel, “andamios” de polímeros) de forma subcutánea en ratones, ratas o conejos. Estas matrices de polímeros a menudo contienen sustancias que se quieren ensayar (factores de crecimiento, células o explantes tisulares). Los resultados del experimento se miden una vez transcurrido un periodo de tiempo cuando el material introducido es extraído, seccionado y teñido con marcadores para CEs. En ciertos casos, también se mide el contenido de hemoglobina (Irvin et al., 2014).

2.1.4 Implantación de cámaras transparentes en la piel

Este tipo de ensayos, realizados mayormente en ratones, se llevan a cabo para estudiar el proceso angiogénico mediante la implantación de ventanas transparentes en varias localizaciones anatómicas, para estudiar la angiogénesis en la piel del dorso, el cerebro, el pulmón o el páncreas. De esta forma se pueden utilizar diferentes técnicas de microscopía intravital para realizar un seguimiento de la formación vascular de una forma no invasiva y durante largos periodos de tiempo. Además, la implantación de sustancias, células o explantes de tejidos, permite estudiar la neovascularización no solo en procesos fisiológicos como la

curación de heridas, sino que también en procesos patológicos como el desarrollo tumoral o la respuesta a diferentes compuestos con efectos angiogénicos (Nowak-Sliwinska et al., 2018).

2.1.5 Modelos de implantación tumoral

Uno de los métodos más comúnmente usados para estudiar la angiogénesis en cáncer es mediante la implantación de una línea celular tumoral en ratones singénicos (en el caso de isoinjertos) o inmunodeficientes (en el caso de xenoinjertos). Las células tumorales pueden trasplantarse en diferentes microambientes: de forma subcutánea para permitir el estudio de la formación del tumor primario, de forma intravenosa para estudios metastásicos o de forma ortotópica en el órgano de origen de las células tumorales para estudiar la formación del tumor dentro de un microambiente más similar al original (Eklund et al., 2013). Por otra parte, las células tumorales implantadas pueden ser transfectadas para que expresen genes reporteros que faciliten su detección (por ejemplo, la proteína fluorescente verde) mediante técnicas de imagen. Frecuentemente, llegado a cierto punto, los animales se sacrifican y los tumores se procesan y se evalúa la respuesta angiogénica (Nowak-Sliwinska et al., 2018).

2.2 Ventajas y limitaciones de los modelos *in vivo*

En la **Tabla 2** se desarrollan las ventajas y las limitaciones que presenta cada modelo *in vivo* mencionado.

Tabla 2. Ventajas y desventajas de los modelos *in vivo* para el estudio de la angiogénesis.

Modelo	Ventajas	Limitaciones	Referencias
Pez cebra	→ Permite análisis genético del desarrollo vascular → Apropriado para pruebas a gran escala	→ No mamífero → Dificultad para distinguir entre angiogénesis y vasculogénesis	(Chávez et al., 2016; Stryker et al., 2019)
Córnea de ratón	→ Fácil visualización → Sitio inmunoprivilegiado → Monitorización no invasiva	→ Técnica invasiva → Área disponible pequeña → Angiogénesis anormal → Caro	(Tahergorabi y Khazaei, 2012)
Retina de ratón	→ Análisis espacio-temporal de la vascularización → Modelo para estudiar patologías vasculares	→ Modelos transgénicos requieren un sistema inducible → Caro	(Simons et al., 2015; Nowak-Sliwinska et al., 2018)
Implantación de polímeros o esponjas	→ Simple → Barato → Adecuado para el estudio de la angiogénesis tumoral	→ Retención variable del componente testante dentro del implante → Respuesta inflamatoria	(Ribatti, 2014)
Ventanas transparentes	→ Visualización y estudio dinámico del microentorno vascular <i>in vivo</i>	→ Caro → Posible inflamación e inapropiada implantación	(Nowak-Sliwinska et al., 2018)
Injerto de tumores	→ Ensayos de compuestos a largo plazo	→ Requiere experiencia y dinero para evaluar los datos	(Stryker et al., 2019)

2.3 Ensayos *in vitro* con cultivos de órganos (*ex vivo*)

En estos modelos, se cultivan segmentos, discos o secciones específicas de tejidos *in vitro* en una matriz tridimensional y se monitoriza el crecimiento microvascular (Staton et al., 2009). Dentro de este tipo de modelos, el **anillo aórtico** es el más extendido. Se suelen utilizar explantes de aorta torácica de ratón o rata (**Figura 3**), pero también se ha realizado con células de pollo e incluso humanas. Los explantes son seccionados y embebidos en una matriz tridimensional (colágeno o fibrina) y cultivados durante varios días antes de cuantificar los brotes vasculares. Este modelo permite además testar la eficacia de moléculas pro- y anti-angiogénicas (Nowak-Sliwinska et al., 2018).

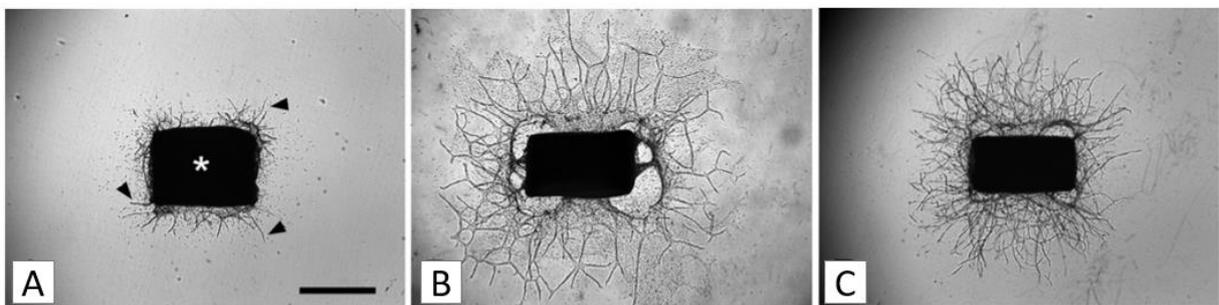


Figura 3. Cultivos de anillos aórticos de rata en gel de colágeno. Las fotografías, fueron tomadas el día 7. A) Muestra control. Las flechas muestran el crecimiento vascular a partir de la disección de aorta (asterisco). La respuesta angiogénica se ve amplificada tratando el cultivo con factores de crecimiento recombinantes tales como FGF-2 (20ng/ml; B) o VEGF (10 ng/ml; C) (adaptado de Aplin y Nicosia, 2015).

2.4 Ensayos *in vitro* con cultivos de células endoteliales en dos dimensiones (2D)

El aislamiento de líneas de CEs y su establecimiento en el laboratorio ha sido un hito en la biología vascular. Una de las líneas más utilizadas en este campo son las CEs de vena de cordón umbilical humana (HUVEC), que han sido cultivadas en el laboratorio desde 1973 (Staton et al., 2009). Debido a que las técnicas de aislamiento se han vuelto más sofisticadas, se han establecido cultivos primarios de más líneas de CEs procedentes de diferentes órganos, incluyendo células macrovasculares como las HUVEC y microvasculares como las CEs microvasculares de dermis humana, así como las BAEC (Nowak-Sliwinska et al., 2018).

2.4.1 Ensayos de proliferación

Las CEs están entre las células más quiescentes del organismo, pero cuando son estimuladas pueden iniciar su entrada en el ciclo celular (Staton et al., 2009). La forma más sencilla de evaluar el número de células consiste en contarlas directamente, utilizando para ello hemocitómetros o contadores automatizados. Otra opción para evaluar la proliferación es mediante la síntesis de ADN, cuantificando de la cantidad de un determinado agente intercalante que se incorpora durante la fase S, como la timidina tritiada, que se ha usado

durante décadas, pero para evitar el uso de radiactividad se usan otros compuestos alternativos como la bromodesoxiuridina. Su cuantificación se lleva a cabo mediante ELISA, citometría de flujo o inmunohistoquímica (Goodwin, 2007). También se puede hacer uso de marcadores que se unen a proteínas involucradas en el proceso de proliferación como la histona fosforilada H3, el antígeno PCNA o la proteína Ki67. Además, la proliferación celular se puede evaluar mediante ensayos metabólicos como el MTT, que mide la actividad mitocondrial (Nowak-Sliwinska et al., 2018).

2.4.2 Ensayos de migración

Los ensayos que permiten cuantificar la migración de las CEs incluyen el ensayo de cierre de herida y los ensayos de migración a través de una membrana. En el primer caso, las CEs, sembradas y crecidas hasta obtener una monocapa de células confluentes, migran hacia un área desnuda generada con una herramienta punzante. El uso de dispositivos que repliquen el área generada facilita la reproducibilidad de este ensayo (Nowak-Sliwinska et al., 2018). Por otro lado, los ensayos de migración a través de una membrana se basan en la migración de las CEs sembradas a un lado de un filtro poroso (de un tamaño de poro de unos 3µm) hacia una solución, con un factor potencial que tenga efecto sobre la migración celular, depositada en el lado opuesto de la membrana. Después de un corto periodo de tiempo, se cuantifica el número de células que ha pasado a través de la membrana. Con el fin de simular la migración a través de la MEC, el filtro poroso se recubre a menudo con colágeno, fibronectina u otras proteínas a las que las CEs puedan adherirse de manera efectiva (Goodwin, 2007). En este tipo de ensayos se puede monitorizar la migración a lo largo del tiempo, combinando técnicas de microscopía y tinción celular (Nowak-Sliwinska et al., 2018).

2.4.3 Ensayos de morfogénesis

En las etapas finales de la angiogénesis, las CEs se ensamblan en estructuras tubulares para formar los futuros vasos maduros. Esta etapa puede simularse *in vitro* sembrando las CEs con componentes de la MEC. Se suelen utilizar como sustratos, colágeno de tipo I, fibrina o Matrigel, y las CEs pueden sembrarse encima, debajo o dentro de la matriz. Estos ensayos están diseñados con el objetivo de identificar biomoléculas que alteren la diferenciación de las CEs (Irvin et al., 2014). Un ejemplo ampliamente utilizado es el ensayo de morfogénesis de HUVEC en Matrigel, que a densidades bajas forman una red tubular que se mantiene durante 12 a 24 h. Cabe destacar que el Matrigel es una matriz de CEs tumorales de ratón y, por lo tanto, rica en factores de crecimiento angiogénicos (Goodwin, 2007).

2.5 Ensayos *in vitro* con cultivos en tres dimensiones (3D)

2.5.1 Ensayos *in vitro* con CEs en co-cultivo

Estos sistemas representan una mejora de los ensayos convencionales *in vitro* de CEs, ya que en condiciones fisiológicas las CEs forman parte de un ecosistema tridimensional compuesto por múltiples tipos celulares que secretan diversos factores que regulan el proceso angiogénico (Nowak-Sliwinska et al., 2018).

Un ejemplo es el **ensayo de microesferas en fibrina**, en el cual las CEs son adheridas a esferas cubiertas de colágeno de tipo I para generar una monocapa y después son embebidas en un gel de fibrina con células estromales humanas. En este ensayo se mide la capacidad de ramificación y formación de lumen de las CEs durante un largo periodo de tiempo (2 a 3 semanas) (Nowak-Sliwinska et al., 2018).

Sin embargo, cada vez están tomando más importancia los **sistemas microfluídicos** de cultivo celular, también llamados “*lab-on-a-chip*”. Se trata de dispositivos capaces de recrear estructuras fisiológicas complejas (como órganos y tejidos) con varias poblaciones celulares y ejerciendo un control total de las condiciones biológicas, químicas y mecánicas, como son la composición de la MEC y las interacciones célula-célula y célula-MEC (Zervantonakis et al., 2011). Algunos de estos dispositivos contienen redes de microcanales por donde circulan fluidos que simulan la microvasculatura (Miller et al., 2012) (**Figura 4A**), en otros casos la microvasculatura se forma mediante angiogénesis (Sobrino et al., 2016) (**Figura 4B**). Las tecnologías emergentes de impresión en 3 dimensiones están cambiando la forma en la que se estudian las células *in vitro* (Nowak-Sliwinska et al., 2018).

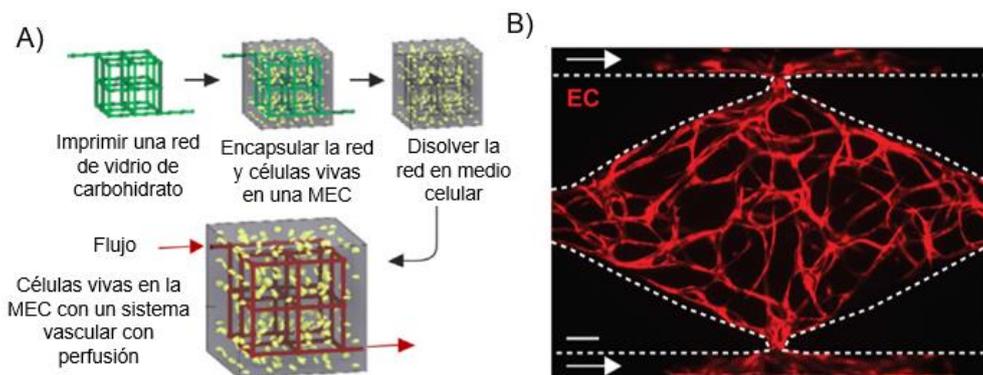


Figura 4. Vascularización en sistemas microfluídicos. A) Una red de vidrio de carbohidrato abierta sirve como molde para la arquitectura vascular. La red se introduce en una MEC con células vivas y se disuelve en medio celular. Al final se produce una arquitectura vascular que coincide con la red original. B) Cámara representativa del tejido vascular en el día 7. Las CEs, transducidas para ser visualizadas (rojo), migran desde los canales (por los que se introducen células y componentes de la MEC) y se producen anastomosis entre ellas, formando una red vascular (adaptado de Miller et al., 2012; Sobrino et al., 2016).

2.5.2 Ensayos *in vitro* con células troncales en 3D

Las CEs en cultivo comienzan a perder su fenotipo normal después de varios pases y experimentan cambios en el estado de activación, cariotipo, expresión de antígenos de superficie, etc., por lo que deben utilizarse durante un tiempo limitado (Staton et al., 2009; Stryker et al., 2019). Sin embargo, las células troncales embrionarias (ESCs) se establecen a partir de la masa interna de blastocistos, principalmente de ratón, aunque también se han establecido a partir de blastocistos humanos. Estas células poseen dos propiedades particulares: la capacidad de auto-renovación, que les permite dividirse indefinidamente en cultivo sin diferenciarse, y la pluripotencia, que les otorga la posibilidad de diferenciarse a cualquier tipo celular de las tres capas germinales (Goodwin, 2007)

Modelos de diferenciación endotelial a partir de células troncales embrionarias: formación de cuerpos embrioides. Las ESCs pueden mantenerse en estado indiferenciado en cultivo, en presencia del factor inhibidor de la leucemia (LIF) y/o sobre monocapas de fibroblastos embrionarios de ratón (*feeder layers*), durante largos periodos de tiempo. La inducción *in vitro* para la diferenciación de estas células, suele comenzar con la formación de agregados multicelulares, llamados cuerpos embrioides (EBs). Existen varios métodos para generar EBs, tales como el cultivo en suspensión o el cultivo en gota colgante. Tras varios días de cultivo en ausencia de LIF, los EBs formados se siembran en cultivos 2D o 3D con medios específicos que promueven la diferenciación endotelial y que incluyen VEGF. La presencia de este factor induce la formación de brotes vasculares de forma dosis-dependiente. Los cultivos de EBs permiten el estudio del desarrollo de las CEs en paralelo con de las células perivasculares y la formación de la LB, en un contexto que se asemeja al desarrollo vascular en el embrión, por lo que este método proporciona un modelo para el estudio de la biología vascular en formación, así como para el análisis de compuestos pro- y anti-angiogénicos y la evaluación de la función de diferentes manipulaciones genéticas (Li y Claesson-Welsh, 2009).

Modelos de diferenciación endotelial a partir de células troncales pluripotentes inducidas. Los avances en el campo de la reprogramación celular han llevado al descubrimiento de otra fuente alternativa de CEs, las células troncales pluripotentes inducidas (iPSCs), derivadas de la reprogramación de células adultas. Se han descrito varios protocolos para inducir la diferenciación de iPSCs a CEs, siendo los cultivos en 3D los que presentan mayor eficiencia (Jang *et al.*, 2019).

Modelos de angiogénesis en mini-órganos u organoides. Un organoide es una versión miniaturizada y simplificada de un órgano. Se trata de estructuras en 3D derivadas de células troncales pluripotentes o células progenitoras multipotentes adultas, que se auto-organizan y se diferencian, bajo determinadas condiciones en cultivos en 3D, hacia tipos celulares funcionales, que recapitulan algunas funciones del órgano. Los cultivos de organoides representan nuevas aproximaciones para estudiar el desarrollo humano (Huch *et al.*, 2017). Sin embargo, cuando llegan a cierto tamaño, cesan de proliferar y desarrollan un núcleo necrótico debido a la falta de vascularización. Es por ello, por lo que se están realizando esfuerzos para dotarlos de vasculatura. Las soluciones a este problema incluyen el trasplante de los organoides a tejidos altamente vascularizados de animales, donde la vasculatura nativa se integra en el implante (en la mayoría de los casos el organoide se co-cultiva previamente con células secretoras de VEGF, promoviendo así las señales angiogénicas necesarias para la correcta vascularización una vez trasplantado) (**Figura 5A**). En otro trabajo se consiguió la vascularización co-cultivando esferoides de fibroblastos de pulmón humanos con HUVEC en un dispositivo microfluídico con diferentes compartimentos (**Figura 5B**). Los nuevos enfoques implicarán la creación de sistemas vasculares artificiales con tecnologías de impresión en 3D, buscando la inducción de una vascularización espontánea de los organoides en formación (Grebenyuk y Ranga, 2019).

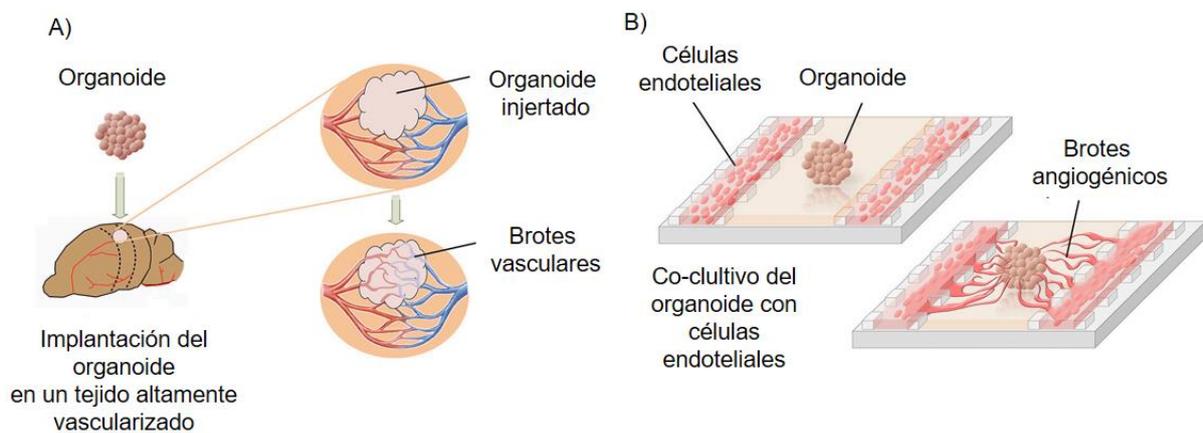


Figura 5. Vascularización de organoides. La vascularización de los organoides puede producirse A) *in vivo*, injertando organoides en tejidos altamente vascularizados de animales, previamente co-cultivados con CE. B) Alternativamente, puede producirse *in vitro*, mediante un co-cultivo con CE en un dispositivo microfluídico con diferentes compartimentos (adaptado de Grebenyuk y Ranga, 2019).

2.6 Ventajas y limitaciones de los ensayos *in vitro*

A continuación, se presentan en la **Tabla 3** las ventajas y limitaciones que posee cada uno de los ensayos mencionados.

Tabla 3. Ventajas y limitaciones de los ensayos *in vitro* para el estudio de la angiogénesis.

Ensayo	Ventajas	Limitaciones	Referencias
Cultivos de órganos			
Anillo aórtico	→ Barato y reproducible (múltiples cortes en una aorta) → No hay complicaciones inflamatorias	→ Falta de estímulo mecánico → Difícil manipulación → No refleja características de CEs microvasculares → Edad y genética del animal pueden variar resultados	(Staton et al., 2009; Liu et al., 2017)
Cultivos de CEs en 2D			
Recuento celular	→ Barato y sencillo	→ Errores humanos → Requiere elevado número de células y múltiples recuentos	(Stryker et al., 2019)
Síntesis de ADN	→ Detecta la apoptosis → Da información del ciclo celular	→ Dificultad para interpretar los resultados con precisión	(Stryker et al., 2019)
Ensayo con MTT	→ Barato, rápido, reproducible → Determina viabilidad y citotoxicidad	→ La sustancia puede afectar al metabolismo celular	(Stryker et al., 2019)
Cierre de herida	→ Simple → Adecuado para escalar	→ Difícil de reproducir → Inconsistencias en datos de confluencia → No quimiotaxis	(Liu et al., 2017; Stryker et al., 2019)
Migración a través de membranas	→ Rápido → Sensible a gradientes de concentración	→ Filtros con proteínas de la MEC caros → Difícil de mantener y de cuantificar	(Nowak-Sliwinska et al., 2018)
Formación de tubos en Matrigel	→ Adecuado para evaluar factores pro- y anti-angiogénicos	→ Lleva mucho tiempo → No exclusivo de CEs → Dificultad técnica	(Stryker et al., 2019)
Co-cultivos de CEs en 3D			
Microesferas de fibrina	→ Co-cultivo de células	→ Lleva mucho tiempo	(Nowak-Sliwinska et al., 2018)
Cámaras microfluídicas	→ Control de muchos parámetros → Volumen reducido	→ Técnicamente difíciles de fabricar → No hay productos comerciales disponibles	(Nowak-Sliwinska et al., 2018)
Cultivos de células troncales en 3D			
EBs	→ Formación de lumen → Posibilidad de manipulaciones genéticas	→ Sin flujo hemodinámico → Estructura vascular variable	(Li y Claesson-Welsh, 2009)
IPSCs-CEs	→ No rechazo → Se pueden extraer de varias fuentes	→ Heterogeneidad en las células y en los protocolos de diferenciación	(Jang <i>et al.</i> , 2019)
Organoides	→ Estudio del desarrollo de órganos humanos → Modelos de enfermedades humanas	→ Incapaces de generar vasculatura espontánea	(Grebnyuk y Ranga, 2019)

En general, los modelos animales evalúan y proporcionan información sobre el proceso angiogénico completo, pero son invasivos, menos accesibles y poseen un control limitado de

los aspectos individuales del proceso. Por otro lado, los modelos celulares proporcionan información sobre aspectos específicos del proceso, son precisos, más accesibles y reproducibles, pero no son necesariamente un reflejo exacto de la formación vascular *in vivo* (Irvin *et al.*, 2014). Los cultivos con células troncales en 3D podrían cerrar la brecha formada entre los ensayos *in vitro* tradicionales y la complejidad de los modelos animales y poseen múltiples aplicaciones en el ámbito de la medicina, evaluación y descubrimiento de compuestos, así como para el estudio distintos procesos moleculares (Grebenyuk y Ranga, 2019).

3. Puesta a punto de ensayos angiogénicos básicos utilizando cultivos primarios de células endoteliales de aorta bovina

Con el objetivo de poner a punto algunos de los ensayos angiogénicos básicos se han utilizado cultivos primarios de BAEC para evaluar diferentes funciones celulares relacionadas con el proceso angiogénico, entre las que se encuentran la proliferación, la migración y la morfogénesis.

3.1 Ensayos de cinética de crecimiento y viabilidad

Curva de crecimiento diaria. Para determinar la cinética de crecimiento de las BAEC, se realizaron curvas de crecimiento sembrando a tres densidades distintas (6×10^3 , 13×10^3 y 20×10^3 células/cm²). Las células presentaron una morfología diferente dependiendo de la confluencia en la que se encontraban. Durante los primeros días (baja confluencia, siembra a 6×10^3 células/cm²) las células presentaron una morfología fibroblastoide (**Figura 6A**), correspondiendo a la morfología de células que se están adaptando al cultivo, mientras que cuando la confluencia fue alta (80 a 100%) las células fueron adquiriendo la morfología clásica de CE, poligonales, con núcleos densos y prominentes y con los bordes claramente diferenciados y fueron formando una capa uniforme (**Figura 6B**). En etapas tardías de cultivo (días 4 a 6), casi todas las células mostraban múltiples vesículas y gránulos en su citoplasma (**Figura 6C**). A las 48 h de siembra se observaron múltiples células en mitosis, células redondeadas en tándem y separadas del sustrato, indicando un periodo de alta actividad de proliferación (**Figura 6A, flechas**). También se identificaron algunas células aisladas con fenotipo senescente (**Figura 6A, asterisco**).

El crecimiento poblacional se analizó diariamente, se representó en función del tiempo (**Figura 7**) y se calcularon los PD y PDT para cada densidad sembrada (**Tabla 4**). Con estos parámetros se identificó la fase exponencial de cada curva. En consonancia con la observación

microscópica, la fase de mayor proliferación ocurre a las 48 h de siembra (entre los días 1 y 2) en todas las densidades de siembra, con un PDT de 7,5 h cuando son sembradas a baja densidad (C1) y de 10 h cuando son sembradas a densidades más altas (C2 y C3), lo cual refleja la gran sensibilidad de estas células a la inhibición por contacto. En todos los casos, tras 72 h en cultivo la población disminuye su crecimiento (**Figura 7 y Tabla 4**) en concordancia con el incremento de su confluencia en esta etapa (**Figura 6B**).

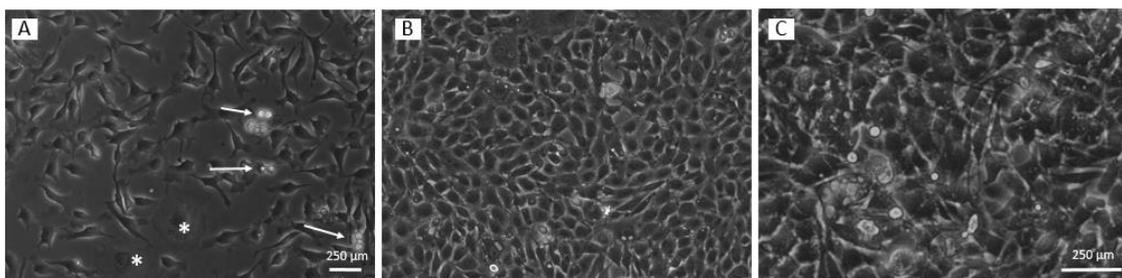


Figura 6. Morfología celular. Las BAEC presentaron una morfología fibroblastoide en condiciones de baja confluencia (A) y una morfología poligonal en confluencia (B). Las flechas señalan células en división y el asterisco células senescentes. En etapas tardías de cultivo se observaron vesículas y gránulos en el citoplasma celular (C). Las fotografías fueron tomadas a 20X a las 48, 72 y 120 h de incubación en la población sembrada a 6×10^3 células/cm².

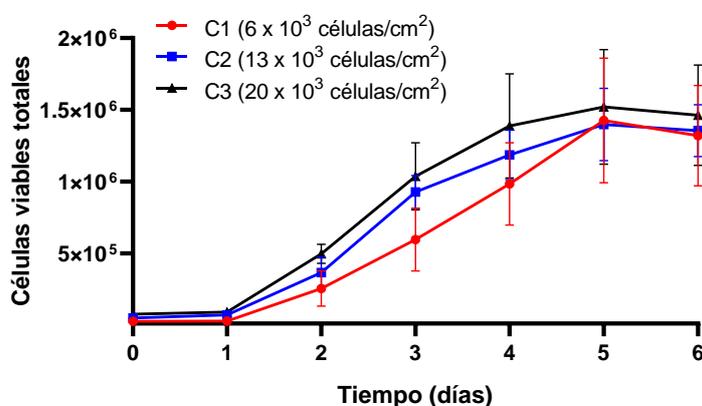


Figura 7. Curva de crecimiento diaria de BAEC. Las células se sembraron a 3 densidades diferentes (C1, C2 y C3) y se cultivaron durante 6 días. Se representan los datos de la media \pm SEM (n=2).

Tabla 2. Parámetros PD y PDT para cada densidad celular en periodos de tiempo de 24 h. Los parámetros fueron calculados con los datos de la media de las dos curvas.

Tiempo (días)	C1		C2		C3	
	PD	PDT (h)	PD	PDT (h)	PD	PDT (h)
0-1	0,16	150,39	0,51	46,92	0,26	69,94
1-2	3,20	7,51	2,40	10,02	2,48	10,04
2-3	1,23	19,52	1,35	17,84	1,06	22,55
3-4	0,72	33,13	0,36	67,44	0,42	56,78
4-5	0,54	44,63	0,24	100,89	0,13	181,95
5-6	-	-	-	-	-	-

Las curvas de crecimiento se realizan con el fin de caracterizar la línea celular, calcular su densidad óptima de siembra y la duración de la fase exponencial para establecer unas pautas de mantenimiento de la línea en cultivo. Nuestros datos indican que la densidad óptima de siembra para el cultivo es la C1 (6×10^3 células/cm²), lo cual está en concordancia con lo recomendado por algunas casas comerciales (4×10^3 células/cm² (SIGMA#B304-05) y 6×10^3 células/cm² (PROVITRO#1220133)). Sin embargo, en otro trabajo, se ha referenciado una densidad de siembra de 7 a 10×10^3 células/cm² (Antoniotti *et al.*, 2006). Hay que tener en cuenta que las BAEC son células primarias establecidas a partir de aortas de terneras de mataderos locales, lo cual implica una gran heterogeneidad genética entre las líneas utilizadas por los distintos grupos, lo cual podría resultar en diferencias en su comportamiento en cultivo. En cuanto al subcultivo, nuestros datos sugieren que se subcultiven cada 48 a 72 h, antes de sobrepasar el 80% de confluencia.

Ensayo de viabilidad celular. Las curvas de crecimiento diarias dan indicaciones sobre el crecimiento de la población en su conjunto, pero no se puede saber si la población deja de crecer porque las células dejan de dividirse porque el ciclo celular para, o porque el índice de muerte celular ha aumentado en el cultivo. Por tanto, se requieren ensayos que permitan analizar la viabilidad celular. Este es el caso del ensayo del MTT el cual se ha utilizado comúnmente para evaluar la viabilidad celular en respuesta a distintos compuestos (Chen *et al.*, 2007; Song *et al.*, 2009). Se trata de un ensayo colorimétrico en el que se usa el MTT, un compuesto amarillo que, por acción de las deshidrogenasas mitocondriales de células viables, se transforma en un sustrato insoluble de color azul oscuro llamado formazán. Este ensayo permite cuantificar el índice de células que están vivas y metabólicamente activas en el cultivo, ya que la intensidad de color (medida por la absorbancia a determinada longitud de onda) será proporcional a la actividad metabólica, siendo una medida indirecta de la concentración celular (Nowak-Sliwinska *et al.*, 2018).

Las células se sembraron a las mismas densidades que anteriormente y se realizó el ensayo tras 24, 48 y 72 h de siembra. Se consideró que la absorbancia medida a 24 h reflejaba el número de células viables al inicio del experimento, de forma que las siguientes medidas se normalizaron respecto a la misma para cada densidad de siembra. Los resultados obtenidos mostraron que el índice de viabilidad celular aumentó durante todo el estudio (**Figura 8**).

A las 72 h de incubación las células sembradas a C1 y C2 experimentaron índices de viabilidad similares, mientras que en el caso de las sembradas a C3, la viabilidad fue significativamente

menor. Esto es aceptable en células primarias que mantienen la inhibición por contacto, por lo que, a densidades celulares elevadas disminuye su metabolismo celular. Este resultado está en consonancia con los resultados anteriores.

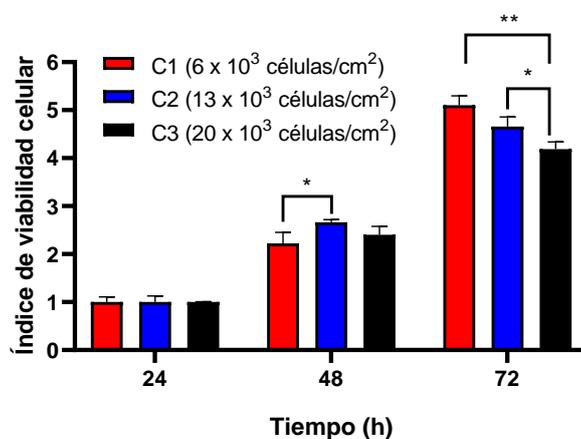


Figura 8. Índice de viabilidad celular obtenido a partir del ensayo del MTT. Las células se sembraron a 3 densidades diferentes (C1, C2 y C3) y fueron analizadas utilizando MTT a las 24, 48 y 72 h. Se representan los datos normalizados respecto a las 24 h de la media \pm SD (n=3), $p < 0,05^*$; $p < 0,005^{**}$.

3.2 Ensayos de migración

Ensayo de cierre de herida. Como se comentó anteriormente, las CEs, cuando están formando una monocapa y, por tanto, en estado quiescente, tienen la tendencia a migrar hacia un área desnuda (herida) que se haya producido en dicha monocapa. Por tanto, la cuantificación del tiempo de cierre de herida permite estimar la capacidad de migración de las CEs. Este ensayo se realiza a tiempos cortos para que el cierre de herida que se deba al incremento en nuevas células, por reactivación del ciclo celular, no sea muy relevante.

Al poner a punto nuestro ensayo, decidimos analizar el efecto del etopósido, un agente quimioterapéutico empleado para el tratamiento de varios tipos de cánceres humanos, sobre la capacidad de migración de las BAEC. Esta molécula actúa sobre las topoisomerasas de tipo II, induciendo cortes en el ADN y, por tanto, activando la respuesta celular a daño genotóxico, incluyendo la parada del ciclo celular (Baldwin y Osheroff, 2005), afectando a la proliferación de las CEs de una forma dosis-dependiente (Panigrahy *et al.*, 2010). En nuestro ensayo, el porcentaje de área cerrada por las células aumentó con el transcurso de las horas de forma uniforme, tanto en los controles como en las muestras tratadas (**Figura 9**). A las 12 h el porcentaje de área cerrada fue de un $48,59 \% \pm 9,52 \%$ en los controles y de un $40,73\% \pm 4,37\%$ en las tratadas, mientras que a las 24 h estaba más del 80% del área cerrada en ambos casos, indicando que, a la concentración estudiada, el etopósido no afecta significativamente a la migración de las BAEC.

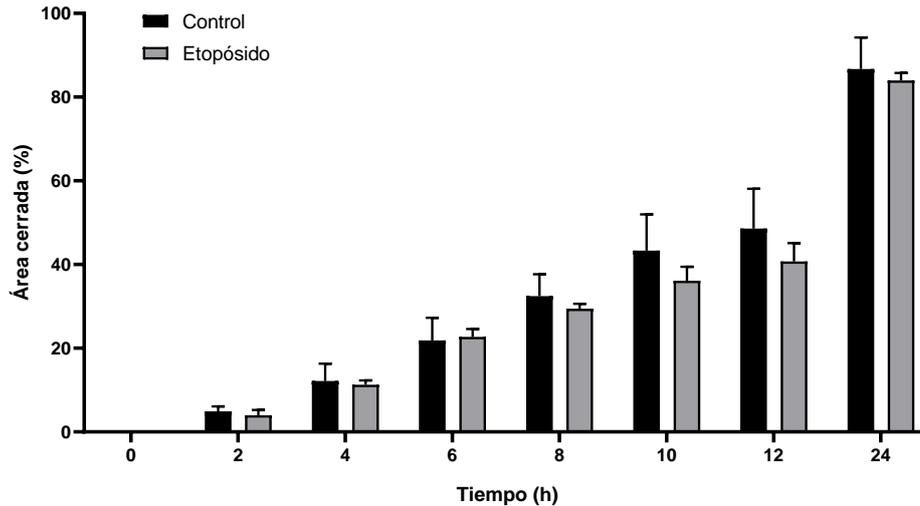


Figura 9. Efecto del etopósido en la migración celular. Las células se sembraron a una densidad de $2,26 \times 10^4$ células/cm². A las 48 h se realizó el ensayo de herida y se tomaron fotografías cada 2 h durante las primeras 12 h y a las 24 h y se calculó el porcentaje de área cerrada por las células respecto al tiempo 0 h. Los datos expresan la media \pm SEM (n=3).

El efecto del etopósido varía en función de la línea celular estudiada. En otros estudios con astrocitos se ha visto que el etopósido afecta a su capacidad de migración a partir de las 30 h de incubación a una concentración de 10 μ M (Bang *et al.*, 2019), mientras que en HUVEC induce apoptosis a partir de concentraciones de 0,02 mg/ml (Mailloux *et al.*, 2001). Nuestros resultados muestran que el etopósido a 10 μ g/ml (17 μ M) no afecta a la migración de las BAEC en las primeras 24 h de incubación. Sin embargo, experimentos a concentraciones mayores, no tóxicas, serían necesarios para confirmar que este compuesto no tiene efecto sobre la migración de estas células.

3.3 Ensayos de morfogénesis

Ensayo de formación de tubos. Los ensayos que simulan la formación de estructuras similares a tubos son representativos de las últimas etapas de la angiogénesis y se han utilizado ampliamente para analizar compuestos con posibles efectos pro- o anti-angiogénicos (Staton *et al.*, 2009). El ensayo es muy rápido y se basa en la tendencia de las CEs a establecer uniones intercelulares y estructuras ramificadas cuando se siembran sobre una matriz semisólida como el Matrigel, sobre el cual las CEs no pueden formar monocapas.

En este trabajo nos preguntamos si el etopósido podría afectar a esta capacidad en las BAEC. Las células se sembraron sobre el Matrigel polimerizado y se monitorizó la formación de tubos al microscopio de contraste de fases. Se observó que la formación de tubos se inició en torno a las 6 h tras la siembra, tanto en los pocillos control como en los tratados, y continuó hasta en torno las 8 a 10 h, momento en el cual se cuantificaron varios parámetros morfogénicos (**Figura**

10). Después de este tiempo, las estructuras empezaron a desensamblarse y a las 24 h se observó la formación de agregados.

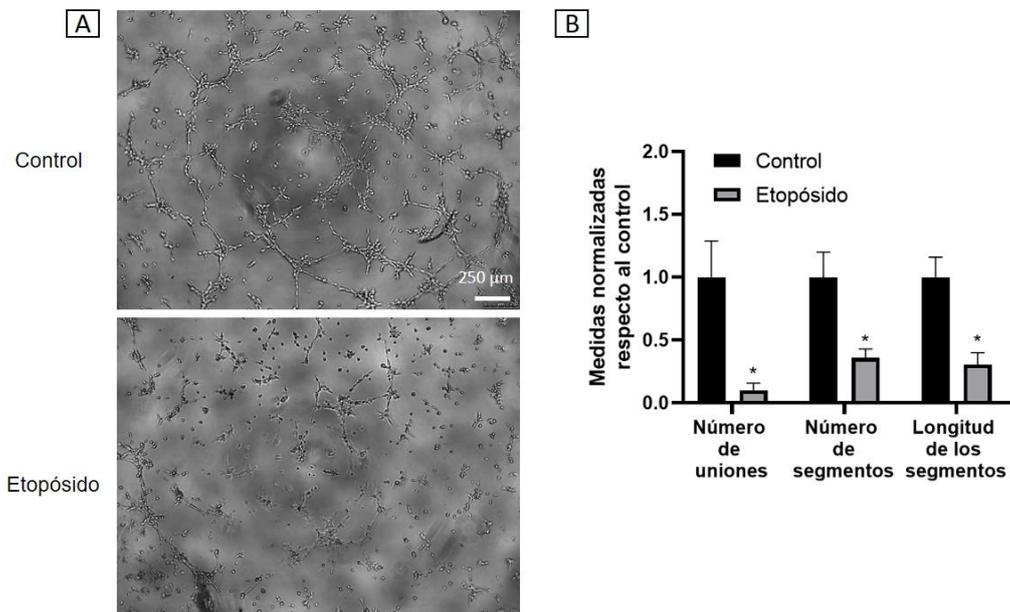


Figura 10. Efecto del etopósido en la formación de estructuras similares a tubos. Se cuantificaron varias características de los tubos formados a las 8 h de tratamiento. Fotografías tomadas a 5X (A) y analizadas usando la herramienta “*angiogenesis analyzer*” de ImageJ (B). Los datos expresan la media \pm SEM (n=3), $p < 0,05^*$.

La mayor concentración de estructuras semejantes a tubos se encontró a las 8 h, tiempo elegido para el análisis estadístico. Como se observa en la **Figura 10A**, las células control formaron una mayor cantidad de tubos que las células tratadas con etopósido, donde las células estaban dispersas y solo se observaba la formación de estructuras con muy pocas células. El análisis estadístico, midiendo diferentes características de los tubos formados (número de uniones, número de segmentos y longitud de los mismos), mostró diferencias significativas entre las muestras control y las tratadas (**Figura 10B**), indicando que el etopósido afecta a la capacidad de las BAEC a establecer uniones intercelulares estables.

Nuestros resultados, aunque preliminares, están en consonancia con lo publicado anteriormente donde se reportaba que el etopósido inhibe la formación de tubos en ensayos *in vitro* con HUVEC de una forma dosis-dependiente (Panigrahy *et al.*, 2010).

CONCLUSIONES

La angiogénesis es un proceso complejo que requiere numerosas interacciones entre diferentes tipos celulares, factores de crecimiento, componentes de la MEC y estímulos mecánicos.

El mantenimiento de la homeostasis de un organismo requiere la regulación precisa del proceso angiogénico y, cuando este se desregula, da lugar a diferentes patologías tales como el cáncer.

Los modelos celulares son esenciales para estudiar la angiogénesis e identificar y desarrollar fármacos. Sin embargo, aún se requiere el uso de modelos animales.

El desarrollo de las tecnologías microfluídicas con células troncales humanas podría proporcionar modelos que recapitulen los procesos angiogénicos que ocurren *in vivo*.

Hemos puesto a punto el cultivo de BAEC, determinando su densidad de siembra óptima en 6×10^3 células/cm², con un subcultivo cada 48 h.

Por otra parte, hemos puesto a punto las condiciones de los ensayos de migración y morfogénesis con BAEC. En estos ensayos el etopósido, a la concentración empleada, únicamente afecta a la morfogénesis, pero no a la capacidad de migración.

REFERENCIAS

- Antoniotti, S., Pla, A., Barral, S., Scalabrino, O., Munaron, L. y Lovisolo, D. (2006) "Interaction between TRPC channel subunits in endothelial cells", *Journal of receptors and signal transduction*, 26(4), pp. 225-240.
- Aplin, A. C. y Nicosia, R. F. (2015) "The rat aortic ring model of angiogenesis", en Domenico, R. (ed.) *Vascular morphogenesis: methods and protocols*. 1.^a ed. New York: Humana Press, pp. 255-264.
- Augustin, H. G., Koh, G. Y., Thurston, G. y Alitalo, K. (2009) "Control of vascular morphogenesis and homeostasis through the angiopoietin - Tie system", *Nature reviews molecular cell biology*, 10(3), pp. 165-177.
- Baldwin, E. y Osheroff, N. (2005) "Etoposide, topoisomerase II and cancer", *Current medicinal chemistry-anti-cancer agents*, 5(4), pp. 363-372.
- Bang, M., Kim, D. G., Gonzales, E. L., Kwon, K. J. y Shin, C. Y. (2019) "Etoposide induces mitochondrial dysfunction and cellular senescence in primary cultured rat astrocytes", *Biomolecules and therapeutics*, 27(6), pp. 530-539.
- Blanco, R. y Gerhardt, H. (2013) "VEGF and Notch in tip and stalk cell selection", *Cold spring harbor perspectives in medicine*, 3, a006569.
- Bray, S. J. (2006) "Notch signalling: a simple pathway becomes complex", *Nature reviews molecular cell biology*, 7(9), pp. 678-689.
- Carmeliet, P. (2005) "Angiogenesis in life, disease and medicine", *Nature*, 438(7070), pp. 932-936.
- Carmeliet, P. y Jain, R. K. (2011) "Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis", *Nature*, 473(7347), pp. 298-307.
- Chávez, M. N., Aedo, G., Fierro, F. A., Allende, M. L. y Egaña, J. T. (2016) "Zebrafish as an emerging model organism to study angiogenesis in development and regeneration", *Frontiers in physiology*, 7, 56.
- Chen, Q., Liu, W., Guo, X., Li, Y. y Guo, Z. (2007) "Biphasic effect of aspirin on apoptosis of bovine vascular endothelial cells and its molecular mechanism", *Acta pharmacologica sinica*, 28(3), pp. 353-358.
- Chen, W., Xia, P., Wang, H., Tu, J., Liang, X., Zhang, X. y Li, L. (2019) "The endothelial tip-stalk cell selection and shuffling during angiogenesis", *Journal of cell communication and signaling*, 13(3), pp. 291-301.
- Díaz-Flores, L., Gutiérrez, R., García-Suárez, M. P., Sáez, F. J., Gutiérrez, E., Valladares, F., Carrasco, J. L., Díaz-Flores, L. Jr. y Madrid, J. F. (2017) "Morphofunctional basis of the different types of angiogenesis and formation

- of postnatal angiogenesis-related secondary structures", *Histology and histopathology*, 32(12), pp. 1239-1279.
- Eales, K., Hollinshead, K. y Tennant, D. (2016) "Hypoxia and metabolic adaptation of cancer cells", *Oncogenesis*, 5, e190.
- Eilken, H. M. y Adams, R. H. (2010) "Dynamics of endothelial cell behavior in sprouting angiogenesis", *Current opinion in cell biology*, 22(5), pp. 617-625.
- Eklund, L., Bry, M. y Alitalo, K. (2013) "Mouse models for studying angiogenesis and lymphangiogenesis in cancer", *Molecular oncology*, 7(2), pp. 259-282.
- Fagiani, E. y Christofori, G. (2013) "Angiopoietins in angiogenesis", *Cancer letters*, 328(1), pp. 18-26.
- Fallah, A., Sadeghinia, A., Kahroba, H., Samadi, A., Heidari, H. R., Bradaran, B., Zeinali, S. y Molavi, O. (2019) "Therapeutic targeting of angiogenesis molecular pathways in angiogenesis-dependent diseases", *Biomedicine and pharmacotherapy*, 110, pp. 775-785.
- Goodwin, A. M. (2007) "In vitro assays of angiogenesis for assessment of angiogenic and anti-angiogenic agents", *Microvascular research*, 74(2-3), pp. 172-183.
- Grebenyuk, S. y Ranga, A. (2019) "Engineering organoid vascularization", *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 7, 39.
- Herbert, S. P. y Stainier, D. Y. (2011) "Molecular control of endothelial cell behaviour during blood vessel morphogenesis", *Nature reviews molecular cell biology*, 12(9), pp. 551-564.
- Huch, M., Knoblich, J. A., Lutolf, M. P. y Martinez-Arias, A. (2017) "The hope and the hype of organoid research", *Development*, 144(6), pp. 938-941.
- Irvin, M. W., Zijlstra, A., Wikswow, J. P. y Pozzi, A. (2014) "Techniques and assays for the study of angiogenesis", *Experimental biology and medicine*, 239(11), pp. 1476-1488.
- Jang, S., Collin de l'Hortet, A. y Soto-Gutierrez, A. (2019) "Induced pluripotent stem cell-derived endothelial cells: overview, current advances, applications, and future directions", *American journal of pathology*, 189(3), pp. 502-512.
- Li, X. y Claesson-Welsh, L. (2009) "Embryonic stem cell models in vascular biology", *Journal of thrombosis and haemostasis*, 7(s1), pp. 53-56.
- Liu, W. C., Chen, S., Zheng, L. y Qin, L. (2017) "Angiogenesis assays for the evaluation of angiogenic properties of orthopaedic biomaterials – a general review", *Advanced healthcare materials*, 6(5), 1600434.
- Mailloux, A., Grenet, K., Bruneel, A., Bénéteau-Burnat, B., Vaubourdolle, M. y Baudin, B. (2001) "Anticancer drugs induce necrosis of human endothelial cells involving both oncosis and apoptosis", *European journal of cell biology*, 80(6), pp. 442-449.
- Masoud, G. N. y Li, W. (2015) "HIF-1 α pathway: role, regulation and intervention for cancer therapy", *Acta pharmaceutica sinica B*, 5(5), pp. 378-389.
- Melincovici, C. S., Boşca, A. B., Şuşman, S., Mărginean, M., Mişu, C., Istrate, M., Moldovan, I. M., Roman, A. L. y Mişu, C. M. (2018) "Vascular endothelial growth factor (VEGF) – key factor in normal and pathological angiogenesis", *Romanian journal of morphology and embryology*, 59(2), pp. 455-467.
- Miller, J. S., Stevens, K. R., Yang, M. T., Baker, B. M., Nguyen, D. H. T., Cohen, D. M., Toro, E., Chen, A. A., Galie, P. A., Yu, X., Chaturvedi, R., Bhatia, S. N. y Chen, C. S. (2012) "Rapid casting of patterned vascular networks for perfusable engineered three-dimensional tissues", *Nature materials*, 11(9), pp. 768-774.
- Nerini, I. F., Cesca, M., Bizzaro, F. y Giavazzi, R. (2016) "Combination therapy in cancer: effects of angiogenesis inhibitors on drug pharmacokinetics and pharmacodynamics", *Chinese journal of cancer*, 35, 61.
- Nowak-Sliwinska, P., Alitalo, K., Allen, E., Anisimov, A., Aplin, A. C., Auerbach, R., Augustin, H. G., Bates, D. O., van Beijnum, J. R., Bender, R. H. F., Bergers, G., Bikfalvi, A., Bischoff, J., Böck, B. C., Brooks, P. C., Bussolino, F., Cakir, B., Carmeliet, P., Castranova, D., Cimpean, A. M., Cleaver, O., Coukos, G., Davis, G. E., De Palma, M., Dimberg, A., Dings, R. P. M., Djonov, V., Dudley, A. C., Dufton, N. P., Fendt, S. M., Ferrara, N., Fruttiger, M., Fukumura, D., Ghesquière, B., Gong, Y., Griffin, R. J., Harris, A. L., Hughes, C. C. W., Hultgren, N. W., Iruela-Arispe, M. L., Irving, M., Jain, R. K., Kalluri, R., Kalucka, J., Kerbel, R. S., Kitajewski, J., Klaassen,

I., Kleinmann, H. K., Koolwijk, P., Kuczynski, E., Kwak, B. R., Marien, K., Melero-Martin, J. M., Munn, L. L., Nicosia, R. F., Noel, A., Nurro, J., Olsson, A. K., Petrova, T. V., Pietras, K., Pili, R., Pollard, J. W., Post, M. J., Quax, P. H. A., Rabinovich, G. A., Raica, M., Randi, A. M., Ribatti, D., Ruegg, C., Schlingemann, R. O., Schulte-Merker, S., Smith, L. E. H., Song, J. W., Stacker, S. A., Stalin, J., Stratman, A. N., Van de Velde, M., van Hinsbergh, V. W. M., Vermeulen, P. B., Waltenberger, J., Weinstein, B. M., Xin, H., Yetkin-Arik, B., Yla-Herttuala, S., Yoder, M. C. y Griffioen, A. W. (2018) "Consensus guidelines for the use and interpretation of angiogenesis assays", *Angiogenesis*, 21(3), pp. 425-532.

Panigrahy, D., Kaipainen, A., Butterfield, C. E., Chaponis, D. M., Laforme, A. M., Folkman, J. y Kieran, M. W. (2010) "Inhibition of tumor angiogenesis by oral etoposide", *Experimental and therapeutic medicine*, 1(5), pp. 739-746.

Phng, L. K. y Gerhardt, H. (2009) "Angiogenesis: a team effort coordinated by Notch", *Developmental cell*, 16(2), pp. 196-208.

Potente, M., Gerhardt, H. y Carmeliet, P. (2011) "Basic and therapeutic aspects of angiogenesis", *Cell*, 146(6), pp. 873-887.

Potente, M. y Mäkinen, T. (2017) "Vascular heterogeneity and specialization in development and disease", *Nature reviews molecular cell biology*, 18(8), pp. 477-494.

Ribatti, D. (2009) "Endogenous inhibitors of angiogenesis. A historical review", *Leukemia research*, 33(5), pp. 638-644.

Ribatti, D. (2014) "History of research on angiogenesis", *Chemical immunology and allergy*, 99, pp. 1-14.

Ribatti, D. y Crivellato, E. (2012) "«Sprouting angiogenesis», a reappraisal", *Developmental biology*, 372(2), pp. 157-165.

Simons, M., Alitalo, K., Annex, B. H., Augustin, H. G., Beam, C., Berk, B. C., Byzova, T., Carmeliet, P., Chilian, W., Cooke, J. P., Davis, G. E., Eichmann, A., Iruela-Arispe, M. L., Keshet, E., Sinusas, A. J., Ruhrberg, C., Woo, Y. J. y Dimmeler, S. (2015) "State-of-the-art methods for evaluation of angiogenesis and tissue vascularization: a scientific statement from the American Heart Association", *Circulation research*, 116(11), pp. e99-e132.

Sobrino, A., Phan, D. T. T., Datta, R., Wang, X., Hachey, S. J., Romero-López, M., Gratton, E., Lee, A. P., George, S. C. y Hughes, C. C. W. (2016) "3D microtumors *in vitro* supported by perfused vascular networks", *Scientific reports*, 6, 31589.

Song, J. Y., Kim, M. J., Jo, H. H., Hwang, S. J., Chae, B., Chung, J. E., Kwon, D. J., Lew, Y. O., Lim, Y. T., Kim, Jang Heub, Kim, Jin Hong y Kim, M. R. (2009) "Antioxidant effect of estrogen on bovine aortic endothelial cells", *Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 117(1-3), pp. 74-80.

Staton, C. A., Reed, M. W. R. y Brown, N. J. (2009) "A critical analysis of current *in vitro* and *in vivo* angiogenesis assays", *International journal of experimental pathology*, 90(3), pp. 195-221.

Stryker, Z. I., Rajabi, M., Davis, P. J. y Mousa, S. A. (2019) "Evaluation of angiogenesis assays", *Biomedicines*, 7(2), 37.

Tahergorabi, Z. y Khazaei, M. (2012) "A review on angiogenesis and its assays", *Iranian journal of basic medical sciences*, 15(6), pp. 1110-1126.

Viallard, C. y Larrivé, B. (2017) "Tumor angiogenesis and vascular normalization: alternative therapeutic targets", *Angiogenesis*, 20(4), pp. 409-426.

Zarkada, G., Heinolainen, K., Makinen, T., Kubota, Y. y Alitalo, K. (2015) "VEGFR3 does not sustain retinal angiogenesis without VEGFR2", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(3), pp. 761-766.

Zervantonakis, I. K., Kothapalli, C. R., Chung, S., Sudo, R. y Kamm, R. D. (2011) "Microfluidic devices for studying heterotypic cell-cell interactions and tissue specimen cultures under controlled microenvironments", *Biomicrofluidics*, 5(1), 013406.

Zuazo-Gaztelu, I. y Casanovas, O. (2018) "Unraveling the role of angiogenesis in cancer ecosystems", *Frontiers in oncology*, 8, 248.